



**Институт по биоразнообразие и екосистемни
изследвания при Българска Академия на Науките**

Румен Велинов Денев

GC-MS анализ на силирани амарилисови алкалоиди

Автореферат

за придобиване на образователна и научна степен
„Доктор”

Научна специалност: 01.06.03 “Ботаника”

Научен ръководител: проф. д-р Страхил Берков

София, 2026

Дисертационният труд е разработен в рамките на редовна докторантура в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на Научния колегиум на отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси” при Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, състояло се на 29.04.2026 г.

Дисертационният труд, с общ обем от 142 страници, е представен под формата на 3 скрепени публикации и съдържа общо 8 схеми, 10 таблици и 18 фигури, както и приложение от 40 страници с допълнителни материали към публикациите.

Списъкът на цитираната литература съдържа 73 заглавия на латиница. Цитираната литература в публикациите е представена в оригиналния си вид.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на г. от часа в, на открито заседание на петчленно Научно жури в състав:

проф. д-р Марина Станилова, ИБЕИ-БАН

доц. д-р Иванка Семерджиева, ИБЕИ-БАН

доц. д-р Анна Гаврилова, МУ-Плевен

доц. д-р Цветелина Дончева, ИОХЦФ-БАН

доц. д-р Ивайла Димчева, Агробιοинститут.

Съдържание

1. Увод	4
2. Литературен обзор	4
2.1 Сем. Amaryllidaceae, подсем. Amaryllidoideae	4
2.2 Биосинтез на амарилисови алкалоиди	5
2.3 Хематоксономично значение на амарилисовите алкалоиди	5
2.4 Класификация и химично разнообразие на амарилисовите алкалоиди	6
2.5 Биологична активност на амарилисовите алкалоиди	6
2.6 Методи за анализ на амарилисови растения	7
2.6.1 Пробоподготовка: екстракция на АА от растителни проби	7
2.6.2 Инструментален анализ	7
2.7 GC-MS на амарилисови алкалоиди	7
3. Цел и задачи	8
4. Материали и методи	9
5. Резултати	10
5.1 GC-MS анализ на алкалоиди от <i>Narcissus</i> cv. Hawera (Публикация 1)	10
5.2 GC-MS на хемантаминов и крининов тип алкалоиди (Публикация 2)	13
5.3 GC-MS количествено определяне на галантамин в <i>Hippeastrum papilio</i> (Ravena) Van Sheepen (Публикация 3)	16
6. Заключение	20
6.1 Основни изводи	20
7. Приноси	22
8. Използвана литература	23
8. Списък на научните публикации с пълно библиографско описание и участия в научни форуми	24

1. Увод

Растенията от подсемейство Amaryllidoideae (сем. Amaryllidaceae) се характеризират с биосинтеза на амарилисови алкалоиди (АА) - азотсъдържащи съединения с разнообразна структура и значителна биологична активност, включително инхибиране на ацетилхолинестеразата, антитуморен, антивирусен и противовъзпалителен ефект.

Надеждната идентификация и количествено определяне на амарилисовите алкалоиди в растителни проби имат съществено значение за различни биотехнологични изследвания и за осигуряване на качествен контрол на растителните суровини във фармацевтичната практика. В тази връзка са разработени и прилагани разнообразни аналитични методи за разделяне и анализ на алкалоидни смеси, включително тънкослойна хроматография (TLC), високоефективна течна хроматография (HPLC), капилярна електрофореза (CE) и газова хроматография (GC).

Мас-спектрометрията играе ключова роля при идентификацията на алкалоидите, като GC-EIMS предлага съществени предимства, свързани с получаването на възпроизводими спектри и възможността за използване на спектрални библиотеки. Ограниченията на метода са свързани с анализа на термолабилни, полярни и нелетливи съединения и соли. Известно е, че част от амарилисовите алкалоиди (напр. хемантамин и хемантидин) проявяват термолабилност и ниска чувствителност при директен GC-EIMS анализ, което може да бъде преодоляно чрез дериватизация, в частност силиране.

2. Литературен обзор

2.1 Сем. Amaryllidaceae, подсем. Amaryllidoideae

Семейство Amaryllidaceae включва около 90 рода и 1700–1800 вида и въз основа на молекулярно-филогенетични данни, се разделя на три подсемейства: Allidoideae, Agapanthoideae и Amaryllidoideae. Последното обхваща приблизително 59 рода с около 800 вида и представлява космополитна група многогодишни тревисти растения с основни центрове на разнообразие в Южна Африка, Южна Америка и Средиземноморието [1,2].

Растенията са предимно луковични геофити с характерни едри и декоративни двуполови цветове, което обуславя тяхното широко приложение в декоративното градинарство. Филогенетичните данни сочат като място на произход за подсем.

Amaryllidoideae, Южна Африка преди около 50 млн. години и последващо разпространение в глобален мащаб, като съвременната класификация включва 13 триба, групирани в няколко основни клада [3].

Въпреки значителното им таксономично разнообразие, по-малко от половината представители на подсемейството са изследвани по отношение на алкалоидния си състав и биологична активност, което подчертава необходимостта от задълбочени фитохимични проучвания.

2.2 Биосинтез на амарилисови алкалоиди

Амарилисовите алкалоиди се характеризират с голямо структурно разнообразие и значителна биологична активност, като същевременно имат важно хемотаксономично значение. Основен прекурсор в тяхната биосинтеза е 4'-О-метилнорбеладин, образуван чрез кондензация на тирамин и 3,4-дихидроксibenзалдеhid, произхождащи съответно от L-тирозин чрез фенилпропаноидния път [2,4].

Ключова стъпка в биосинтезата е фенол-фенолното окислително свързване на 4'-О-метилнорбеладин, катализирано от ензими от семейството CYP96T, което води до формиране на основните структурни типове алкалоиди (галантаминов, ликоринов и хемантаминов). Последващи реакции като окисление, метилиране и структурни преобразувания обуславят крайното структурно разнообразие [5].

Биосинтезата протича главно в луковиците и младите листа, и се регулира от екологични фактори (светлина, температура, воден режим и др.), хранителен статус и стресови въздействия [6]. Тези фактори оказват съществено влияние върху количеството и профила на алкалоидите, което подчертава тяхната адаптивна и защитна роля в растенията.

2.3 Хематаксономично значение на амарилисовите алкалоиди

Амарилисовите алкалоиди имат съществено еволюционно и хемотаксономично значение, тъй като се срещат специфично в подсем. Amaryllidoideae и отразяват адаптивните механизми за защита. Те изпълняват важна роля като химична бариера срещу фитофаги и патогени, което е от значение за еволюцията на геофитните видове [7].

Геномните изследвания показват, че ключовите ензими в биосинтезата им са резултат от генни дупликации и функционална дивергенция, което обуславя голямото

структурно разнообразие на алкалоидите. Характерният алкалоиден профил на отделните видове и родове служи като надежден хемотаксономичен маркер, допълващ морфологичните и молекулярните данни и подпомагащ изясняването на филогенетичните връзки в рамките на подсемейството [8].

2.4 Класификация и химично разнообразие на амарилисовите алкалоиди

Амарилисовите алкалоиди се класифицират основно според типа на пръстенната си система. Първоначално са обособени девет основни структурни типа, а съвременните данни разширяват тази класификация до над 40 типа въз основа на значителното химично разнообразие. Най-разпространени са алкалоидите от ликоринов, хемантаминов, хомиликоринов и крининов тип. Описани са и различни производни, включително гликозилирани и димерни съединения, както и ограничен брой изомери, считани за артефакти. Броят на известните амарилисови алкалоиди непрекъснато расте, което подчертава динамичното развитие на познанията за тяхното химично разнообразие и необходимостта от по-нататъшни изследвания [9].

2.5 Биологична активност на амарилисовите алкалоиди

Изследванията на амарилисовите алкалоиди са от огромен интерес поради широкия им спектър от биологични активности. Галантаминът е един от най-изследваните представители и се прилага като инхибитор на ацетилхолинестеразата при лечение на болестта на Алцхаймер.

Други алкалоиди, като ликорин, имат ярко изразена противотуморна и антивирусна активност, но също така показват потенциална токсичност, което изисква внимателна оценка между полза и риск при използването му като лекарство. Съединения като нарциклазин, хемантамин и панкреацин демонстрират селективна цитотоксичност спрямо различни туморни клетки, докато хомиликориновият тип алкалоиди проявяват невропротективни и антиоксидантни свойства. Също така, редица амарилисови алкалоиди притежават антимикробна и противогъбична активност. Съвременните изследвания показват, че те въздействат върху ключови клетъчни процеси като апоптоза, оксидативен стрес и клетъчна сигнализация, което ги определя като перспективни молекули за разработване на нови терапевтични средства [10].

2.6 Методи за анализ на амарилисови растения

2.6.1 Пробоподготовка: екстракция на АА от растителни проби

Анализът на амарилисовите алкалоиди започва с подходяща пробоподготовка, включваща сушене и хомогенизиране на растителния материал, последвани от екстракция на алкалоидната фракция. Сушенето се извършва при контролирани условия или чрез лиофилизация в зависимост от целите на изследването. Екстракцията се осъществява по два основни начина – извличане на алкалоидите като соли в кисела водна среда или като свободни бази в органични разтворители при алкални условия. И в двата случая се прилага последващо фракциониране чрез органични разтворители и отстраняване на примеси чрез промяна на рН. Получената суха алкалоидна фракция е подходяща за инструментален анализ (GC–MS, HPLC), като при метаболитно профилиране може да се приложи допълнително фракциониране и дериватизация преди анализа [11,12].

2.6.2 Инструментален анализ

За качествен и количествен анализ на амарилисови алкалоиди се прилагат различни аналитични техники, включително TLC, NMR, HPLC, CE-MS и GC-MS. Тънкослойната хроматография се използва широко за бърз скрининг и контрол на разделянето, въпреки ограниченията си по отношение на чувствителност и възпроизводимост. NMR спектроскопията е основен метод за структурно охарактеризиране и количествен анализ, но приложението му е ограничено от по-ниска чувствителност и скъпа апаратура. В практиката, най-често се използват HPLC и GC-MS поради тяхната достъпност и висока аналитична ефективност. Използването на масспектрометрични детектори значително улеснява идентификацията, но при LC-MS съществуват ограничения, свързани с липсата на унифицирани спектрални библиотеки и трудности при разграничаване на отделните изомери. От друга страна, GC–EIMS предоставя възпроизводими спектри с висока структурна информативност, но е ограничен за анализ на полярни и термолабилни съединения, при които LC-MS има предимство [11].

2.7 GC-MS на амарилисови алкалоиди

Газовата хроматография, съчетана с мас-спектрометрия (GC–MS), е широко използван метод за качествен анализ на амарилисови алкалоиди, осигуряващ ефективно

разделяне и надеждна идентификация чрез възпроизводими EIMS масспектри и индекси на задържане. Методът намира приложение при изследване на биосинтеза, хемотаксономията и при търсене на нови природни съединения [13,14].

Основните ограничения при GC–MS, са свързани с анализа на полярни и термолабилни алкалоиди, както и възможното образуване на артефакти при пробоподготовката. Дериватизацията чрез силиране (напр. с BSTFA или MSTFA) подобрява летливостта и термичната стабилност на съединенията, което води до повишена чувствителност и разширяване на възможностите за анализ. Въпреки това, GC–MS остава ключов метод за изследване на амарилисови алкалоиди, като оптимизацията на пробоподготовката и дериватизацията значително повишават аналитичната му приложимост [15].

3. Цел и задачи

3.1 Цел

Цел на дисертационния труд е проучване на GC-MS характеристиките (разделяне, стабилност, летливост и фрагментация) и възможностите за качествен и количествен анализ на силирани в сравнение с несилирани амарилисови алкалоиди в растителни проби от *Narcissus poeticus* L., *Narcissus* cv. Hawera, *Galanthus nivalis* L. и *Hippeastrum papilio* Van Scheepen. Постигането на тази цел позволява да се направи оценка на приложимостта на силирането като подход за разширяване на обхвата и повишаване на ефективността на GC-MS при анализа на амарилисови алкалоиди.

3.2 Задачи

За постигане на поставената научна цел са поставени следните задачи:

1. Създаване на библиотека от EIMS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди, включващо паралелен GC-MS анализ на несилирани и силирани стандартни вещества и алкалоидни фракции от различни растителни видове *Narcissus poeticus* L., *Narcissus* cv. Hawera, *Galanthus nivalis* L. и *Hippeastrum papilio* Van Scheepen.

2. Сравнително проучване и характеризиране на разделянето, стабилността, летливостта и фрагментационните пътища на силирани и несилирани амарилисови алкалоиди.
3. Сравнителен количествен анализ на силирани и несилирани алкалоиди в растителни проби с цел оценка на приложимостта на силирането при анализ на АА.

4. Материали и методи

4.1 Растителен материал

Растителен материал от *Narcissus* cv. Hawera и *Hippeastrum papilio* (Ravena) Van Scheepen бе предоставен от Holland Biodiversity BV, Лисе, Нидерландия. Растителен материал от *Galanthus nivalis* L. и *Narcissus poeticus* L. бе събран през пролетта на 2023 г. в природата и от градини в България. Видовете бяха идентифицирани от д-р Боряна Сиджимова (ИБЕИ–БАН).

4.2 Стандартни вещества

Използвани са 34 стандартни алкалоида от хемантаминов и крининов тип, както и такива от галантаминов, ликоринов и хомоликоринов тип, предварително изолирани от представители на подсем. Amaryllidoideae от Групата по природни продукти на Университета в Барселона и структурно охарактеризирани чрез 1D/2D NMR, CD, EIMS и HRMS. За количествения анализ (Публикация 3) е използван галантамин хидробромид (Sofarma AG, България); кодеинът е прибавен като вътрешен стандарт.

4.3 Екстракция на алкалоиди

Екстракцията на алкалоидите е направена от сух растителен материал като е приложен стандартен киселинно-основен протокол: мацерация с метанол (1:5, m/v, 24 h), изпаряване, разтваряне в 2% H₂SO₄, отстраняване на неутрални компоненти с органичен разтворител (EtOAc / хлороформ / n-хексан), алкализиране (pH 8–9, 10% NH₃) и тройна екстракция с органичен разтворител. Ликоринът е кристализиран от хлороформната фракция в метанол при 4°C.

За Публикация 3 - оптимизирана водна екстракция с 0.072% HCl (pH 1.95) при 50°C, 2 h, с периодично ултразвуково облъчване (15 min/h). Тествани са 0.072%, 0.18%, 0.36% и 0.72% HCl, дестилирана вода и метанол. Допълнително – водна екстракция под налягане (10 bar, 80°C) за индустриален мащаб.

4.4 Дериватизация (силиране)

Около 5 мг от сухите остатъци се разтварят в 100 µl пиридин, добавят се 100 µl BSTFA (*N,O*-бис(триметилсилил)трифлуороацетамид, Sigma-Aldrich). Следва нагряване при 70–80°C за 2–3 h. За Публикация 2 - 50 µl BSTFA в 50 µl пиридин, 60°C, 90 min. След охлаждане - разреждане с 300 µl хлороформ.

4.5 GC-MS условия

Аналитични инструменти: Thermo Scientific Focus GC / DSQ II масспектрометър (EI, 70 eV, 230°C йонен източник); допълнително Agilent 6890+/5975 MSD (Публикация 2). Капилярна колона DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). Температурна програма: (1) 100°C→180°C при 15°C/min, 180°C→300°C при 5°C/min, задържане 10 min; (2) 100°C→300°C при 20°C/min, задържане 5 min (Публикация 3). Инжектор 250°C; хелий 0.8 mL/min; split 1:10; инжекция 1 µl. Сканиране *m/z* 40–600 (TIC) и SIM за количествен анализ. RI по *n*-въглеводороди C9–C36. Деконволюция: AMDIS 2.64 (NIST).

4.6 Валидиране (Публикация 3, съгл. ICH)

Определени са: специфичност, селективност, линейност (10 калибрационни нива, 3 повт.), LLOQ, LLOD (SIM), прецизност (RSD), точност (% Recovery при 10%, 50%, 100% добавка), стабилност и матричен ефект (МФ). Статистическа обработка: ANOVA с тест на Tukey.

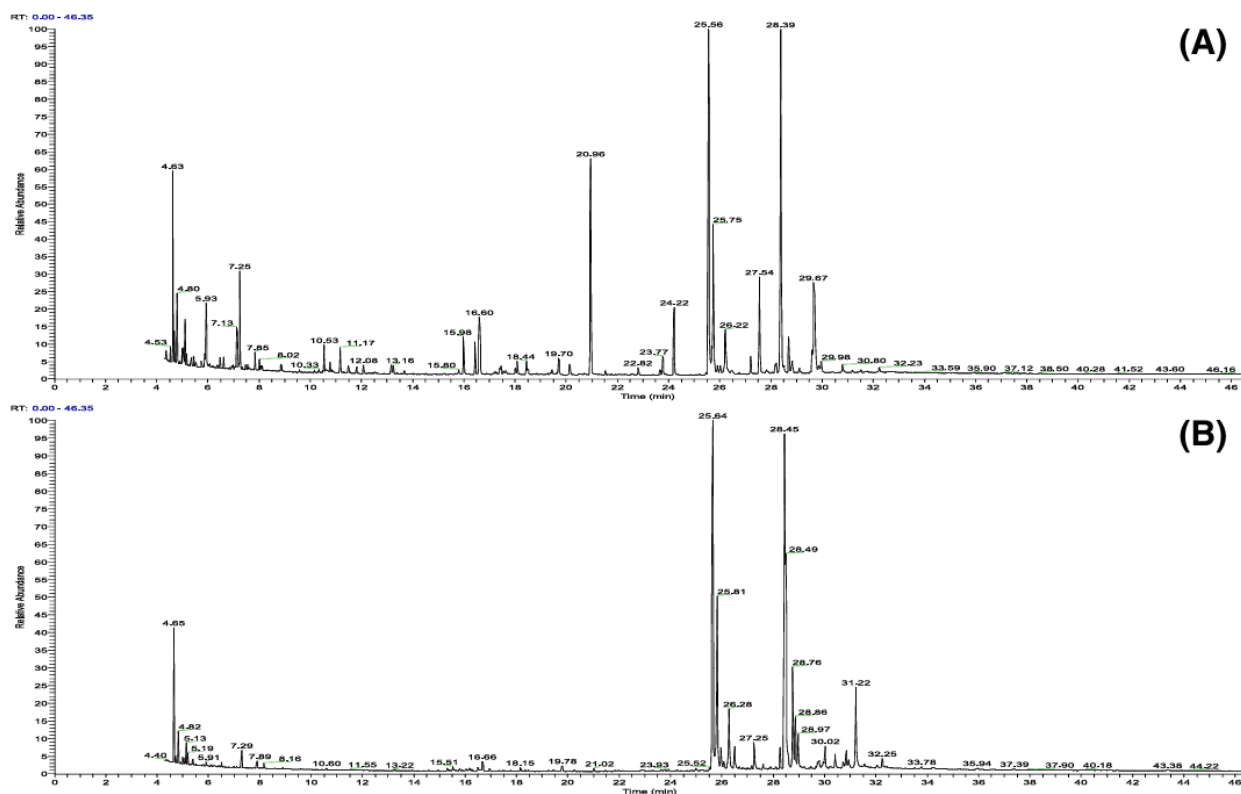
5. Резултати

5.1 GC-MS анализ на алкалоиди от *Narcissus* cv. *Hawera* (Публикация 1)

В алкалоидните фракции от *Narcissus* cv. *Hawera* са идентифицирани общо 29 алкалоида: 15 типични (галантаминов, хемантаминов, ликоринов, претазетинов тип) и 13 от тип *Sceletium*, включително две нови съединения.

Сравнителният анализ на силирани и несилирани проби показва, че силирането значително подобрява качеството на GC-MS анализа чрез повишаване на летливостта и стабилността на алкалоидите. При редица съединения се наблюдава подобряване на формата на хроматографските пикове и увеличаване на чувствителността на детекция. Това позволява надеждно разделяне на структурно близки съединения (епимери), както и откриване на минорни компоненти в сложни растителни смеси. Особено показателно е разделянето на 6-епи-мезембранол и мезембрин, които в несилирани проби коелуират, докато след силиране се разделят ясно по индексите на задържане.

Оптимална чистота на алкалоидната фракция е постигната при фракциониране с хлороформ (0.29% СТ добив, 80.7% алкалоиди в ТИС след силиране). Фракцията с EtOAc съдържа 58.2% неалкалоидни компоненти (захариди, органични киселини, мастни киселини) - видими само след силиране (Фигура 1).



Фигура 1. GC-MS хроматограми на силирани фракции от *Narcissus* cv. Hawera: EtOAc фракция (58.2% неалкалоидни компоненти) и оптималната CHCl₃ фракция.

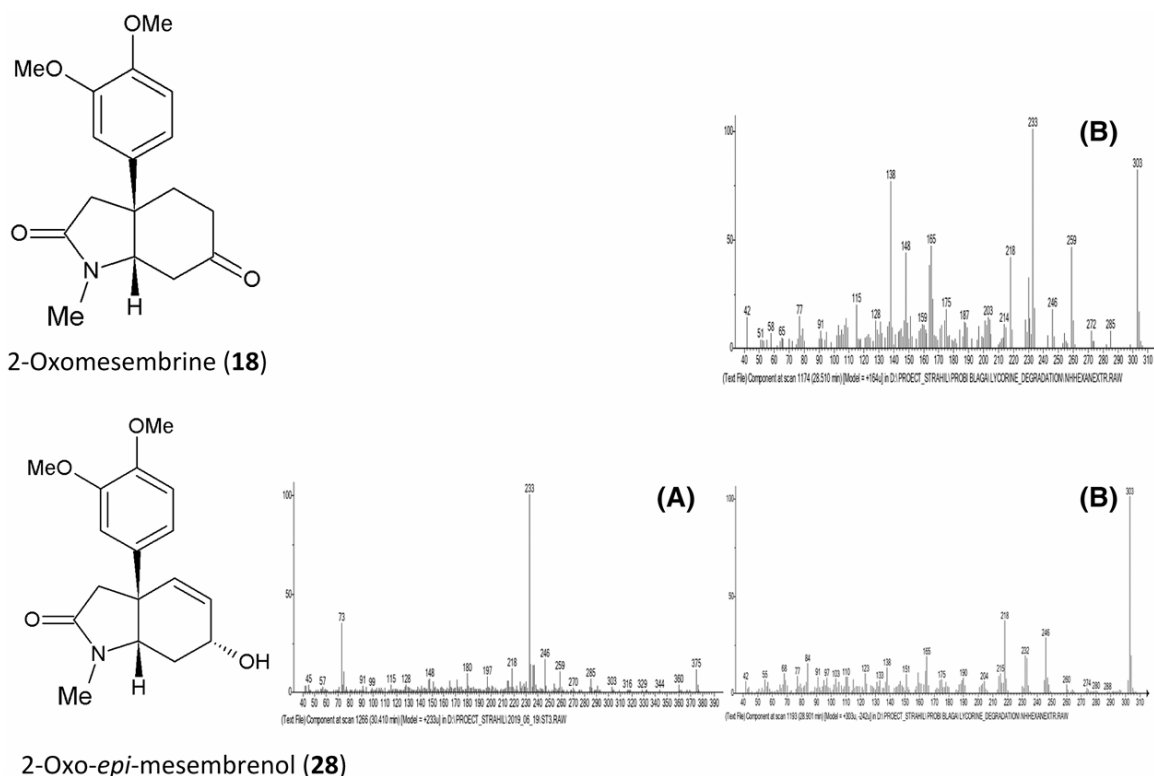
Силирането значително подобрява разделянето и чувствителността. Хемантидин и епи-хемантидин се детектират само в силирани проби (RI 2619 и 2614 съответно) - в несилирани показват широки, неправилни пикове с ниска интензивност поради термолабилност при C11-OH. Разделянето на 6-епи-мезембранол (4, RI 2332) от мезембрин (7, RI 2357) се получава в силирани проби. В несилирани, те коелуират при RI ~2352–2357. Ликорин и 2-оксо-епи-мезембренол също се разделят по-добре след силиране (14 RI разлика). Тези резултати показват, че силирането разширява приложимостта за анализ на термолабилни амарилисови алкалоиди, които не могат да бъдат надеждно изследвани чрез директен GC-MS анализ (Табл. 1).

Таблица 1. GC-MS данни на несилирани и TMS производни от *Narcissus* cv. *Hawera*
(% от TIC алкалоиди; * нови алкалоиди)

Алкалоид	RI (недерив.)	RI (TMS)	Метанол %	CHCl ₃ %	CHCl ₃ TMS %	EtOAc %	n-хекс %	MZM %
6-епи-Мезембранол	2352	2332	—	23.3	28.7	25.3	26.9	40.8
6- епи -Мезембренол	2317	2344	—	13.5	14.2	29.2	10.8	16.2
Мезембрин	2357	—	0.5	1.3	1.8	0.4	1.2	3.3
Мезембренол	2375	—	4.6	5.3	6.7	4.4	5.3	9.8
Галантамин	2394	2445	2.1	—	1.9	1.5	1.9	3.2
Сангвинин	2429	2466	8.4	—	0.3	11.8	0.3	13.8
Ликорин	2752	2524	41.5	36.1	28.3	32.2	28.9	0.5
Хемантамин	2630	2548	2.7	—	6.5	—	2.9	4.8
Хемантидин	—	2619	4.8	—	0.2	5.3	0.2	2.6
епи -Хемантидин	—	2614	0.6	—	0.1	1.1	0.1	—
2-Оксо-мезембрин *	2670	—	—	Tr	—	—	—	—
2-Оксо- епи- мезембренол*	2745	2738	0.3	Tr	6.1	0.2	6.1	0.3

Tr = следи (<0.1%); MZM = ликорин-свободна фракция

Две нови съединения са идентифицирани въз основа на характерни фрагментационни схеми: 2-оксо-мезембрин (18) - базов йон m/z 233 ($[M-70]^+$), M^+ m/z 303; 2-оксо-епи-мезембренол (29) - базов йон m/z 233, $[M-2]^+ = m/z$ 303 (двойна връзка C4-C5), потвърдена чрез TMS силиране (+72 аму) (Фиг. 2).



Фигура 2. GC-MS спектри на нови алкалоиди идентифицирани в *Narcissus* cv. Hawera.

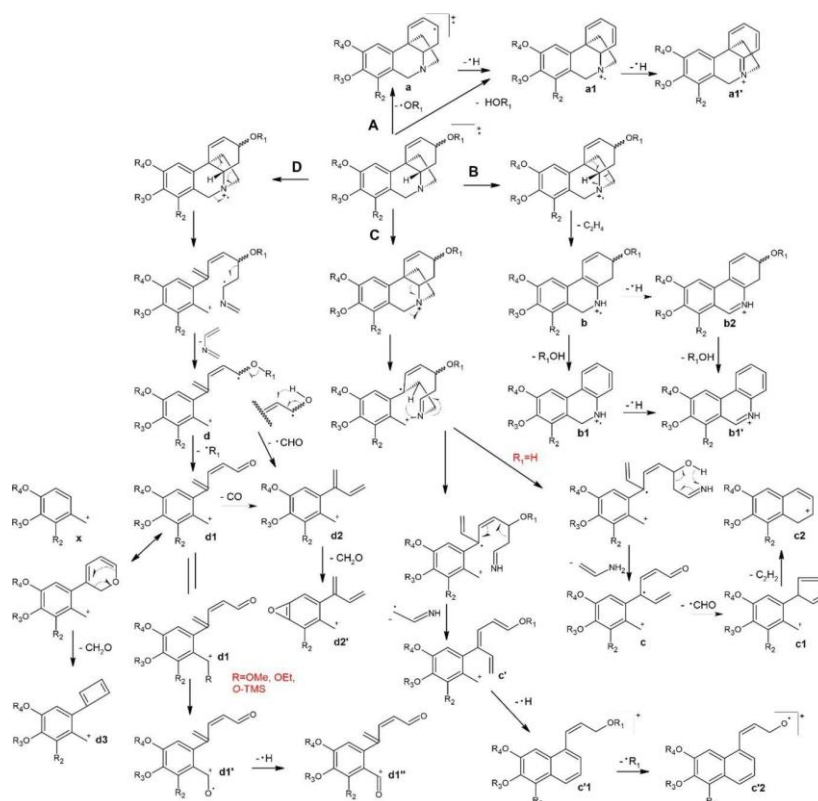
Получените масспектрални данни показват, че TMS-derivатите образуват характерни фрагментационни йони, които улесняват структурното охарактеризиране на неизвестните алкалоиди. Установено е, че силирането предоставя допълнителна информация за броя и разположението на хидроксилните групи, което подпомага идентификацията на нови природни съединения в растителните екстракти.

5.2 GC-MS на хемантаминов и крининов тип алкалоиди (Публикация 2)

34 стандартни алкалоида от хемантаминов и крининов тип са анализирани заедно с алкалоидни фракции от *Galanthus nivalis* L., *Narcissus poeticus* L., *Crinum moorei* L. и *Amaryllis belladonna* L. Изследвани са разделянето, стабилността, термолабилността и фрагментационните модели (Фигура 3).

Изследването показва, че алкалоидите от хемантаминов и крининов тип, съдържащи хидроксилна група при C11, проявяват ниска термична стабилност при директен GC-MS анализ. Това води до образуване на широки и асиметрични хроматографски пикове и затруднена идентификация. След силиране се наблюдава значително стабилизиране на съединенията и подобряване на разделянето. Хемантидин и епи-хемантидин се детектират надеждно само след дериватизация, което потвърждава високата ефективност на силирането при анализ на термолабилни алкалоиди.

Комбинираният анализ на индексите на задържане и EI маспектри позволява разграничаване на епимерни форми при C3, C6 и C11, както и определяне на мястото на заместителите в съединенията. Получените резултати разширяват възможностите за идентификация на неизвестни амарилисови алкалоиди и за създаване на надеждна библиотека от EIMS спектри на силирани и несилирани съединения.



Фигура 3. Фрагментация на алкалоиди от хемантаминов и крининов тип без заместители на C6 и C11.

Оптичните изомери витатин (хемантаминов тип) и кринин (крининов тип) с алфа и бета конфигурация на 5,10b-етановия мост, имат идентични RI и EIMS спектри и конфигурацията на моста не може да се определи чрез GC-MS анализ (Таблица 2).

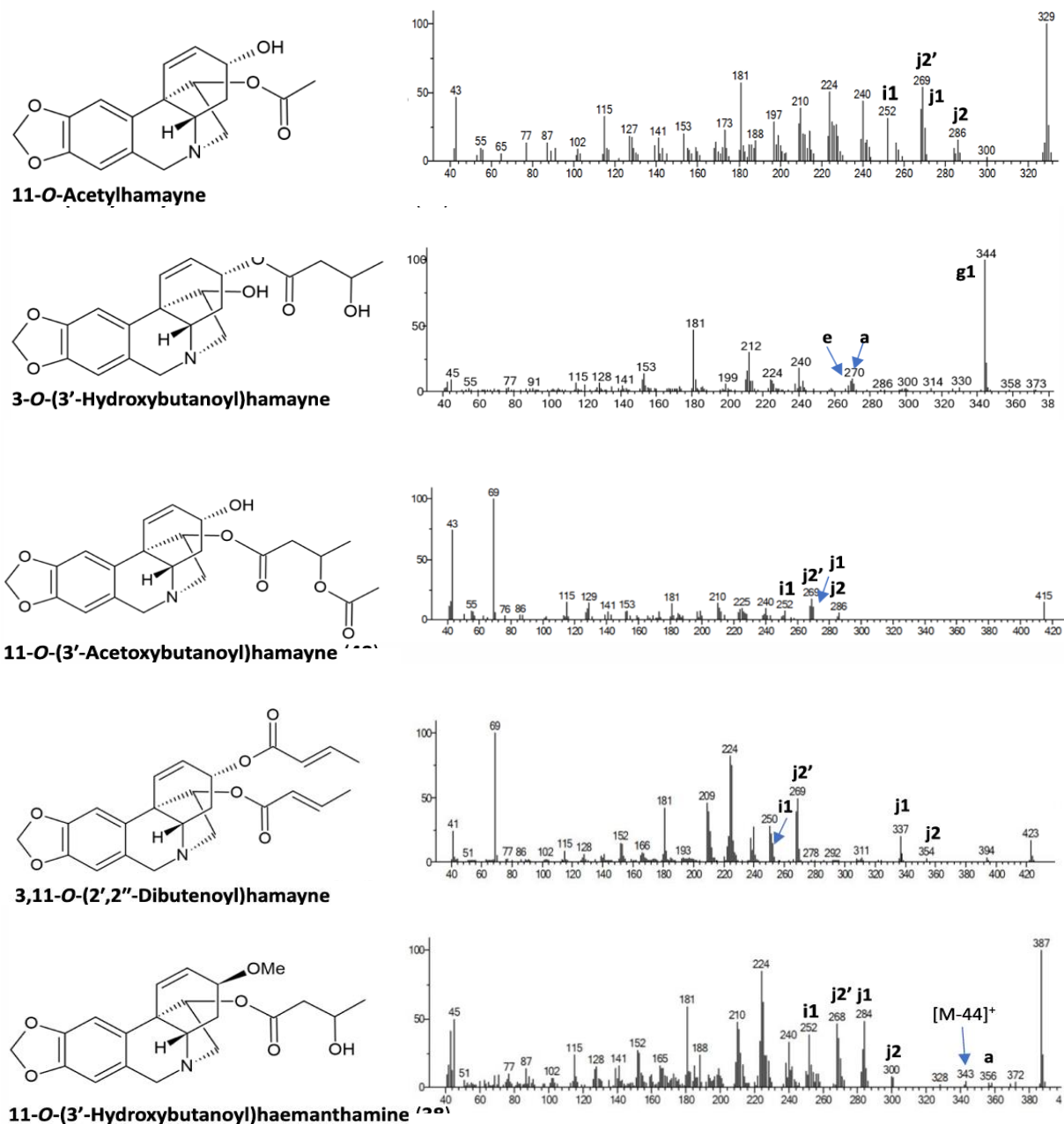
Фрагментационният модел се определя от степента на наситеност на пръстените и заместителите при C3, C6 и C11 въглеродни атома. Алкалоиди с две свободни хидроксилни групи (хамайн, хемантидин/епо-хемантидин, 6-ОН-кринамин/6-ОН-епо-кринамин) показват широки хроматографски пикове с ниска интензивност и различни спектри поради разпадане в хроматографската колона. Силирането дава симетрични пикове с базов йон m/z 73. Диагностичен признак за C6-ОН епимер е интензивността на йона $[M-Me]^+$ спрямо $[M]^+$.

Таблица 2. GC-MS характеристики на ключови хемантаминови и крининови алкалоиди (* новоидентифицирани).

Алкалоид	RI (недерив.)	RI (TMS)	[M] ⁺	Базов йон (недерив.)	Базов йон (TMS)	Сб-епимери
<i>Витатин/Кринин</i>	2466	2454	271	M ⁺ = базов	m/z 73	Не (идент. RI)
<i>Хемантамин</i>	2551	—	301	m/z 272	—	—
<i>Кринамин</i>	2501	—	301	слаб M ⁺	—	—
<i>Хамайн</i>	~2716	2621	303	широк пик	m/z 73	Да (>10 RI)
<i>Папирамин/епа-папирамин</i>	2461	2536/2517	301	Не се разделят	m/z 73	Да (19 RI)
<i>Хемантидин/епа-хемантидин</i>	~2716	2633/2623	317	Широк/деград.	m/z 73 / m/z 211	Да (10 RI)
<i>6-ОН-кринин/6-ОН-етикринин</i>	~2708	2678/2671	317	Широк/деград.	m/z 211 / m/z 73	Да (7 RI)
<i>11-О-ацетилхамайн*</i>	—	2730	329	—	M ⁺ = базов	—
<i>11-О-(3-ОНбутаноил)хамайн*</i>	3207	—	373	m/z 344 (базов)	—	—

Алкалоиди с 3-хидроксибутаноилни групи при C11 (съединения 19–24) се разпадат при условията на GC-MS анализа до 2-бутеноилни производни, като фрагментът m/z 69 (COCHCHCH₃) е диагностичен. В алкалоидните фракции от *Galanthus nivalis* L. са идентифицирани 5 нови съединения (Фигура 4):

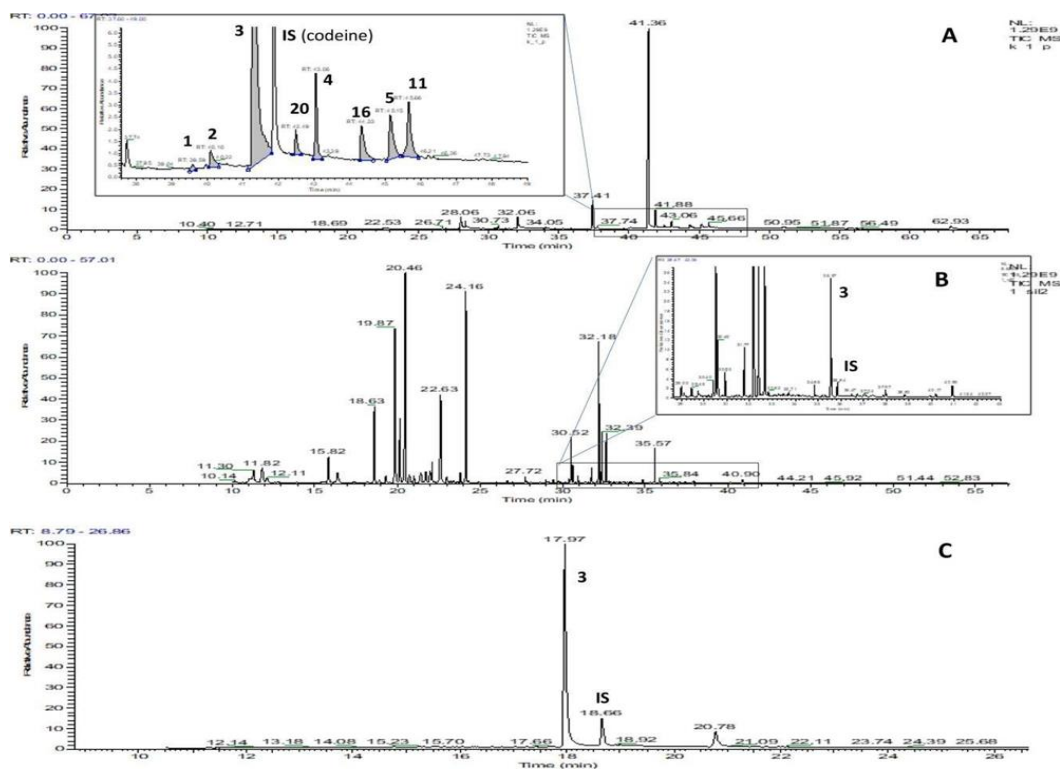
- 11-О-ацетилхамайн: M⁺ m/z 329, базов йон M⁺, i1 m/z 252, j1/j2 m/z 270/286
- 3-О-(3'-хидроксибутаноил)хамайн: M⁺ m/z 373, базов йон m/z 344 ([M-CHO]⁺)
- 11-О-(3'-ацетоксибутаноил)хамайн: M⁺ m/z 415, базов йон m/z 69
- 3,11-О-(2',2''-дибутеноил)хамайн: M⁺ m/z 423
- 11-О-(3-хидроксибутеноил)хемантамин в *Narcissus poeticus* L.: M⁺ m/z 387.



Фигура 4. GC-MS спектри на нови алкалоиди идентифицирани в *Galanthus nivalis* L. и *Narcissus poeticus* L.

5.3 GC-MS количествено определяне на галантамин в *Hippeastrum papilio* (Ravena) Van Sheepen (Публикация 3)

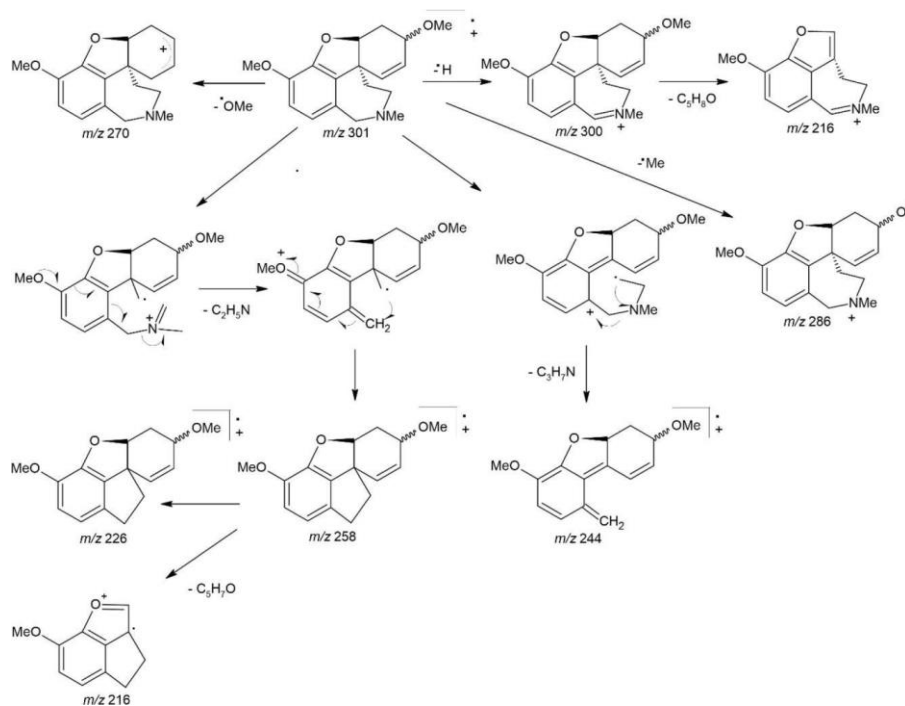
Разработен и валидиран е бърз (зелен) GC-MS метод за директно инжектиране на подкислени водни екстракти, без концентриране или пречистване с органични (токсични) разтворители (Фигура 5).



Фигура 5. GC-MS хроматограма (в SIM режим, m/z 286) на воден екстракт от листа на *H. papilio* (Ravena) Van Sheepen (A), силирана проба (B) и след оптимизиране на метода (C). Скоростта на нагряване е $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, което скъсява времето за анализ от 41.4 на 17.8 min.

Ефективността на екстракцията с 0.072% HCl (pH 1.95) осигурява максимален добив от листата на растението - 4.42 mg/g от сухото тегло. При по-висока концентрация на солна киселина (0.72% HCl, pH 1.00), галантаминът се разпада до анхидрогалантамин (потвърдено чрез GC-MS анализ). Водната екстракция при pH 5-6, дава сходен добив като при метаноловата екстракция. Добивите при водна екстракция са с 24–26% по-високи отколкото при метанола.

Силирането на алкалоидните фракции значително повишава летливостта и чувствителността за хидроксилирани съединения. Освен галантамин, в *H. papilio* са идентифицирани 4 нови за вида алкалоида за вида: *N*-деметилгалантамин, *N*-формилноргалантамин, кринан-3-он и хординин. Предложена е GC-MS фрагментация за 3-*O*-метилгалантамин и 3-епо-*O*-метилгалантамин (Фигура 6).



Фигура 6. Предложена фрагментация на 3-О-метилгалантамин и 3-епи-О-метилгалантамин.

Съдържанието на галантамин (7.44 mg/g в сухо тегло) в луковици и (4.62 mg/g в сухо тегло) в листа са едни от най-високите стойности получени в индустрията от растителен вид. При водна екстракция под налягане (10 bar, 80°C) е постигнато пълно извличане.

Разработеният GC-MS метод позволява директното инжектиране на подкиселени водни екстракти, без използване на токсични органични разтворители и без допълнително концентриране на пробите. Методът показва висока линейност, добра прецизност и ниски граници на детекция, което го прави подходящ за рутинен количествен анализ на галантамин в растителни проби. Установено е високо съдържание на галантамин в луковиците и листата на *Hippeastrum papilio*, което определя вида като перспективен източник на биологично активния алкалоид (Табл. 3).

Таблица 3. Валидационни параметри на GC-MS метода за количествено определяне на галантамин в *H. rapilio* (Ravena) Van Sheeren (при директно инжектиране на воден екстракт).

Параметър	Стойност
Линейност – нисък диапазон (SIM)	10–80 µg/mL; R ² = 0.997
Линейност – висок диапазон (SIM)	80–800 µg/mL; R ² = 0.998
LLOD (SIM режим)	2 ng/mL (S/N = 3:1)
LLOQ (SIM режим)	10 ng/mL (S/N = 10:1)
Прецизност (RSD вътредневна / междудневна)	1.4–4.0%
Точност (% възстановяване)	89–106%
Матричен фактор (МФ)	0.98 (пренебрежим матричен ефект)
Стабилност на стандарт/екстракт	20 дни при стайна температура
Вариация на RI (галантамин)	<0.1% за 20 дни / >400 проби
Галантамин в луковици (<i>H. rapilio</i>)	7.44 mg/g сухо тегло
Галантамин в листа (<i>H. rapilio</i>)	4.62 mg/g сухо тегло
Оптимален екстракт	0.072% HCl, pH 1.95, 50°C, 2 h

6. Заключение

В дисертационния труд се сравняват летливостта, стабилността, разделянето и масспектралната фрагментация на амарилисови алкалоиди преди и след силиране. Целта е да се преодолеят ограниченията на директния GC-MS анализ. В резултат се оценява възможността за разширяване на приложимостта на метода при анализ на тази структурно разнообразна група биологично активни вещества.

Резултатите показват, че силирането на алкалоидни фракции и екстракти, съдържащи амарилисови алкалоиди допринася съществено за изучаване на алкалоидната биосинтеза на амарилисови растения. При редица алкалоиди се понижават границите на детекция, подобрява се формата на хроматографските пикове и се увеличава термалната устойчивост. Информацията за алкалоидните профили, която се получава след анализ на силирани проби, е по-богата, а при анализ на силирани тотални екстракти, информацията за биосинтезата на алкалоиди в растенията е по-достоверна.

В резултат, силирането на амарилисовите алкалоиди разширява възможностите за GC-MS анализ на тази група вещества. Това е важно както за приложението му при фитохимични,

физиологични, фармакологични, екологични, агрономични и др. изследвания на амарилисови растения, така и за контрол на растителни суровини, съдържащи амарилисови алкалоиди.

Получените резултати потвърждават изпълнението на поставените задачи. Създадена е библиотека от EIMS спектри на силирани и несилирани амарилисови алкалоиди, характеризирани са ефектите на силирането върху летливостта, термалната стабилност и фрагментацията на различни структурни типове алкалоиди, както и е разработен валидиран GC-MS метод за количествен анализ на галантамин.

6.1 Основни изводи

Въпреки че GC-MS е широко използван метод и често първи избор при анализ на алкалоидни фракции от неизследвани амарилисови растения, в настоящото изследване бяха установени редица ограничения, които могат да бъдат преодоленни чрез силиране:

1. Алкалоиди, съдържащи две или повече хидроксилни групи, се характеризират с ниска летливост и ограничена детекция при директен GC-MS анализ. След силиране се наблюдава съществено повишаване на летливостта, подобряване на разделянето и понижаване на границите на детекция. Това е ясно демонстрирано при ликорина, който в несилирано състояние се детектира трудно при ниски концентрации, но след дериватизация става надеждно откриваем в растителни екстракти.
2. Алкалоидите от хемантаминов/крининов тип с хидроксилна група при C11 показват ниска термична стабилност, което води до разлики между GC-MS и директни MS спектри, както и до широки и асиметрични хроматографски пикове. Силирането води до стабилизиране на съединението и значително подобряване на хроматографските характеристики. Показателен пример е хемантидинът, който практически не се детектира в несилирани фракции, но след силиране се регистрира ясно, включително като разделени епимерни форми.
3. Паралелният анализ на силирани алкалоидни фракции и тотални екстракти позволява разграничаване на естествени съединения от артефакти, получени при киселинно-основно фракциониране. Това повишава достоверността на данните за алкалоидния състав и биосинтез.
4. Силирането повишава чувствителността на анализа и позволява откриване на минорни алкалоиди, които остават недетектирани при анализ на несилирани проби.

5. Дериватизацията предоставя допълнителна информация за броя на хидроксилните групи, което подпомага идентификацията и структурното охарактеризиране на неизвестни съединения.
6. Силираните и несилирани алкалоиди от хемантаминов и крининов тип, епимерни при C3, C6 и C11, могат да бъдат разграничени чрез комбинация от масспектрални характеристики и индекси на задържане.
7. Конфигурацията на 5,10b-етановия мост не може да бъде еднозначно определена само чрез GC-MS анализ и изисква допълнителни спектрални методи (напр. CD анализ).
8. Алкалоиди, съдържащи верига от хидроксibuтирилни естерни групи, се разпадат по време на GC-MS анализ и се детектират като 2-бутеноилни производни, което трябва да се отчита при интерпретация на данните.
9. Анализът на EI фрагментацията позволява определяне на мястото и вида на заместителите при алкалоиди от хемантаминов и крининов тип, което дава възможност за идентификация на съединения с непознати маспектри и за откриване на нови алкалоиди.

7. Приноси

1. Създадена е библиотека от EIMS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди чрез паралелен GC-MS анализ на стандартни вещества и алкалоидни фракции от различни видове амарилисови растения.
2. Извършен е подробен метаболитен анализ на фармакологично активна алкалоидна фракция от *Narcissus* cv. Hawera с установено антидепресивно и анксиолитично действие.
3. Идентифицирани са 7 нови амарилисови алкалоида: 2-оксомезембрин и 2-оксо- епи-мезембренол в *Narcissus* cv. Hawera; 11-O-ацетилхамайн, 3-(3'-O-хидроксibuтаноил)хамайн, 11-O-(3'-ацетоксибутаноил)хамайн и 3,11-O-(2',2''-дибутаноил)хамайн в *Galanthus nivalis* L.; и 11-O-(3-хидроксibuтеноил)хемантамин в *Narcissus poeticus* L.
4. Разработен и валидиран е GC-MS метод за количествен анализ на галантамин в *Hippeastrum papilio* Van Scheepen, приложен за оценка на алкалоидните фракции и доказващ високото му съдържание в този растителен вид.
5. Разработен и валидиран е „зелен“ GC-MS метод за количествен анализ на амарилисови алкалоиди в растителни проби чрез директно инжектиране на подкислен воден разтвор, като се избягва използването на токсични органични разтворители.

8. Използвана литература

1. The Angiosperm Phylogeny Group An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* **2016**, *181*, 1–20, doi:10.1111/boj.12385.
2. Christenhusz, M.J.M.; Byng, J.W. The Number of Known Plants Species in the World and Its Annual Increase. *Phytotaxa* **2016**, *261*, doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1.
3. Dennehy-Carr, Z.H.; Könyves, K.; Yesson, C.; David, J.C.; Culham, A. The Origin and Diversification of Amaryllidaceae: A Phylogenetic and Biogeographic Analysis. *Am. J. Bot.* **2025**, *112*, e70092, doi:10.1002/ajb2.70092.
4. Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of Alkaloids in Amaryllidaceae Plants: A Review. *Phytochem. Rev.* **2021**, *20*, 409–431, doi:10.1007/s11101-020-09678-5.
5. Barton, D.H.R.; Kirby, G.W. 153. Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part V. The Synthesis of Galanthamine. *J. Chem. Soc. Resumed* **1962**, 806, doi:10.1039/jr9620000806.
6. Jayawardena, R.; Weerasinghe, K.; Nanayakkara, I.; Madhujith, T.; Hills, A.P.; Kalupahana, N.S. The Effects of a Nutritional Intervention on the Sports Nutrition Knowledge and Nutritional Status of Track and Field Athletes: Protocol for a Randomized Controlled Trial. *Trials* **2025**, *26*, 61, doi:10.1186/s13063-024-08683-9.
7. Georgiev, V.; Ivanov, I.; Pavlov, A. Recent Progress in Amaryllidaceae Biotechnology. *Molecules* **2020**, *25*, 4670, doi:10.3390/molecules25204670.
8. Jayawardena, T.U.; Merindol, N.; Liyanage, N.S.; Desgagné-Penix, I. Unveiling Amaryllidaceae Alkaloids: From Biosynthesis to Antiviral Potential – a Review. *Nat. Prod. Rep.* **2024**, *41*, 721–747, doi:10.1039/D3NP00044C.
9. *Natural Products*; Springer: New York, 2013; ISBN 978-3-642-22143-9.
10. Berkov, S.; Georgieva, L.; Kondakova, V.; Atanassov, A.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. Plant Sources of Galanthamine: Phytochemical and Biotechnological Aspects. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2009**, *23*, 1170–1176, doi:10.1080/13102818.2009.10817633.
11. Akram, M.N.; Verpoorte, R.; Pomahačová, B. Methods for the Analysis of Galanthamine and Its Extraction from Laboratory to Industrial Scale. *South Afr. J. Bot.* **2021**, *136*, 51–64, doi:10.1016/j.sajb.2020.08.004.
12. Tobiszewski, M. Metrics for Green Analytical Chemistry. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 2993–2999, doi:10.1039/C6AY00478D.
13. Berkov, S.; Denev, R.; Kok, D.; De Andrade, J.P.; Sidjimova, B.; Tallini, L.R.; Torras-Claveria, L.; Hussein, A.; Bastida, J. GC–MS of Some Haemanthamine- and Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2026**, *40*, e70019, doi:10.1002/rcm.70019.
14. Berkov, S.; Denev, R.; Sidjimova, B.; Zarev, Y.; Shkondrov, A.; Torras-Claveria, L.; Viladomat, F.; Bastida, J. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Some Homolycorine-type Amaryllidaceae Alkaloids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2023**, *37*, e9506, doi:10.1002/rcm.9506.
15. Harvey, D.J.; Vouros, P. MASS SPECTROMETRIC FRAGMENTATION OF TRIMETHYLSILYL AND RELATED ALKYL-SILYL DERIVATIVES. *Mass Spectrom. Rev.* **2020**, *39*, 105–211, doi:10.1002/mas.21590.

9. Списък на научните публикации с пълно библиографско описание и цитиранията по тях

1. Berkov, S., Pechlivanova, D., **Denev, R.**, Nikolova, M., Georgieva, L., Sidjimova, B., Bakalov, D., Tafradjiiska, R., Momekov, G., Bastida, J. GC-MS analysis of Amaryllidaceae and *Sceletium*-type alkaloids in bioactive fractions from *Narcissus* cv. Hawera. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 35, e9116 (2021). <https://doi.org/10.1002/rcm.9116>. **Q2, IF 2.586**

Равнява се на 26 машинописни страници.

Цитати:

1. Maryam, S., Gul, A. (2025). Recent Developments in Narcissus Species Breeding, Genomic Analysis, Biochemistry. In: Wani, M.A., Al-Khayri, J.M., Jain, S.M. (eds) Breeding of Ornamental Crops: Bulbous Flowers. Advances in Plant Breeding Strategies, vol 5. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-77900-8_17
2. Yin J, Lin R, Wu M, et al. Strategy for the multi-component characterization and quality evaluation of volatile organic components in Kaixin San by correlating the analysis by headspace gas chromatography/ion mobility spectrometry and headspace gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2021;35(21):e9174. doi:10.1002/rcm.9174
3. Pilařová V, Burianová K, Kosturko S, Kulkarni M, Van Staden J, Nováková L. Supercritical fluids in extraction, purification, and separation of selected Amaryllidaceae alkaloids *Separation and Purification Technology* 377, 2025, 133968
4. Leite E. L. L., A.Sheila de Queiroz Souza, P.Riceli Vasconcelos Ribeiro, R.deCássia Alves Pereira, N.Florêncio Martins, M.Kueirislene Amâncio Ferreira, J. E.Silva Alencar de Menezes, H.Silva dos Santos, O.Deusdênia Loiola Pessoa, K.Marques Canuto, *Chem. Biodiversity*2024, 21, e202302122. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202302122>

5. Maykon Jhuly Martins de PaivaMaykon Jhuly Martins de PaivaGuilherme Nobre L. NascimentoGuilherme Nobre L. NascimentoIangla DamascenoIangla DamascenoShow all 5 authorsDamaris SilveiraDamaris Silveiraharmacological and toxicological effects of AmaryllidaceaeBraz. J. Biol. 83 • 2023 • <https://doi.org/10.1590/1519-6984.277092>
2. Berkov, S., **Denev, R.**, Kok, D., et al., GC–MS of Some haemanthamine- and crinine-type Amaryllidaceae alkaloids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 40, e70019 (2026). <https://doi.org/10.1002/rcm.70019>. **Q3, IF 1.7**
Равнява се на 27 машинописни страници.
3. **Denev, R.**, Berkov S., A fast and simple validated method for GC-MS quantification of galanthamine in *Hippeastrum papilio* (Ravena) Van Sheepen and assessment of its alkaloid fractions. *J. Chromatogr A.* 1774, 466902 (2026). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2026.466902>. **Q1, IF 4**
Равнява се на 25 машинописни страници.

Списък на участията в научни форуми, отразяващи изследванията по дисертацията

1. **Denev R.**, Sidjimova B, Platcanov S, Tallini L, Torras-Claveria L, Berkov S. Development and validation of a GC-MS method for determination of galanthamine and haemanthamine in *Hippeastrum papilio* (oral presentation). 6th International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf Bansko, Bulgaria, 27.05.2025 - 30.05.2025.
2. **Denev R.**, Berkov S. 2024. GC-MS identification of alkaloids from the Amaryllidoideae: methodology and application. Primera Jornada Internacional sobre Tecnologías para el Aprovechamiento Sostenible de la Flora Nativa Tropical. Del 18 al 19 de setiembre del 2024, Puno, Peru. https://www.cytel.org/conteudo.php?idevento=5709&id_rede=512
3. **Rumen Denev**, „GC-MS analysis and separation of epimeric Amaryllidaceae alkaloids of haemanthamine type“ (постер), International Seminar of Ecology-2023 Cutting Edge Research of Ecology, 28 – 29 September 2023, Sofia, Bulgaria.

GC–MS Analysis of Silylated Amaryllidaceae Alkaloids

Rumen Denev

Ph.D. Dissertation

This doctoral dissertation focuses on the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis of Amaryllidaceae alkaloids, with particular emphasis on the impact of silylation on their analytical characteristics, including volatility, thermal stability, chromatographic behavior and fragmentation patterns. The study aims to expand the applicability of GC–MS for both qualitative and quantitative analysis of structurally diverse and biologically active alkaloids in plant matrices.

A comprehensive approach was employed, including the development of an electron ionization mass spectra (EIMS) library of both underivatized and silylated alkaloids, as well as comparative analysis of their chromatographic and spectral properties. The results demonstrate that silylation significantly improves the detectability, peak symmetry and thermal stability of hydroxylated and thermolabile alkaloids, enabling more reliable identification and structural characterization, including differentiation of epimers.

Phytochemical investigations of selected Amaryllidaceae species revealed a high diversity of alkaloids, including the identification of several new natural compounds. In addition, a fast, sensitive and validated GC–MS method for the quantification of galanthamine in *Hippeastrum papilio* was developed. The method is based on direct injection of acidified aqueous extracts, eliminating the need for organic solvents and extensive sample preparation, thus aligning with green chemistry principles. The method demonstrated excellent linearity, precision, and sensitivity, with low limits of detection and quantification.

The obtained results confirm that *H. papilio* is a rich natural source of galanthamine, with potential for industrial application. Furthermore, the combined use of silylation and GC–MS analysis provides enhanced insight into alkaloid profiles and biosynthetic pathways in Amaryllidaceae plants.

The study highlights the effectiveness of silylation as a powerful analytical tool and establishes GC–MS as a versatile and reliable method for phytochemical, pharmacological, and chemotaxonomic investigations of Amaryllidaceae alkaloids.