საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლა (ფაკულტეტი)

საგანმანათლებლო პროგრამა - ბილოგიურად აქტიურ ნივთიერებათა ქიმია და სამკურნალო პრეპარატების ექსპერტიზა

თამარ კოპალიანი

მცენარე *Digitalis ferruginea*-ს ქიმიური შედგენილობის შესწავლა

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომის

სადისერტაციო მაცნე

მიმართულება - 05 საბუნებისმეტყველო მეცნიერებები

დარგი/სპეციალობა - 0503 ქიმია

თბილისი

2018

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია თსსუ იოველ ქუთათელაძის ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტის სტეროიდული ნივთიერებების ლაბორატორიასა და საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) მიმართულებაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: **1. ალექსანდრე სხირტლაძე**
ფარმაცევტულ მეცნიერებათა
აკადემიური დოქტორი, პროფესორი

ოფიციალური ოპონენტები: **1. ნუგზარ ალექსიძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

2. მარიამ ბენიძე
ფარმაცევტულ მეცნიერებათა
აკადემიური დოქტორი, პროფესორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2018 წლის „_____“ ___ საათზე.

საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.

მისამართი: 0162, თბილისი, ილია ჭავჭავაძის ქ. №53ᵃ, II კორპუსი, აკადემიკოს ილია ვეკუას სახელობის 104 აუდიტორია.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის სამეცნიერო ბიბლიოთეკაში.

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2018 წლის „_____“

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი,
ტექნიკურ მეცნიერებათა კანდიდატი, პროფესორი

თემურ კივილაძე

1. ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

1.1 თემის აქტუალობა

მიუხედავად ორგანული სინთეზის უდიდესი წარმატებისა, ბუნებრივ ნივთიერებებს და მათ შორის მცენარეული წარმოშობისას განსაკუთრებული ადგილი უჭირავთ სამკურნალო პრეპარატების შექმნის დარგში. ბოლო ხანებში ანტიბიოტიკების, სულფანილამიდების და რიგი სხვა სინთეზური პრეპარატებისადმი მრავალი დაავადების რეზისტენტობამ (შემგუებლობამ), არასასურველმა თანამოვლენებმა, მსოფლიოში კიდევ უფრო გააძლიერა ინტერესი მცენარეული სამკურნალო საშუალებებისადმი.

საქართველოს მრავალფეროვანი ფლორა, სადაც 4600-მდე სახეობაა აღწერილი, ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებათა დაუშრეტელი წყაროა, ფარმაკოქიმიური კველვებისათვის განუსაზღვრელ პერსპექტივას წარმოადგენს და სხვადასხვა მოქმედების მქონე პრეპარატების შექმნის დიდ შესაძლებლობას განაპირობებს.

წარმოდგენილი შრომა საქართველოში მოზარდი *Digitalis*-ის ერთ-ერთი სახეობის *Digitalis ferruginea* L. - ჟანგოვანა სათითურას შესწავლას ეძღვნება, შემდგომში მისი გამოყენების მიზნით.

Digitalis ferruginea - ჟანგოვანა სათითურა ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტის დიდი ხნის კვლევის ობიექტია და გარკვეული წარმატებებია მოპოვებული, მაგრამ საქართველოში მოზარდი ამ მცენარის შედგენილობის შემდგომი შესწავლა ახალი კომპონენტების და საინტერესო მოქმედების მქონე საშუალებების გამოვლინების საშუალებას იძლევა.

1.2 კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები

- საქართველოს ფლორის *Digitalis ferruginea*-ს ცალკეული ორგანოების სხვადასხვა კლასის ნივთიერებებით გამდიდრებული ფრაქციების მიღება, ინდივიდუალურ კომპონენტებად დაყოფა
- გამოყოფილ ნივთიერებათა თვისობრივი შესწავლა და სტრუქტურების დადგენა
- *Digitalis ferruginea*-ს პრაქტიკაში გამოყენების შესაძლებლობის განსაზღვრა.

1.3 ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები

შესწავლილია საქართველოში მოზარდი *Digitalis ferruginea* - ჟანგოვანა სათუთურას ცალკეული ორგანოების წონითი შეფარდება მთლიან მცენარესთან, დადგენილია რომ მცენარის ძირითადი ნაწილია ღერო, შემდეგ ფოთოლი, პერიკარპიუმი, ფესვი და თესლი.

მცენარეში კარდენოლიდების ძირითადი აგლიკონის წარმოებულები ბიოსინთეზირდება: დიგიტოქსიგენინის, გიტა-ლოქსიგენინის, გიტოქსიგენინის, დიგოქსიგენინის. დომინირებს დიგიტოქსიგენინის ნაწარმი გლიკოზიდები და მცენარე შეიძლება მოწოდებულ იქნას რადიკალური საგულე გლი-კოზიდების დიგიტოქსინისა და აცეტილდიგიტოქსინის წარმოებისათვის.

ჟანგოვანა სათითურას პერიკარპიმიდან (ნაყოფსაფარი) გამოყოფილია 9 სტეროიდული გლიკოზიდი, აქედან 6 ცნობილი და 3 ახალი ორგანული ნივთიერებაა, რომელთა სტრუქტურები დადგენილია კლასიკური ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდებით და

თანამედროვე სპექტრული ანალიზებით: ერთ- და ორგან-ზომილებიანი ბმრ (^{1}H, ^{13}C, HSQC, HMBC, COSY) და მას-სპექტროსკოპიით (ESI/MS).

გარდა ამისა, იზოლირებულია ოლიგოსაქარიდი, 2 კარდე-ნოლიდი - დიგიტალინუმ ვერუმი, ნეოდიგიტალინუმ ვერუმი და 3 ფენილეთანოიდი, ერთი მათგანი ახალი ორგანული ნივთიერებაა შემდეგი სტრუქტურით: 2-(3-მეთოქსი,4-ჰიდროქსიფენილ) ეთილ O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→3)-O-[α-L-რამნოპირანოზილ-(1→6)]-[α-L-არაბინოპირანოზილ-(1→2)]-4-*O-(E)*-ფერულოილ-β-D-გლუკოპირანოზიდი, რომელსაც **ფერუგოზიდი A** ეწოდა.

მოწოდებულია მცენარის თესლებიდან შეუცვლელი ქიმიური რეაქტივის - სტეროიდულ საპონინ დიგიტონინის გამოყოფის გაუმჯობესებული მეთოდი, რაც უზრუნველყოფს მისი სუფთა სახით მიღებას და გამოყენებულ უნდა იქნას ამ ძვირფასი ქიმიური რეაქტივის - კომერციული დიგიტონინის წარმოებისათვის.

PASS და ACD/I-Lab გამოყენებით ჩატარებულია *Digitalis ferruginea*-ს ფოთლების სპირტიანი ექსტრაქტის *in silico* ექსპერიმენტი. გამოვლენილია ექსტრაქტის სავარაუდო მრავალმხრივი ბიოლოგიური აქტიურობა (ალბათობა>70%), დაგენილია მისი LD_{50}.

1.4 კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები

Digitalis ferruginea - ჟანგოვანა სათუთურას ცალკეული ორგანოების ექსტრაქციას ვახდენდით 80 % მეთანოლით.

თესლებს ლიპოფილური ნივთიერებებისგან ვათავისუ-ფლებდით ჰექსანით ფორექსტრაქციით.

თხელფენოვანი ქრომატოგრაფირებისათვის (თფქ) ვიყენე-ბდით სილიკაგელის ფირფიტებს (*Silicagel 60 F 254, Merck*). სვეტურ ქრომატოგრაფირებას ვახდენდით (სქ):*Diaion HP-20*-ზე, *Sefadex LH-20*-ზე და სილიკაგელზე (63/100 μm და 40/63 μm Merck).

თფქ-სათვის უნივერსალური სისტემა აღმოჩნდა: ქლორო-ფორმი–მეთანოლი–წყალი (26:14:3).

თფქ–ზე სტეროიდულ ნივთიერებებს ვამჟღავნებდით შემდეგი რეაქტივებით:

ა) *Sannie-Lapin* - სანიე-ლაპინის რეაქტივი: ვანილინის 1% სპირტიანი ხსნარი, ძმარმჟავა ანჰიდრიდის და კონც. გოგირდჟავას ნარევი (12:1);

ბ) *Matthews* - მათეუსის რეაქტივი: ვანილინის 0,5% ხსნარი ეთანოლში, გოგირდმჟავას შემდგომი დამუშავებით;

გ) *Erlich* - ერლიხის რეაქტივი: 1,4-პარადიმეთილამინო-ბენზალდეჰიდის 1% ხსნარი ეთანოლში და შემდეგ კონც. მარილმჟავა.

თფქ ფენოლური ნივთიერებების გამჟღავნებისათვის და კერძოდ ფლავონოიდებისთვის:

ა) $CeSO_4$ 2%-იანი ხსნარი კონც. გოგირდმჟავაში;

ბ) რკინის ქლორიდის 1-5% ხსნარი.

ლღობის ტემპერატურას ვსაზღვრავდით *Electrothermal 9100* აპარატზე, გაცხელებას ვახდენდით სისწრაფით 4°C/წთ.

ოპტიკურ ბრუნვას ვზომავდით *Perkin-Elmer 192* პოლარიმეტრზე.

მასს-სპექტრებს ვიღებდით *Amazon SL (Bruker*) მასს-სპექტომეტრზე.

ბმრ სპექტრულ ანალიზს ვატარებდით *Avance II 600 MHz* CD_3OD-ში.

საანალიზო ნიმუშებს ვაშრობდით ვაკუუმ-პისტოლეტში ფოსფორმჟავას ანჰიდრიდზე, ტოლუოლის დუღილის ტემპერატურაზე 4-8 სთ განმავლობაში.

1.5 ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა

მოწოდებულია საქართველოში მოზარდი *Digitalis ferruginea*-ს თესლებიდან შეუცვლელი ქიმიური რეაქტივის დიგიტონინის გამოყოფის გაუმჯობესებული ხერხი, მისი გამოსავალი 1.2 % შეადგენს და შეიძლება გამოყენებული იქნას ამ ძვირფასი რეაქტივის წარმოებისათვის.

ნაჩვენებია *D. ferruginea*-ს ექსტრაქტის მოსალოდნელი მრავალმხრივი სპეციფიკური ფარმაკოლოგიური აქტივობა: პროაპოპტური (73,8 %), ოქსიდორედუქტაზას ინჰიბიტორი (74,7 %), ფუნგიციდური (75 %), Caspase 8 სტიმულატორი (76,3 %), იმუნოსუპრესული (77,9 %), ანტიქოლესტერინემული (81,9 %), დიურეზული (84,6 %), კარდიოტონური (85,7 %), ანტიკანცეროგენური (86,7 %), ანალეფსური (87,3 %), ანტინეოპლასტიკური (89 %), ქემოპრევენციული (90,9 %), ანტიპროტოზოური (95,2 %), ანტიპროლიფერაციული (95,9 %), ზოგად საანაესთეზიო (97,4 %) და Caspase 3 სტიმულატორი (97,8 %). მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე მიზანშეწონილად მიგვაჩნია ექსტრაქტის გაღრმავებული შესწავლა, განსაკუთრებით სიმსივნის ქემოპრევენციის მიმართულებით.

Digitalis ferruginea-ს ფართოდ გავრცელება საქართველოში და მისი მდიდარი ქიმიური შედგენილობა მცენარის სხვადასხვა თვისებების მქონე ნივთიერების მიღების წყაროდ შეიძლება ჩაითვალოს.

1.6 ნაშრომის სტრუქტურა და მოცულობა

დისერტაცია მოიცავს: ანოტაციას (ქართულ და ინგლისურ ენებზე), შესავალს, ლიტერატურულ მიმოხილვას; ექსპერიმენტულ ნაწილში აღწერილია საკვლევი ობიექტები და კვლევის მეთოდები, საკუთარი კვლევის შედეგები, მათი განხილვა, დასკვნები, ერთი დანართი. გამოყენებული ლიტერატურის სიას სადაც 139 წყაროა მითითებული. შრომა ილუსტრირებულია 28 ცხრილით, 48 სურათით და 1 დიაგრამით. ნაშრომის მოცულობა 122 გვერდია.

2. ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

2.1 კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტად ვიყენებდით საქართველოში მოზარდ *Digitalis ferruginea*-ჟანგოვანა სათითურას.

Digitalis ferruginea L. - მრავალწლოვანი ბალახოვანი მცენარეა სწორი, მარტივი 40-150 სმ სიმაღლის ღეროთი და მორიგეობით განწყობილი 15-30 სმ სიგრძის ლანცეტისებრი ფოთლებით, ხშირად ჟანგისფერი ლაქებით; მტევნად შეკრული ხშირი ყვავილებით. გავრცელებულია ხმელთაშუაზღვის მხარეში, მცირე აზიაში, ბალკანეთის ნახევარკუნძულზე, კავკასიაში. საქართველოში იზრდება შუა ქართლში, თიანეთში, გარე კახეთში, მესხეთ-ჯავახეთში, აჭარაში, აფხაზეთში, სამაჩაბლოში სუბალპურ ზონაში, უმეტესწილად წიფლნარ და მუხნარ ღია და დაჩრდილულ ტყეებში.

Digitalis ferruginea-ს პირველი სერიოზული შესწავლა 1952 წ. Stoll და Renz-ის მიერ ჩატარდა, რომლებმაც თურქეთში

მოზარდი მცენარიდან ლანატოზიდები A, B, აცეტილდი-გიტოქსინი-β გამოყვეს. M. Apple და O. Gilsrold-მა აშშ მოზარდი მცენარის ნედლი ფოთლებიდან მიიღეს აცეტილდიგოქსინი-α, დიგიტოქსინი და სტეროიდული გლიკოზიდი ტიგონინი. Ulabeler თურქეთში შეგროვილი მცენარის თესლებში ლანატოზიდი A, B, C, დიგიტოქსინი, დიგოქსინი, გიტოქსინი აღმოაჩინა. Calcandi-მ ბუქარესტის ბოტანიკურ ბაღში კულტივირებულ მცენარეში დაადგინა ლანატოზიდების A, B, C, D, E, სტროსპეზიდის, ვეროდოქსინის, აცეტილდიგოქსინ-α არსებობა. გლიკოზიდთა ჯამის რაოდენობა ფოთლებში 0.72 % აღწევს. ნაჩვენები იყო, რომ *Digitalis ferruginea*-ს თესლების ძირითადი კომპონენტი არის ლანატოზიდი A, მნიშვნელოვანი რაოდენობით შეიცავს აგრეთვე გლუკოევატრომონოზიდს და გლუკოგიტოროზიდს. გლიკოზიდთა საერთო რაოდენობა თესლებში 0.40 %-ს შეადგენს. არაოფიცინალური სახეობების შედარებითი გამოკვლევებით Roda-მ დაადგინა, რომ გლიკოზიდთა რაოდენობით *Digitalis ferruginea* თითქმის არ ჩამოუვარდება *D. purpurea*-ს, ხოლო ბიოლოგიური აქტიობით აჭარბებს მას.

Digitalis ferruginea-ს გამოყენების საკითხი პირველად ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტში გადაწყდა. გასული საუკუნის 30-იან წლებში მისგან დამზადდა შვეიცარული ფირმის Hofman la Roche მიერ გამოშვებული პრეპარატის დიგალენის ანალოგიური სამკურნალო საშუალება, რომელსაც „დიგალენ-ნეო“ ეწოდა. დაიწყო მისი წარმოება და საბჭოთა კავშირის მოთხოვნას აკმაყოფილებდა.

2.2 კვლევის მეთოდები

სტეროიდული გლიკოზიდები ჟანგოვანა სათითურას ცალკეულ ორგანოებში სხვადასხვა რაოდენობით გროვდება და მთლიან მცენარეში მათი შემცველობა ვეგეტატიური ნაწილების წონით შეფარდებაზეა დამოკიდებული. საჭიროება მოითხოვდა ცალკეული ორგანოს წონითი შეფარდების და სტეროიდული ნივთიერებების განსაზღვრას.

გამოკვლევამ გვიჩვენა, რომ მცენარეში ცალკეული ორგანოს წონითი შეფარდებითი წილი მთლიანი მცენარის მიმართ ასეთია (%): ღერო 40.7; ფოთოლი 31.8; პერიკარპიუმი 12.3; ფესვი 11.7; თესლი 3.3 (ცხრილი 1).

კვლევის შემდეგ ეტაპზე ჩავატარეთ მცენარის ცალკეული ნაწილების სტეროიდების შემცველობის წინასწარი ანალიზი.

ჰაერმშრალი დაწვრილმანებული ნედლეულის 100 გ-ს 80 %-იანი მეთანოლით ვწვლილავდით 3 ჯერადად. გაერთიანებული ექსტრაქტიდან სპირტს გადავდენიდით, წყლიან სითხეს ვასუფთავებდით ქლოროფორმით, ვასქელებდით, ვაშრობდით და ვწონიდით. ნაშთი გადაგვქონდა ადსორბენტ Diaion HP 20-ის სვეტზე. სვეტს ვრეცხავდით თანმიმდევრობით წყლით, 50, 80 და 100 % მეთანოლით. ელუატებს ვასქელებდით, ვაშრობდით და ვწონიდით.

ვატარებდით 80 % ჯამის სტეროიდების რაოდენობით ანალიზს სპექტროფოტომეტრული მეთოდით.

ანალიზისთვის ვიღებდით მცენარის ცალკეული ნაწილების 80 % ჯამის 5 გ. ვათავსებდით 100 მლ მოცულობის ბრტყელძირა კოლბაში, ვუმატებდით 50 მლ მეთანოლს, სითხეში ვყურსავდით შემრევ ჩხირს, კოლბას ვწონიდით და ვათავსებდით მაგნიტურ სარეველაზე ადუღებიდან 1 სთ-ის განმავლობაში. ექსტრაქციის დამთავრების შემდეგ კოლბას

ვაციებდით ოთახის ტემპერატურამდე, ვწონიდით (მასაში დანაკარგის შემთხვევაში ვავსებდით მეთანოლით) და ვფილტრავდით.

ფილტრატის 10 მლ გადაგვქონდა 50 მლ მოცულობის გამზომ კოლბში და მოცულობას ვავსებდით ჭდემდე მეთანოლით („ა“ ხსნარი). „ა“ ხსნარის 5 მლ გადაგვქონდა სინჯარაში, ვუმატებდით 5 მლ 1 % პარადიმეთილამინობენზალდეჰიდის ხსნარს („ბ“ ხსნარი). საკონტროლო ცდისთვის „ა“ ხსნარს ვუმატებდით 4 N ქლორწყალბადმჟავას („გ“ ხსნარი). „ბ“ და „გ“ ხსნარებს ვათავსებდით ულტრათერმოსტატში 57-60 °C ტემპერატურაზე 2 სთ. გაციების შემდეგ ოპტიკურ სიმკვრივეს ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრით (Nano spec-2) 518 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

ფუროსტანოლური გლიკოზიდების შემცველობას ვანგარიშობდით კობალტის ქლორიდის მრუდეზე გადაანგარიშებით ფორმულით:

$$x = \frac{940{,}1 * 50 * \mathrm{m}}{\mathrm{m1} * \mathrm{K}(100 - \mathrm{w})}$$

სადაც:

- 940,1 - ფუროსტანოლური გლიკოზიდების გადაანგარიშების კოეფიციენტია კობალტის ქლორიდის კონცენტრაციაზე
- 50 - გამოსაკვლევი ხსნარის საწყისი მოცულობა, მლ
- m - კობალტის ქლორიდის რაოდენობა საკალიბრო მრუდის მიხედვით, გ
- m1 - ნედლეულის მასა, გ
- K - შესწორების კოეფიციენტი მჟავას ტიტრზე
- w - ტენიაობა

აღმოჩნდა, რომ ფოთლების გასუფთავებულ ჯამში ფუროსტანების რაოდენობა შეადგენს (%) 65, პერიკარპიუმში 54, ღეროში 16, ფესვში 21 და თესლში 46 (ცხრილი 1).

ცხრილი 1

მცენარის ორგანო	მთლიანი მცენარიდან მასური წილი, %	სტეროიდული გლიკოზიდების ჯამის გამოსავალი, %	ფუროსტანო-ლური გლიკოზიდების შემცველობა ჯამში, %
ღერო	40.7	1.19	16
ფოთოლი	31.8	4.41	65
პერიკარპიუმი	12.3	5.02	54
ფესვი	11.7	4.54	21
თესლი	3.3	2.15	46

ჟანგოვანა სათითურას პერიკარპიუმის საპოგენინების თვისობრივი შედგენილობის შესწავლის მიზნით პერიკარპიუმის 80 % მეთანოლიანი ექსტრაქტის მჟავურ ჰიდროლიზს ვატარებდით, რისთვისაც 20 გ ექსტრაქტს ვხსნიდით 60 მლ წყალში, ვუმატებდით 40 მლ კონც. HCl და 50% მეთანოლით გაჯერებულ 50 მლ ბენზოლს. ვადუღებდით წყლის აბაზანაზე 3 სთ განმავლობაში. ნარევის გაცივების შემდეგ ბენზოლის ფენას გამოვყოფდით, წყლიანს ორჯერ ვწვლილავ-დით 15-15 მლ ბენზოლით. გაერთიანებულ ბენზოლიან გამონაწვლილს ვრეცხავდით წყლით ნეიტრალურ რეაქციამდე, განეიტრალებულ ბენზოლის ფენას ვამუშვებდით კალიუმის ტუტის ნაჯერი ხსნარით მეთანოლში, ბენზოლიან ფენას კვლავ ვრეცხავდით წყლით ნეიტრალურ რეაქციამდე, ვაუწყლოებდით უწყლო ნატრიუმის სულფატით და ვასქელებდით. ვღებულობ-

დით სტეროიდული საპოგენინების ჯამს 0.91 გ. აღმოჩნდა, რომ *D. ferruginea*-ს პერიკარპიუმში ძირითადი საპოგენინებია: დიგიტოგენინი, ტიგოგენინი და გიტოგენინი.

D. ferruginea-ს პერიკარპიუმიდან სხვადასხვა ნივთიერებებით გამდიდრებული ჯამის გამოყოფას შემდეგნაირად ვახდენდით: ჰაერმშრალი, დაწვრილმანებული პერიკარპიუმის 100 გ ვწვლილავდით 80 % მეთანოლით 3 ჯერადად მდუღარე წყლის აბაზანაზე გამხსნელის დუღილის ტემპერატურაზე 2 სთ-ის განმავლობაში. გაერთიანებულ ექსტრაქტებს ვფილტრავდით ბიუხნერის ძაბრში, ვასქელებდით ვაკუუმ–როტაციულ აპარატზე სპირტის სრულ მოცილებამდე, დარჩენილ წყლიან ნაშთს ვწვლილავდით ქლოროფორმით, წყლიან სითხეს შევასქელებდით და ნაშთს ვაშრობდით ვაკუუმ-მაშრობ კარადაში ფოსფორმჟავას ანჰიდრიდის თანაობისას. ქლოროფორმით იწვლილება ნაკლებ პოლარული ნივთიერებები.

ქიმიური შედგენილობის შესწავლის ობიექტად ქლორო-ფორმით გასუფთავებულ წყლიან ნაშთს ვიყენებდით.

გამშრალი მასა გადაგვქონდა Diaion HP-20-ის სვეტზე, ელუირებას ვახდენდით წყლით, 50, 80 და 100 % მეთანოლით. მიღებულ ფრაქციებს ვასქელებდით ვაკუუმ-როტაციულ აპარატზე სპირტის სრულ მოცილებამდე, ვაშრობდით ვაკუუმ მაშრობ კარადაში. შედეგად ვღებულობდით პოლარული ნივთიერებებით და სტეროიდული გლიკოზიდებით გამდიდრებულ ჯამებს.

50, 80 და 100 % ფრაქციის 3-3 გ დაყოფას ვაგრძელებდით Sephadex LH-20-ის სვეტზე (5X100 სმ) მეთანოლით. მიღწეული იქნა გლიკოზიდთა ჯამების უხეში დაყოფა, რომლებსაც შემდგომში ვატარებდით სხვადასხვა ზომის სილიკაგელის

(63/100; 40/63) სვეტებზე. ელუირებას ვახდენდით სისტემით ქლოროფორმი-მეთანოლი-წყალი 26:14:3;

შედეგად, *D. ferruginea*-ს პერიკარპიუმიდან გამოყოფილია 9 სტეროიდული გლიკოზიდი, 2 კარდენოლიდი, 3 ფენილეთანოიდი და ოლიგოსაქარიდი.

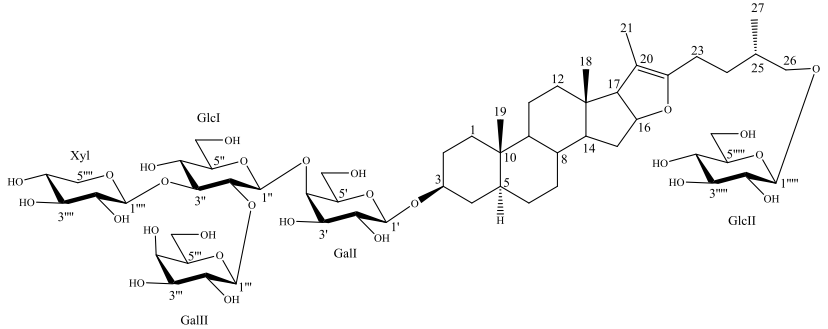
თითოეული ინდივიდუალური ნივთიერების სრული ქიმიური სტრუქტურა დადგინდა ფიზიკურ-ქიმიური მაჩვენებლებით, ერთ- და ორგანზომილებიანი ბირთვულ მაგნიტურ რეზონანსული (^{1}H, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC, COSY) და მასსპექტროსკოპიის გამოყენებით.

2.3 მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

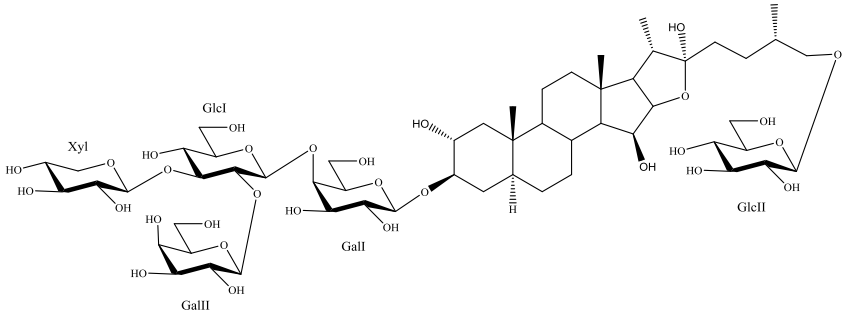
კვლევის პირველ ეტაპზე შევისწავლეთ *D. ferruginea*-ს სტეროიდული გლიკოზიდები. სხვადასხვა ადსორბენტებზე განაწილებითი და ადსორბციული ქრომატოგრაფირებით პერიკარპიუმიდან იზოლირებული და დახასიათებულია დიგიტოგენინის, ტიგოგენინის და გიტოგენინის წარმოებული 9 სპირო- და ფუროსტანოლური გლიკოზიდი: (25R)-5α-ფუროსტ-20(22)-ენ-3β,26-დიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გალაქტოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი (ნივთიერება 1); (25R)-5α-ფუროსტან-2α,3β,15β,22α,26-პენტაოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გალაქტოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი (ნივთიერება 2); (25R)-5α-სპიროსტან-2α,3β-დიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→3)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-

D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზიდი (ნივთიერება 3); (25R) 5α-ფუროსტ-20(22)-ენ-2α,3β,26-ტრიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი; (25R) 5α-ფუროსტან-2α,3β,22α,26-ტეტრაოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი; (25R) 5α-სპიროსტან-2α,3β-დიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზიდი; დეზგლუკოდიგიტონინი; დიგიტონინი; კაპსიკოზიდი B_1.

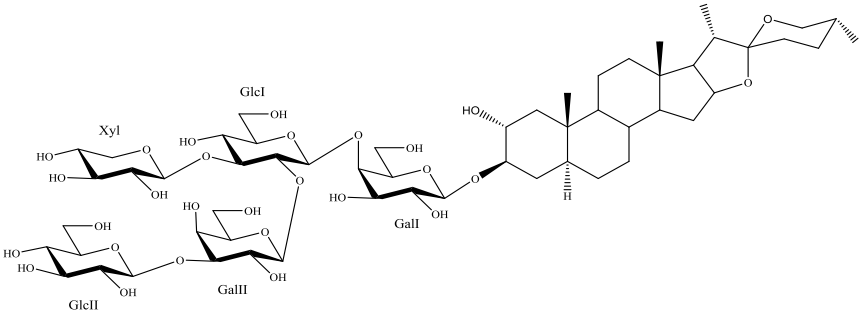
მათ შორის 1, 2 და 3 ახალი ორგანული ნივთიერებებია.



ნივთიერება 1

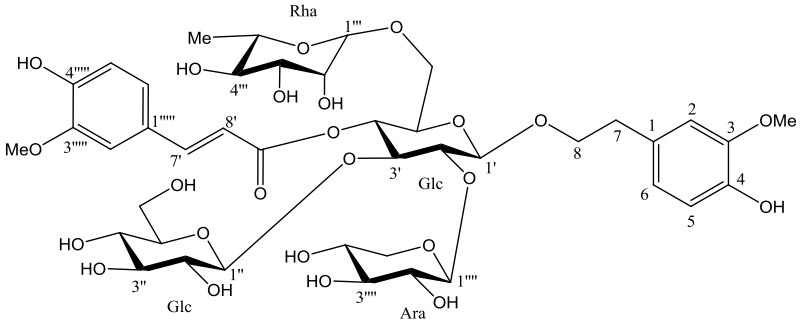


ნივთიერება 2



ნივთიერება 3

Digitalis ferruginea-ს პერიკარპიუმიდან გამოყოფილია ოლიგოსაქარიდი სტრუქტურით - β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-3-O-აცეტილ-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-კანაროპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-კანაროპირანოზიდი, ორი კარდენოლიდი: 3β,14β,16β-ტრიჰიდროქსი-5β-კარდ-20(22)-ენოლიდ 3-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტალოპირანოზიდი - დიგიტალინუმ ვერუმი და 3β,14β,16β-ტრიჰიდროქსი- 5β-კარდ-20(22)- ენოლიდ 3-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)-O-β-D-დიგიტალოპირანოზიდი - ნეოდიგიტალინუმ ვერუმი. იზოლირებულია, აგრეთვე სამი ფენილეთანოიდი: მაქსოზიდი, პურპურეოზიდი E და 2-(3-მეთოქსი,4-ჰიდროქსიფენილ)ეთილ O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→3)-O-[α-L-რამნოპირანოზილ-(1→6)]-[α-L-არაბინოპირანოზილ-(1→2)]-4-*O-(E)*-ფერულოილ-β-D-გლუკოპირანოზიდი, რომელსაც **ფერუგოზიდი A** ეწოდა.



ფერუგოზიდი A

2.4 ნაშრომის პრაქტიკული გამოყენება

დიგიტონინი ბუნებრივ ნივთიერებათა ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი კლასის სტეროიდული გლიკოზიდების წარმომადგენელია. იგი შედგება საპოგენინ დიგიტოგენინისა და ხუთი მოლეკულა მონოსაქარიდისგან - 2 გლუკოზა, 2 გალაქტოზა და ერთი ქსილოზა.

დიგიტონინი შეუცვლელი ქიმიური რეაქტივია. ქოლესტერინთან და ზოგიერთ სხვა ბუნებრივ ნივთიერებასთან უხსნად, მყარ კომპლექსურ ნაერთს ე.წ. „დიგიტონიდს“ წარმოქმნის; ამავე დროს, უნიკალური სტერეოსპეციფიკურობით ხასიათდება - უერთდება 3β ოქსისტეროიდებს, ხოლო 3α ეპიმერებთან კომპლექსს არ ჰქმნის. დიგიტონინის ეს თვისება ნივთიერებათა ანტიპოდების ნარევის დასაყოფად გამოიყენება. დიგიტონინი ფართოდ იხმარება მცენარეული და ცხოველური სტეროიდების და რიგი სხვა ბუნებრივი ნივთიერების თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზის, მიღებისა და შესწავლისათვის, როგორც დეტერგენტი უჯრედების მემბრანის სოლუბილიზაციისა და მოდიფიცირებისთვის.

ბიოქიმიური კვლევების განვითარებასთან ერთად მკვეთრად იზრდება დიგიტონინზე მოთხოვნილება.

დიგიტონინის ერთადერთ წყაროს მცენარე *Digitalis*-ის - სათითურას, კერძოდ კი *Digitalis purpurea* - ძოწი და *D. lanata* - ბუსუსოვანი სათითურას თესლები წარმოადგენენ.

მცენარიდან დიგიტონინის მიღების რამდენიმე მეთოდი არსებობს, რომლებიც, ძირითადად, ქოლესტერინთან კომპლექსის წარმოქმნაზეა დამყარებული, შემდგომში მისი დაშლა პირიდინთან გაცხელებით და მრავალჯერადი გასუფთავებით ხორციელდებოდა. არსებული მეთოდები მრავალსტადიანია და ტექნიკურად შრომატევადი, გამხსნელების, რეაქტივების დიდ ხარჯთან არიან დაკავშირებული, საბოლოო პროდუქტის შედარებით დაბალი გამოსავლის დროს.

დიგიტონინის ღირებულება მაღალია და საერთაშორისო ბაზარზე 1 გ-ის ფასი 250-500 ამერიკული დოლარს შეადგენს.

ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტში აკად. ე. ქემერტელიძემ დიგიტონინის მიღების გამარტივებული მეთოდი შეიმუშავა, რომელიც მიჩნეული იქნა გამოგონებად და გაიცა საბჭოთა კავშირის საავტორო მოწმობა, მეთოდი დაპატენტებულია ინგლისში, გერმანიაში და შვეიცარიაში. მაგრამ საქართველოში მოზარდი *Digitalis ferruginea* - ჟანგოვანა სათითურას თესლებიდან დიგიტონინის მიღება გართულებულია. მის თესლებში დიდი რაოდენობით გროვდება ქლოროფილი და საბოლოო პროდუქტი მომწვანო ფერისაა.

ამ საკითხის გადაწყვეტისათვის ჩვენ შევიტანეთ ცვლილება დიგიტონინის მიღების მეთოდში, რაც შემდგომში მდგომარეობს.

საქართველოში დაბა ბაკურიანის მიდამოებში შეგროვილ ჰ/მ დაწვრილმანებულ ჟანგოვანა სათითურას თესლებს ვათავსებ-

დით სოქსლეტის ტიპის აპარატში და ვწვლილავდით ქლოროფორმით გამონაწვლილის გაუფერულებამდე. ამ პროცესში ქლოროფორმით იწვლილება ქლოროფილი და ცხიმოვანი ზეთი, რომლის გამოსავალი 30 %-ს შეადგენს.

ლიპოფილური ნივთიერებებისგან განთავისუფლებულ თესლებს ვათავსებდით ექსტრაქტორში ვუმატებდით 4-5 მაგ რაოდენობა 80 % ეთილის (ან მეთილის) სპირტს და ვაცხელებდით წყლის აბაზანაზე გამხსნელის დუღილის ტემპერატურაზე 1 საათის განმავლობაში 3 ჯერადად. გაერთიანებულ ექსტრაქტებს ვაცენტრიფუგირებდით და ვათავსებდით ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ პროცესს გაუმჯობესებული (ე. ქემერტელიძე) მეთოდით ვაგრძელებდით.

ამგვარად, ვღებულობდით დიგიტონინს თეთრი ფერის ფხვნილის სახით (ლღ. ტემპ. 248-250°C, $[\alpha]^{20}_{D}$-49°C (C – 1.10; ძმარმჟავა). 1.2 %-ის ოდენობით, რაც თავისი თვისებებით შეესაბამება სუფთა კომერციულ პროდუქტს.

PASS და ACD/I-Lab გამოყენებით დადგინდა*D. ferruginea*-ს ფოთლების ექსტრაქტის მოსალოდნელი მრავალმხრივი სპეციფიკური ფარმაკოლოგიური აქტივობა: პროაპოპტური (73,8 %), ოქსიდორედუქტაზას ინჰიბიტორი (74,7 %), ფუნგიციდური (75 %), Caspase 8 სტიმულატორი (76,3 %), იმუნოსუპრესული (77,9 %), ანტიქოლესტერინემული (81,9 %), დიურეზული (84,6 %), კარდიოტონური (85,7 %), ანტიკანცეროგენური (86,7 %), ანალეფსური (87,3 %), ანტინეოპლასტიკური (89 %), ქემოპრევენციული (90,9 %), ანტიპროტოზოური (95,2 %), ანტიპროლიფერაციული (95,9 %), ზოგად საანესთეზიო (97,4 %) და Caspase 3 სტიმულატორი (97,8 %). მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე მიზანშეწონილად მიგვაჩნია*Digitalis ferruginea*-ს ფოთლების ექსტრაქტის გაღრმავებული შესწავლა, განსაკუთრებით სიმსივნის ქემოპრევენციის მიმართულებით.

2.5 დასკვნები

1. საქართველოში მოზარდი *Digitalis ferruginea* – ჟანგოვანა სათითურას ცალკეული ორგანოების ძირითადი ნაწილია ღერო 40,7 %, ფოთოლი 31,8 %, პერიკარპიუმი 12,3 %, ფესვი 11,7 % და ბოლოს თესლი 3,3 %. სტეროიდული ნივთიერებებით ყველაზე მდიდარია პერიკარპიუმი

2. *D. ferruginea* – ჟანგოვანა სათითურაში ამ გვარის თითქმის ყველა აგლიკონის: დიგიტოქსიგენინის, გიტოქსიგენინის, დიგინატიგენინის და დიგოქსიგენინის წარმოებული კარდენოლიდები მჟღავნდება. ძირითად კარდენოლიდებს დიგიტოქსიგენინის ნაწარმი გლიკოზიდიები შეადგენენ, რაც რადიკალური საგულე გლიკოზიდების - დიგიტოქსინისა და აცეტილდიგიტოქსინის მიღების წყაროდ შეიძლება ჩაითვალოს

3. *D. ferruginea*-ს პერიკარპიუმიდან იზოლირებული და დახასიათებულია 9 სტეროიდული გლიკოზიდი, მათგან 3 ახალი და 6 ცნობილი ორგანული ნივთიერებაა, რომელთა სტრუქტურები დადგენილია.
   - (25R)-5α-ფუროსტ-20(22)-ენ-3β, 26-დიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გალაქტოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი;
   - (25R)-5α-ფუროსტან-2α, 3β, 15β, 22α, 26-პენტანოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გალაქტოპირანو-ზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი;
   - (25R)-5α-სპიროსტან-2α,3β-დიოლ3-O-β-D-ქსილოპირა-ნოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→3)-O-β-D-

გალაქტოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზიდი;

ცნობილი გლიკოზიდებია:

- ❖ დეზგლუკოდიგიტონინი;
- ❖ დიგიტონინი;
- ❖ კაპსიკოზიდი B_1;
- ❖ (25R) 5α-ფუროსტ-20(22)-ენ-2α,3β,26-ტრიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქ-ტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი;
- ❖ (25R) 5α-ფუროსტან-2α,3β,22α,26-ტეტრაოლ 3-O-β-D-ქსი-ლოპირანოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქ-ტოპირანოზილ 26-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი;
- ❖ (25R) 5α-სპიროსტან-2α,3β-დიოლ 3-O-β-D-ქსილოპირა-ნოზილ-(1→3)-[O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)]-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-გალაქტოპირანოზიდი.

4. *D. ferruginea*-ს პერიკარპიუმიდან გამოყოფილია ოლიგო-საქარიდი სტრუქტურით - β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-3-O-აცეტილ-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტოქსოპირა-ნოზილ- (1→4) -O-β-D-დიგიტოქსოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-კანაროპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-კანაროპირანოზიდი

5. 3 ფენილეთანოიდი, რომელთაგან ერთი ახალი ორგანული ნივთიერებაა სტრუქტურით: 2-(3-მეთოქსი,4-ჰიდროქსიფე-ნილ)ეთილ O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→3)-O-[α-L-რამნო-პირანოზილ-(1→6)]-[α-L-არაბინოპირანოზილ-(1→2)]-4-*O-(E)*-ფერულოილ-β-D-გლუკოპირანოზიდი, რომელსაც

ფერუგოზიდი A ეწოდა, 2 კი ცნობილი აღმოჩნდა: მაქსოზიდი და პურპურეოზიდი E

6. *D. ferruginea*-ს პერიკარპიუმიდან იზოლირებულია 2 კარდენოლიდი შემდეგი ქიმიური სტრუქტურით: 3β,14β,16β-ტრიჰიდროქსი-5β-კარდ-20(22)-ენოლიდ 3-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→4)-O-β-D-დიგიტალოპირანოზი-დი ანუ დიგიტალინუმ ვერუმ და 3β,14β,16β-ტრიჰიდროქსი-5β-კარდ-20(22)-ენოლიდ 3-O-β-D-გლუკოპირანოზილ-(1→2)-O-β-D-დიგიტალოპირანოზიდი - ნეოდიგიტალინუმ ვერუმ

7. ნივთიერებათა სტრუქტურები დადგენილია კლასიკური ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდებით და თანამედროვე სპექტრული ანალიზების - ერთ- და ორგანზომილებიანი ბმრ (1H, 13C, HSQC, HMBC, COSY) და მას-სპექტროსკოპიის (ESI/MS) გამოყენებით

8. მოწოდებულია საქართველოში მოზარდი *D. ferruginea*-ს თესლებიდან შეუცვლელი ქიმიური რეაქტივის, კომერციული დიგიტონინის გამოყოფის გაუმჯობესებული ხერხი, მისი გამოსავალი 1,2 % შეადგენს და შეიძლება გამოყენებული იქნას ამ ძვირფასი რეაქტივის წარმოებისათვის

9. ნაჩვენებია *D. ferruginea*-ს ექსტრაქტის მოსალოდნელი მრავალმხრივი სპეციფიკური ფარმაკოლოგიური აქტივობა: პროაპოპტური (73,8 %), ოქსიდორედუქტაზას ინჰიბიტორი (74,7 %), ფუნგიციდური (75 %), Caspase 8 სტიმულატორი (76,3 %), იმუნოსუპრესული (77,9 %), ანტიქოლესტერი-ნემული (81,9 %), დიურეზული (84,6 %), კარდიოტონური (85,7 %), ანტიკანცეროგენური (86,7 %), ანალეფსური (87,3

%), ანტინეოპლასტიკური (89 %), ქემოპრევენციული (90,9 %), ანტიპროტოზოური (95,2 %), ანტიპროლიფერაციული (95,9 %), ზოგად საანალგეზიო (97,4 %) და Caspase 3 სტიმულატორი (97,8 %). მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე მიზანშეწონილად მიგვაჩნია ექსტრაქტის გაღრმავებული შესწავლა, განსაკუთრებით სიმსივნის ქემოპრევენციის მიმართულებით

10. *D. ferruginea*-ს საქართველოში ფართოდ გავრცელება და მისი მდიდარი ქიმიური შედგენილობა, სხვადასხვა თვისებების მქონე ნივთიერებების ნედლეულად შეიძლება ჩაითვალოს

11. მიზანშეწონილება მოითხოვს გაგრძელდეს *D. ferruginea* სამედიცინო პრაქტიკაში გამოყენების საკითხი კარდიოტონული პრეპარატების მისაღებად.

12. მაგრამ *D. ferruginea* -ჟანგოვანა სათითურას შესწავლის და გამოყენების საკითხი ამით არ ამოიწურება, მოსალოდნელია კიდევ ახალი კომპონენტების აღმოჩენა და საინტერესო ბიოლოგიური აქტივობის დადგენა

3. დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული პუბლიკაციების ნუსხა

სტატიები:

1. A. Skhirtladze, T. Kopaliani, V. Nebieridze, E. Kemertelidze and M. Ganzera. New steroidal glycosides from pericarp of *Digitalis ferruginea*, Chemistry of natural compounds, 2017, 63(6), 1083-1087

2. თ. კოპალიანი, ვ. ნებიერიძე, ა. სხირტლაძე, ნ. საყვარელიძე, ე. ქემერტელიძე. მ. განცერა. ახალი ფენილეთანოიდი *Digitalis ferruginea* L.-დან. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის მაცნე, ქიმიის სერია, 2017, 43(2), 206-209

3. თ.კოპალიანი, ვ.ნებიერიძე, ა.სხირტლაძე, ე.ქემერტელიძე, მ.განცერა. ოლიგოსაქარიდი და კარდენოლიდები *Digitalis ferrugenea* L. პერიკარპიუმიდან. საქართველოს ქიმიური ჟურნალი, 2017, 17(1), *in press*

თეზისები:

1. თ. კოპალიანი, ვ. ნებიერიძე. *Digitalis ferrugenea* L. პერიკარპიუმის ფენილეთანოიდური გლიკოზიდები“ ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. 2017, 2-3 ნოემბერი, თბილისი.

2. T. Kopaliani, A. Skhirtladze, V. Nebieridze, E. Kemertelidze. M. Ganzera. Steroidal and cardiac glycosides from the pericarp of *Digitalis ferruginea* L. New and old phytochemicals: their role in ecology, veterinary and welfare, 2017, 17-20 September, Pescara, Italy

3. თ. კოპალიანი, ვ. ნებიერიძე, ნ. საყვარელიძე, ა. სხირტლაძე, მ. განცერა, ე. კემერტელიძე. Digitalis ferrugenea-ს პერიკარპიუმის ქიმიური შედგენილობის შესწავლისათვის. მესამე სამეცნიერო კონფერენცია „ბუნებრივი და სინთეზური ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები“, 2016, 24-25 ოქტომბერი, თბილისი.

St. Andrew the First-Called Georgian University of the Patriarchate of Georgia

On the rights of manuscript

School (Department) of Informatics, Mathematics and Natural Sciences

Educational Program - Chemistry of biologically active substances and medicinal expertise

Tamar Kopaliani

Study of chemical composition of the plant *Digitalis ferruginea*

Abstract

Of thesis on academic degree of Doctor of Natural Sciences

05 Sciences/natural sciences

Branch/specialty – 0503 chemistry

Tbilisi

2018

Scientific paper has been performed in TSMU Iovel Kutateladze Institute of Pharmacochemistry and Informatics, Mathematics and Natural Sciences of the St. Andrew the first-called Scientific University of the Georgian Patriarchate.

Scientific Supervisor: **Aleksandre Skhirtladze**
Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor

Official Opponents: **Nugzar Aleksidze**
Doctor of Biology, Professor

Mariam Benidze
Academic Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor

Defence of the thesis will be held on 2018 at" _____" ____ o'clock at St. Andrew the first-called Scientific University of the Georgian Patriarchate, School (Department) Informatics, Mathematics and Natural Sciences, at the meeting of dissertation committee of Schools (Departments)

Address: 0162, Tbilisi, № 53a Ilia Chavchavadze Ave., II Housing Assembly Hall. Ilia Vekua's auditory 104.
Dissertation text is available at St. Andrew the first-called Scientific University of the Georgian Patriarchate.

The abstract of the thesis is sent on "_____" 2018

Secretary of Dissertation Council,
Candidate of Technical Sciences, Proffesor

Temur Kiviladze

1. General characterization of the work

1.1. Relevance of the topic

Despite the greatest success of organic synthesis, natural substances, including those of vegetable origin, occupy a special place in the field of creation of medicinal drugs. Lately, the resistance (adaptability) of many diseases to antibiotics, sulfanilamide's and other synthetic drugs and their undesirable side effects have caused increased interest in herbal medicines worldwide.

The diverse flora of Georgia, where up to 4,600 species are described is an inexhaustible source of biologically active substances, offers a broad perspective for pharmacochemical research and provides great opportunities for creating medicinal drugs of different actions.

The represented work is devoted to study of one of the species of Digitalis, i.e. *Digitalis ferruginea* L. (which grows in Georgia), with the purpose of its further use.

Digitalis ferruginea L. Is the object of long-term research of the Institute of Pharmacochemistry, but studying the composition of this plant growing in Georgia gives a chance to reveal the new components.

1.2. The main purpose and objectives of the research

- The study of chemical composition of different parts of *Digitalis ferruginea L.* growing in our flora. Allocation of substances of different chemical classes from different parts of the plant, receiving their enriched fractions, separating them into individual components.

- studying of physical and chemical properties and determining of structures
- determining the possibility of using *Digitalis ferruginea* L. in practice and its usage.

1.3. Scientific novelty and the main results of the work

The ratio of the weight of different parts of *Digitalis ferruginea* L. growing in Georgia to the whole plant has been studied. It is established that the main part of the plant is the stem, then the leaf, pericarp, root and seeds.

Basic aglycones of cardenolides in the plant are: digitoxigenin, gitaloxigenin, gitoxigenin, digoxigenin. Among them digitoxigenin-derived glycosides are dominant and plant may be recommended for production of radical cardiac glycosides – digitoxin and acetyl-digitoxin.

9 steroid glycosides are isolated from the pericarp of *Digitalis ferruginea* L., including 6 known and 3 new organic substances, structures of which are established through classic physical-chemical methods and with the use of up-to-date spectral analyses – one- and two-dimensional NMR (^{1}H, ^{13}C, HSQC, HMBC, COSY) and mass-spectroscopy (ESI/MS).

Besides, there are isolated oligosaccharide, 2 cardenolides – digitalinum verum, neodigitalinum verum and 3 phenylethanoides, one of which is a new organic substance with following structure: 2-(3-methoxy,4-hydroxyphenyl)ethyl-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-O-[α-L-ramnopyranosyl-(1→6)]-[α-L-arabinopyranosyl-(1→2)]-4-*O-(E)*-feruloyl glucopyranoside, which was called **Ferrugoside A**.

There is recommended the method for obtaining the irreplaceable chemical reagent – steroidal saponin digitonin from the seeds of the plant growing in Georgia that will provide its production in pure form. This method may be used for production of expensive chemical reagent, pure – commercial digitonin from seeds of *Digitalis ferruginea* L. growing in Georgia.

With the use of PASS and ACD/I-Lab is carried out in silico test of alcohol extracts of leafs of *Digitalis ferruginea*. Expectable activity (with >70% probability) of the extract is identified and its LD_{50} is determined.

1.4 Theoretical and methodological basis of the research

Extractions of different parts of *Digitalis ferruginea L.* were performed by 80 % methanol.

The seeds from lipophilic substances were released with forextraction with petroleum ether.

For Thin Layer Chromatography (TLC) were used Silica gel plates (Silica gel 60 F 254, Merck). Column Chromatography (CC) were performed on: Diaion HP-20, Sephadex LH-20 and Silica gel (63/100 μm and 40/63 μm, Merck).

The universal system was found for TLC: chloroform-methanol-water (26:14:3).

Steroidal compounds were processed with the following reagents:

a) Sannie-Lapin reactive: 1% alcohol solution of vanillin, acetic anhydride and conc. Sulfuric acid mixture (12:1);
b) Matthews reagent: 0,5% solution of vanillin in ethanol with further sulfuric acid treatment;

c) Ehrlich reagent: 1,4-Para-dimethylaminobenzaldehyde 1% solution in ethanol and then conc. hydrochloric acid;

For disclosure of phenolic substances and namely for flavonoids by TLC:

a) CeSO4 2% solution with conc. sulfuric acid;
b) 1-5% solution of ironchloride

The melting points were determined on the *Electrothermal* 9100 Digital Melting Point and heating was made at a speed of 4°C/min.

Optical rotation was measured by the *Perkin-Elmer* 192 polarimeter.

Mass-spectra were taken on Amazon SL (Bruker) mass-spectrometer.

A NMR spectral analysis was carried out in *Avance II 600* MHz spectrometer CD_3OD.

Samples of analysis were dried in a vacuum-pistol with phosphoric acid anhydride at boiling temperature of toluene for 4-8 hours.

1.5 Practical meaning of the work

The method of extraction of irreplaceable chemical reagent digitonin from the seeds of *Digitalis ferruginea* growing in Georgia is offered. Its yield is 1.2 % and a plant can be used for production of this valuable irreplaceable reagent.

There is manifested the expected all-round specific pharmacological activity: proapoptotic (73,8 %), oxidoreductase inhibitor (74,7 %), fungicidal (75 %), Caspase 8 stimulative (76,3 %), immunosuppressive (77,9 %), anticholesteremic (81,9 %), diuretic (84,6 %), cardiotonic (85,7 %), anticarcinogenic (86,7 %), analeptic (87,3 %), antineoplastic (89 %), chemopreventive (90,9 %),

antiprotozoal (95,2 %), antiproliferative (95,9 %), general anesthetic (97,4 %) and Caspase 3 stimulative (97,8 %) actions. Proceeding from obtained results we deem expedient in-depth study of the extract, especially in regard with cancer chemoprevention.

Widespread occurrence of *Digitalis ferruginea* in Georgia and its rich chemical composition makes possible the use of this plant as an industrial raw material of substances with different properties.

1.6 The structure and volume of the work

The thesis includes: annotation (in Georgian and English languages), introduction, literary review; in the experimental part are described the objects and the methods of the research, results of the private research, their review, conclusions, one appendix; the list of the used literature where 139 sources are indicated. The work is illustrated with 28 tables, 48 pictures and 1 diagram. The volume of the work is 122 pages.

2. The basic content of the work

2.1 Object of research

Digitalis ferruginea collected in Georgia was used as the subject of research.

Digitalis ferruginea is perennial herbage plant with straight, simple stalk of 40-150 cm height and alternately disposed lance-shaped leafs of 15-30 cm length, frequently with rust stains and closely placed clustered flowers. It is widely spread in Mediterranean Sea area, Asia Minor, Balkan Peninsula and Caucasus. In Georgia it grows in Middle Kartli, Tianeti, Outer Kakheti, Meskhet-Javakheti, Achara, Abkhazia,

in alpine zone of Samachablo, mostly in open and shadowed beech and oak forests.

First significant research of *Digitalis ferruginea* was carried out by Stoll and Renz in 1952, who extracted lanatosides A, B and acetyldigitoxin-β from a plant growing in Turkey. M. Apple and O. Gilsrold obtained acetyldigoxin-α, digitoxin and steroid glycoside tigonin from raw leafs of the plant growing in USA. Ulabeler obtained lanatoside A, B, C, digitoxin, digoxin, gitoxin in the seeds of the plant collected in Turkey. Calcandi established the existence of lanatoside A, B, C, D, E, strospeside, verodoxin, acetyldigoxin-α in the plant cultivated in the Bucharest Botanical garden. Total quantity of glycosides in plants reaches 0.72%. It was shown that lanatoside A is a basic component of seeds of *Digitalis ferruginea*, and it also contains glucoevatromonoside, glucogitoroside and glucolanadoxin in considerable quantity. Total quantity of glycosides in the seeds equals to 0.40%. After comparative research of inofficial species Roda established that according to quantity of glycosides *Digitalis ferruginea* almost keeps pace with *D. purpurea*, and even excels it according to biological activity.

The issue of use of *Digitalis ferruginea* was initially solved in the Institute of Pharmacochemistry. In 30s of the past century the medicinal product was prepared, which was similar to preparation produced by Suisse company Hofman la Roche. It was called Digalen-neo and it satisfied the requirements of the whole Soviet Union.

2.2 Methods of Research

Steroid glycosides are collected in different organs of *Digitalis ferruginea L.* in different quantities and their capacity in the whole plant depends on the weight ratio of the vegetative parts. It became

necessary to determine the individual organs' weight ratio and the steroidal substances.

Observations have shown that the share of the weight ratio of individual organ to the whole plant in (%) is the following: stem (40.7%), followed by leaf (31.8%), pericarp (12.3%), root (11.7%) and seeds (3.3%) (Table 1).

At the next step of the research, we conducted preliminary analysis of the content of steroids in individual organs.

We were drawing off the 100 g of air-dried, crumbled raw materials by 80 % methanol for three times; distilling the alcohol from the mixed extract, cleaning the aqueous liquid by chloroform, thickening, drying and weighing it. The residue was passed through to the column of adsorbent Diaion HP 20. The column was washing sequentially with water, then with 50, 80 and 100 % of methanol; thickening, drying and weighing the eluats.

The quantitative analysis of 80% obtained sums steroids by spectrophotometric method was developed.

We were taking 5 g of individual organs for analysis, placing it in the flat bottomed flask of 100 ml volume, adding 50 ml ethanol, dipping the mixer stick in liquid, weighing the flask and placing on the magnetic stir bar for 1 hour after boiling. After finishing extraction, we were cooling the flasks up to the room temperature, weighing (in case of loss in mass, we were filling it with methanol) and filtering it.

We were transferring 10 ml of filtrate in the volumetric flask of 50 ml capacity and filling the volume up to the indent with methanol (solution "A"). We were transferring 5 ml of the solution "A" in the flask, adding 5 ml of 1% solution of Para-Dimethylaminobenzaldehyde (solution "B"). For control experiment, we were adding the solution "A" to 4 N hydrochloric acid (solution

“C”). We were placing the solutions “B” and “C” in ultra-thermostat on the temperature of 57-60 °C for 2 hours. After cooling, we were determining the optical density by spectrophotometer (Nano spec-2) at a wavelength of 518 nm.

We were calculating the content of furostanol glycosides on a cobalt chloride curve with the formula:

$$x = \frac{940{,}1 * 50 * \mathrm{m}}{\mathrm{m1} * \mathrm{K}(100 - \mathrm{w})}$$

where:

- 940.1- is the recalculation coefficient of furostanol glycoside to the concentration of cobalt chloride.
- 50 - incipience volume of the solution to be studied, ml.
- m - amount of cobalt chloride according to the calibration curve, g.
- m1 - mass of raw materials, g.
- K - correction factor on acid titer
- w – moisture.

It turned out that the amount of furostans in the cleaned amount of leaves is (%) - 65, in pericarp – 54, in stems – 16, in roots – 21 and in seeds – 46 (table 1).

Table 1

Organ of the plant	Mass share from the whole plant, %	The yield from the sum of steroid glycosides, %	Content of furostanol glycosides in the sum, %
Stem	40.7	1.19	16
Leaf	31.8	4.41	65
Pericarp	12.3	5.02	54
Root	11.7	4.54	21
Seeds	3.3	2.15	46

For the studying of sapogenines of the leaves of *D. ferruginea* we were conducting acid hydrolysis of 80% methanolic extract of leaves. 20 g extract were dissolving in 60 ml water, adding 40 ml of conc. HCl and 50 ml of benzene saturated with 50% methanol; boiling this on water bath for 3 hours. After cooling the mixture, we were separating the benzene layer, drawing off the aqueous mixture two times with 15-15 ml benzene. We were washing the united benzene decanted part with water until the neutral reaction, treating the layer of neutralized benzene with saturated solution of potassium hydroxide in methanol, washing the benzene layer again until the neutral reaction, dehydrating by anhydrous sodium sulfate and making thicker. We were obtaining the sum of steroidal sapogenines in amount of 0.95 g. It turned out that the main sapogenines in *D, ferruginea*'s pericarp are: diosgenin, tigogenin and hecogenin.

We were obtaining the pericarp of *D. ferruginea* enriched with various substances as follows: the 100 g of air-dried, powdered raw materials was extracted 3 times by 80 % methanol on boiling water bath for 2 hours. We were filtering the united extracts in Buchner funnel, thickening them in vacuum-rotational device until full removal of alcohol, cleaning off the remaining aqueous solution with chloroform, thickening the watery liquid and drying the residue in vacuum drying cabinet coexistence with phosphoric acid anhydride. Less polar substances are extracted by chloroform.

We were using a watery residue purified by chloroform as an object of studying chemical composition.

We were transferring the dried crude extract on the column of Diaion HP-20, performing elution with water, 50, 80 and 100 % of methanol. We were evaporating the derived fractions in vacuum-rotational device until full removal of alcohol, drying them in vacuum

drying cabinet. As a result we were receiving the sums of enriched fraction with polar substances and steroidal glycosides.

We continued separation 3 g of 50, 80 and 100% fractions on the column (5X100 cm) of Sephadex LH-20 by methanol. The rough separation of glycoside sums was achieved, which later we were conducting on different size of Silica gel columns (63/100; 40/63). We were performing elution with the system of: chloroform – methanol – water 26:14:3;

As a result, from the pericarp of *D. ferruginea* 9 steroidal glycosides, 2 cardenolides, 3 fenyletanoid and oligosaccharide have been isolated.

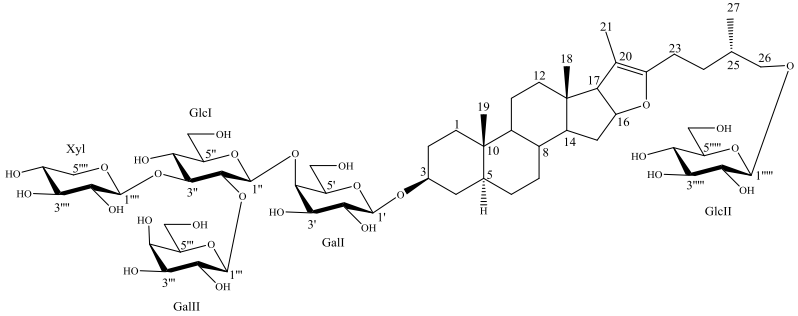
Complete chemical structures of each individual substance have been determined by physical and chemical indicators, by means of one and two-dimensional nuclear magnetic resonance (^{1}H, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC, COSY) and Mass spectroscopy.

2.3 Obtained results and their consideration

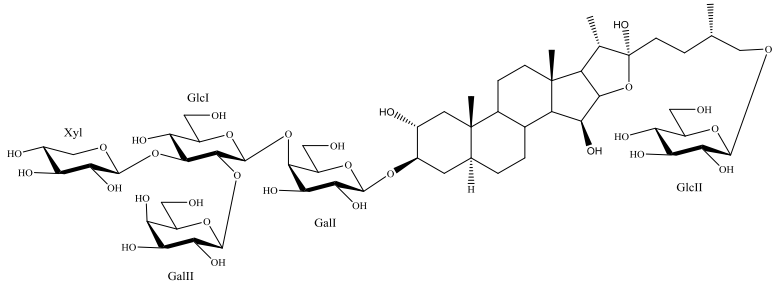
At the first stage of the research, we studied steroidal glycosides of individual organs of *D. ferruginea*. By separate and adsorption chromatography on different adsorbents, 9 furostanol glycosides produced by diosgenin, tigogenin, hecogenin are isolated from the leaves and are characterized: (25R)-5α-furost-20(22)-dien-3β,26-diol 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D- galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranosyl (compound 1); (25R)-5α-furost-2α,3β,15β,22α,26-pentaoil 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranoside (compound 2); (25R)-5α-spirostan-2α,3β-diol 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-

glucopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside (compound 3); (25R)-5α-furost-20(22)-dien-2α,3β,26-triol 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D- glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranoside; (25R)-5α-furostan-2α,3β,22α, 26-tetraoil 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranoside; (25R)-5α-spirostan-2α,3β-diol 3-O-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside; desglucodigitonin; digitonin; capsicoside B_1.

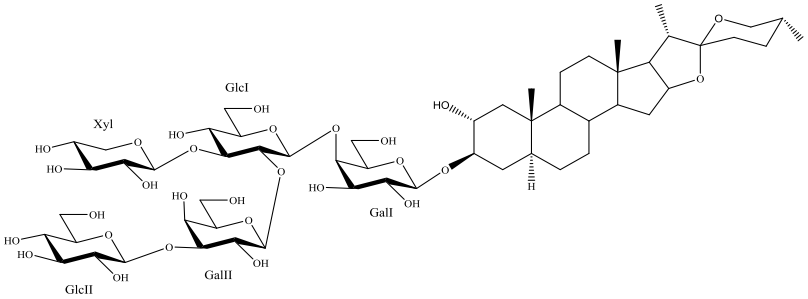
Between them 1, 2 and 3 are new organic substances.



Compound 1

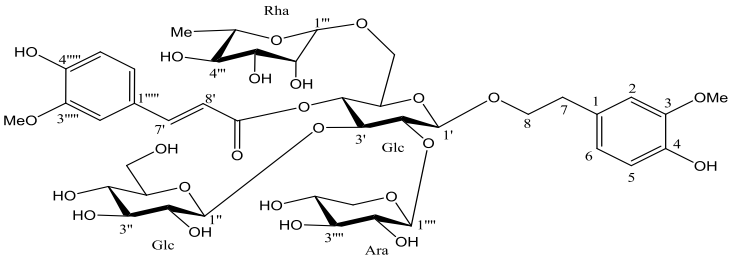


Compound 2



Compound 2

The oligosaccharide is separated from the pericarp of *Digitalis ferruginea*, this structure is β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-3-O-acetyl-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-canaropyranosyl-(1→4)-O-β-D-canaropyranoside; two cardenolides; 3β,14β,16β-trihydroxy-5β-card-20(22)-enolide 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitalopyranoside - digitalinum verum and 3β, 14β,16β-trihydroxy-5β-card-20(22)-enolide 3-O-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-digitalopyranoside - neodigitalinum verum. Three phenyletanoids are isolated; maxoside, purpureaside E and 2-(3-methoxy, 4-hydroxyphenyl) ethyl O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-O-[α-L-ramnopyranosyl-(1→6)]-[α-L-arabinopyranosyl-(1→2)]-4-O-(*E*)-feruloyl-β-D-glucopyranoside, which was called **ferrugoside A.**



Ferrugoside A

2.4 Practical Application Use of the Work

Digitonin represents steroidal glycoside – one of the most important classes of natural compounds. It consists of sapogenin digitogenin and 5 molecules of monosaccharides – 2 glucoses, 2 galactoses and one xylose.

Digitogenin is an irreplaceable chemical reagent. It forms insoluble solid complex compound, so-called "digitoside" with cholesterin (cholesterol) and some other natural substances; at the same time it is characterized by unique stereospecify – it unites with 3β oxysteroids, and doesn't form a complex with 3α epimers. This property of digitonin is used for division of mixture of antipode substances. Digitonin is widely used for qualitative and quantitative analysis, getting and study of vegetable and animal steroids and a series of other natural substances, and as a detergent for solubilization and modification of the cell membranes.

Demand for digitonin is substantially increased along with development of biochemical researches.

The only source of digitonin is represented by the seeds of plant *Digitalis*, in particular *Digitalis purpurea* – purple foxglove and *D. lanata* – woolly foxglove.

There are several methods of digitonin receipt from a plant, which are basically based on complex formation with cholesterol, afterwards its decay proceeded by its heating with pyridine and repeated cleaning. Existing methods are multi-stage and technically labor-consuming. They are related to heavy expenditures of solvents, reagents along with relatively low yield of the end product.

Digitonin cost is high and at the world market the price of 1 gram is 250-500 USD.

E. Kemertelidze from the Institute of Pharmacochemistry elaborated the simplified method of digitonin receipt, which was recognized as invention and USSR authorship certificate was issued; the method is patented in England, Germany and Switzerland. However, the receipt of digitonin from seeds of *Digitalis ferruginea* (rusty foxglove) is complicated. Chlorophyll is accumulated in large quantities in its seeds and the end product is of green color.

In order to solve this problem we made adjustment in the method of digitonin receipt that lies in the following.

Refined seeds of milled rusty foxglove pericarp collected in Georgia, in the vicinity of Bakuriani settlement were placed in the Soxhlet-type apparatus and squeezed by chloroform up to discoloration of the extract. During this process occurs the squeezing (extraction) of chlorophyll and fatty oil by chloroform, yield of which is 30%.

Seeds cleaned from lipophilic substances were placed in extractor, then 4-5 times more quantities of 80% ethyl (or methyl) alcohol were added and the mixture was heated at water bath up to boiling temperature of the solvent for 1 hour. Extraction was repeated two more times. United extracts were centrifuged and left at room temperature. Afterwards the process was continued using improved method (E. Kemertelidze).

Thus, we get digitonin as a white-colored powder with melting temperature 248-250°C, $[\alpha]^{20}_{D}$-49°C (C – 1,10; acetic acid) in quantity of 1.2%, which corresponds to pure commercial product according its properties.

Using PASS and ACD/I-Lab there was established expected all-round pharmacological activity of *D. ferruginea* leaves extract: proapoptotic (73,8 %), oxidoreductase inhibitor (74,7 %), fungicidal (75 %), Caspase 8 stimulative (76,3 %), immunosuppressive (77,9 %),

anticholesteremic (81,9 %), diuretic (84,6 %), cardiotonic (85,7 %), anticarcinogenic (86,7 %), analeptic (87,3 %), antineoplastic (89 %), chemopreventive (90,9 %), antiprotozoal (95,2 %), antiproliferative (95,9 %), general anesthetic (97,4 %) and Caspase 3 stimulative (97,8 %) actions. Proceeding from obtained results we deem expedient in-depth study of the extract, especially in regard with cancer chemoprevention.

2.5 Conclusions

1. Basic part of separate organs of *Digitalis ferruginea* – rusty foxglove growing in Georgia are: stem 40.7 %, leaf 31.8 %, pericarp 12.3 %, root 11.7 % and finally, seeds 3.3 %. Pericarp is the richest with steroid substances.

2. All kinds of aglycons: digitoxigenin, gitoxigenin, diginatigenin and digoxigenin-derived cardenolides are manifested in *D. ferruginea* – rusty foxglove. Basic cardenolides consist of digitoxigenin-derived glycosides that may be considered as the source of production of cardiac glycosides – digitoxin and acetyldigitoxin.

3. 9 steroid glycosides are extracted from the pericarp of *D. ferruginea* including 6 known and 3 new organic compounds:
   - (25R)-5α-furost-20(22)-dien-3β,26-diol 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranosyl;

- (25R)-5α-furost-2α,3β,15β,22α,26-pentaoil 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranoside;
- (25R)-5α-spirostan-2α,3β-diol 3-O-β-D- xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside;
- (25R)-5α-furost-20(22)-dien-2α,3β,26-triol 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranoside;
- (25R)-5α-furostan-2α,3β,22α,26-tetraoil 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-O-β-D-galactopyranosyl 26-O-β-D-glucopyranoside;
- (25R)-5α-spirostan-2α,3β-diol 3-O-D-xylopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside;
- desglucodigitonin;
- digitonin;
- capsicoside B_1.

4. From the pericarp of *D. ferruginea* is separated oligosaccharide β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-3-O-acetyl-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitoxopyranosyl-(1→4)-O-β-D-canaropyranosyl-(1→4)-O-β-D-canaropyranoside.
5. Three phenyletanoids are isolated; maxoside, purpureaside E and 2-(3-methoxy, 4-hydroxyphenyl) ethyl O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-O-[α-L-ramnopyranosyl-(1→6)]-[α-L-arabinopyranosyl-(1→2)]-4-O-(*E*)-feruloyl-β-D-glucopyranoside, which was called **ferrugoside A.**

6. Two cardenolids are isolated from the periqarpium of *D. ferruginea*, their structures are: 3β,14β,16β-trihydroxy-5β-card-20(22)-enolide 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-digitalopy-ranoside - digitalinum verum and 3β, 14β,16β-trihydroxy-5β-card-20(22)-enolide 3-O-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-digitalopyra-noside - neodigitalinum verum.

7. The structures of isolated compounds are established through to classic physical-chemical methods and with the use of up-to-date spectral analyses – one- and two-dimensional NMR (1H, 13C, HSQC, HMBC, COSY) and mass-spectroscopy (ESI/MS).

8. The method of extraction of irreplaceable chemical reagent, commercial digitonin from seeds of *Digitalis ferruginea* growing in Georgia is offered; its yield equals to 1.2% and may be used for production of this valuable irreplaceable reagent.

9. There was established expected all-round pharmacological activity of *D. ferruginea* leaves extract: proapoptotic (73,8 %), oxidoreductase inhibitor (74,7 %), fungicidal (75 %), Caspase 8 stimulative (76,3 %), immunosuppressive (77,9 %), anticholesteremic (81,9 %), diuretic (84,6 %), cardiotonic (85,7 %), anticarcinogenic (86,7 %), analeptic (87,3 %), antineoplastic (89 %), chemopreventive (90,9 %), antiprotozoal (95,2 %), antiproliferative (95,9 %), general anesthetic (97,4 %) and Caspase 3 stimulative (97,8 %) actions. Proceeding from obtained results we deem expedient in-depth study of the extract, especially in regard with cancer chemoprevention.

10. Wide extention of *Digitalis ferruginea* in Georgia and its rich chemical composition makes it an industrial raw material for getting the substances with different properties.

11. The practicability requires to further study the issue of use of *Digitalis ferruginea* in medical practice for production irreplaceable cardiotonic medicals.

12. Anyway, the issue of study and use of *Digitalis ferruginea* – rusty foxglove doesn't go beyond, and discovery of another new components and establishment of interesting biological activities is expected.

3. List of publications related to the dissertation topic

Articles:

1. A. Skhirtladze, T. Kopaliani, V. Nebieridze, E. Kemertelidze and M. Ganzera. New steroidal glycosides from pericarp of *Digitalis ferruginea*, Chemistry of natural compounds, 2017, 63(6), 1083-1087

2. თ. კოპალიანი, ვ. ნებიერიძე, ა. სხირტლაძე, ნ. საყვარელიძე, ე. ქემერტელიძე. მ. განცერა. ახალი ფენილეთანოიდი *Digitalis ferruginea* L.-დან. საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის მაცნე, ქიმიის სერია, 2017, 43(2), 206-209

3. თ.კოპალიანი, ვ.ნებიერიძე, ა.სხირტლაძე, ე.ქემერტელიძე, მ.განცერა. ოლიგოსაქარიდი და კარდენოლიდები *Digitalis ferrugenea* L. პერიკარპიუმიდან. საქართველოს ქიმიური ჟურნალი, 2017, 17(1), *in press*

თეზისები:

1. თ. კოპალიანი, ვ. ნებიერიძე. *Digitalis ferrugenea* L. პერიკარპიუმის ფენილეთანოიდური გლიკოზიდები“ ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია. 2017, 2-3 ნოემბერი, თბილისი.
2. T. Kopaliani, A. Skhirtladze, V. Nebieridze, E. Kemertelidze. M. Ganzera. Steroidal and cardiac glycosides from the pericarp of *Digitalis ferruginea* L. New and old phytochemicals: their role in ecology, veterinary and welfare, 2017, 17-20 September, Pescara, Italy
3. თ. კოპალიანი, ვ. ნებიერიძე, ნ. საყვარელიძე, ა. სხირტლაძე, მ. განცერა, ე. კემერტელიძე. Digitalis ferrugenea-ს პერიკარპიუმის ქიმიური შედგენილობის შესწავლისათვის. მესამე სამეცნიერო კონფერენცია „ბუნებრივი და სინთეზური ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები“, 2016, 24-25 ოქტომბერი, თბილისი.