

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Хімічний факультет
Кафедра фармацевтичної хімії

Дипломна робота

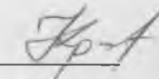
бакалавра

**на тему: «Синтез та фармакологічна активність естерів евгенолу із
гальмівними амінокислотами»**

«Synthesis and pharmacological activity of eugenol esters with inhibitory amino acids»

Виконала: студентка денної форми навчання
напряму підготовки 6.040101 Хімія

Маркова Катерина Іванівна

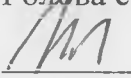
Керівник: д. б. н., проф. Кравченко І. А. 

Рецензент: к. х. н., с.н.с. Алексєєва О. О.

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
№ 4 від 25 травня 2017 р.

Захищено на засіданні екзаменаційної комісії № 1
протокол № 21 від «13» червня 2017 р.
Оцінка відмінно 1 A 90
(за національною шкалою, за шкалою ECTS, бал)

Завідувач кафедри

____ акад. НАН України Андронаті С. А.  д. х. н., проф. Ішков Ю.В.

Одеса – 2017

РЕФЕРАТ

Дипломна робота виконана на кафедрі фармацевтичної хімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова і присвячена дослідженню особливостей синтезу та вивчення фармакологічних властивостей складних ефірів евгенолу із гальмівними амінокислотами.

Мета роботи: синтез естерів на основі евгенолу та гальмівних амінокислот (ГАМК та гліцину) з подальшим вивченням фармакологічної активності отриманих похідних.

Отримання естерів здійснювали загальним методом естерифікації за Стегліком із використанням кислотних каталізаторів, а також шляхом використання різноманітних конденсуючих реагентів. З використанням методів мас-спектрометрії, ІЧ- та ¹H ЯМР-спектроскопії було підтверджено будову синтезованих сполук. Аналгетичну активність отриманих естерів оцінювали на моделях термічно- (метод «гарячої пластини») та хімічно-індукованого болю («капсаїциновий тест», «формаліновий тест», «АІТЦ тест») при трансдермальному введенні.

Можлива область застосування: фармацевтична промисловість, як потенціальні аналгетичні препарати.

Ключові слова: TRP-канали, евгенол, складні ефіри евгенолу, 4-алліл-2-метоксіфенол-4-амінобутират, 4-алліл-2-метоксіфенол-2-аміноацетат, аналгетична активність.

Дипломна робота складається з: 44 стор. машинописного тексту, 17 рис., 2 табл., 52 використаних джерела літератури.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. <i>Загальна характеристика іонних TRP-каналів</i>	6
1.2. <i>Суперсімейства TRP-каналів</i>	7
1.3. <i>Загальна характеристика евгенолу</i>	14
1.4. <i>Фармакологічна активність евгенолу та його похідних</i>	15
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	22
2.1. <i>Матеріали дослідження.....</i>	22
2.2. <i>Методики проведення експериментів</i>	23
2.2.1. <i>Загальна методика синтезу естерів евгенолу.....</i>	23
2.2.2. <i>Приготування м'якої лікарської форми</i>	23
2.2.3. <i>Визначення анагетичної активності</i>	24
2.3. <i>Результати та їх обговорення</i>	26
2.3.1. <i>Синтез естерів.....</i>	26
2.3.2. <i>Механізм етерифікації за Стегліхом:.....</i>	28
2.3.3. <i>Вивчення анагетичної активності естерів евгенолу</i>	31
ВИСНОВКИ.....	37
ЛІТЕРАТУРА.....	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГАМК – гамма-аміномасляна кислота

ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр

ДМПА – диметиламінопіридин

ДЦГК – дициклогексилкарбодіїмід

КССВ – константа спін-спінової взаємодії

ПМР – протонний магнітний резонанс

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

Вос – *трет*-бутилоксикарбонільна група

TRP – канали транз'єнтного рецепторного потенціалу

ВСТУП

В даний час світ почав віддавати перевагу препаратам природного походження. Так в останні роки активно ведуться дослідження по вивченню специфічної фармакологічної активності моноциклічних терпенів. Одним із таких терпенів є евгенол.

Евгенол- головна складова частина ряду ефірних масел: гвоздичного (до 85%), евгенольного базиліку (70-80%), коллюрії (70-80%); в менших кількостях міститься в цитронеллі, іланг-іланговому, айрному, ссафрасовому і деяких інших [1]. Саме евгенол надає пряний смак і такий специфічний аромат. Евгенол проявляє знеболюючу, спазмолітичну, антимікробну, потогінну, сечогінну дію. Дуже широко застосовується в стоматології: при пульпітах, карієсі, пародонтозі, ураженнях слизової оболонки порожнини рота надає протизапальний ефект.[2]. З давніх-давен від зубного болю рятувалися натираючи ясна порошком гвоздики або просто розжовуючи її бутони, в яких зосереджена найбільша концентрація евгенолу.

За рахунок антимікробної дії евгенол усуває діарею при кишкових інфекціях, покращує травлення, зменшує газоутворення в петлях кишечника. Евгенол, є потужним антисептиком, ефективним як проти патогенних бактерій, так і проти гельмінтів [3].

Евгенол усуває м'язові і діафрагмальні судоми - відмінно допомагає при гикавці. Унікальні властивості проявляє в гінекологічній сфері. Ще в давні часи гвоздичове масло використовували для посилення ефективності скорочення і потуг при пологах. А крім того евгенол, підвищуючи тонус матки, усуває мляві, мізерні менструації, нормалізує цикл, і, що важливо, підсилює сексуальне збудження [4]. Ефірні масла прянощів зарекомендувала себе як прекрасний засіб при артритих, артрозах, травмах. Відваром гвоздики лікують хвороби очей.

Евгенол, як натуральне біоактивне з'єднання має високий потенціал як терапевтичний агента, який може бути включений в лікування раку, лейшманіозу і деяких інших захворювань. Він служить в якості широкого

спектру лікарського засобу проти бактеріальних, вірусних, грибкових і паразитарних інфекцій [5]. Комбінаційна терапія евгенолу зі стандартними препаратами має великий потенціал, щоб очистити штами стійкі до ліків. Будучи компонентом природного походження, отриманого з ефірного масла, він має набагато менше недоліків, ніж інші синтетично отримані сполуки. Неменшою є роль амінокислот в регуляції функціональної активності ЦНС. Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) і гліцин – найбільш розповсюджені гальмівні нейромедіатори в ЦНС, які здатні модифікувати властивості постсинаптичної мембрани таким чином, що властивість клітини генерувати збудження частково або зовсім пригнічується. Це визначає перспективність створення на їх основі багатьох лікарських препаратів.

Таким чином, **мета** даного дослідження полягає у синтезі естерів на основі евгенолу та гальмівних амінокислот (ГАМК та гліцину) з подальшим вивченням фармакологічної активності отриманих похідних.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні **задачі**:

1. Здійснити синтез 4-аліл-2-метоксіфенол-4-амінобутирату та 4-аліл-2-метоксіфенол-2-аміноацетату за допомогою естерифікації по Стегліху.
2. Встановити будову синтезованих сполук за допомогою ряду фізико-хімічних методів.
3. Вивчити фармакологічну активність естерів як потенційних аналгетичних агентів

ВИСНОВКИ

1. В ході нашої роботи нами було синтезовано естери на основі евгенолу та гамма-аміномасляної кислоти – 4-аліл-2-метоксифенол-4-амінобутират, та на основі евгенолу та гліцину – 4-аліл-2-метоксифенол-2-аміноацетат.

2. Будову отриманих естерів доведено методами, ІЧ- та ^1H ЯМР-спектроскопії.

3. При вивченні фармакологічної активності синтезованих сполук, нами було виявлено, що отримані нами естери проявляють значну аналгетичну активність, яка дорівнює або перевищує дію препарату-порівняння – анестезину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лавренёва Г.В. Повна енциклопедія лікарських рослин / Г.В. Лавренёва В.К. Лавренёв. – М.: «ОЛМА-ПРЕСС», 1999. – 736 с.
2. Соколов С.Я Фітотерапія і фітофармакологія / С. Я. Соколов – М.: «Нева», 2000 – 976 с.
3. Zheng G. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents / G. Zheng P. Kenney L. Lam – J Nat Prod, 1992 – P. 999-1003.
4. Hanson S. Capsaicin interaction with TRPV1 channels in a lipid bilayer: molecular dynamics simulation / S. Hanson, – Biophysical Journal, 2015. – P. 1425–1434.
5. Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels / C. Montell., – Sci. STKE, 2011. – P.45–59
6. Julius D. TRP channels and pain / D. Julius – Annu. Rev. Cell Dev. Biol, 2013. – P. 355–354.
7. Mickle A. TRP channels: The key transducers of nociception and pain / A. Mickle, J. Shepherd – Prog. Mol. Biol, 2015. – P. 73–118.
8. Meents J. TRPV1 in migraine pathophysiology / J. Meents L. Neeb U. Reuter – Trends Mol. Med, 2010. – P. 153–159.
9. Yoo S. Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes / S. Yoo, J. Lim, S. Hwang // Molecules – 2014. – № 4. – P. 4708–4744
10. TRPA1 and other TRP channels in migraine / S. Benemei, C. Fusi, E. Rossi, C. Lupi, P. Geppetti – Headache Pain, 2013 – P. 71.
11. Patapoutian A. Transient receptor potential channels: Targeting pain at the source / A. Patapoutian S. Tate C. Woolf – Nat. Rev. Drug Discov, 2009 – P. 55–68

12. Smith G. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein / G. Smith – Nature. Macmillian Magazines Ltd., 2002. – P. 186–190
13. Redondo P. Intracellular Ca^{2+} store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP3 receptor and SERCA3 in human platelets. / P. Redondo – Biochim. Biophys. Acta., 2008. – P. 1163–1176.
14. Montell C. TRP Channels / K. Venkatachalam, C. Montell – Annu. Rev. Biochem, 2007 – P. 387–417.
15. Strübing C. Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain / C. Strübing – J. Biol. Chem., 2003. – P. 39014–39019
16. Kwan H. TRP channels in endothelial function and dysfunction. / H. Kwan Y. Huang X. Yao – Biochim. Biophys. Acta., 2007. – P. 907–914.
17. Zechel S. Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain / S. Zechel S. Werner O. Halbach – Springer-Verlag, 2007. – P. 651–656.
18. Greka A. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology / A. Greka – Nat Neurosci, 2003. – P. 837–845.
19. Dietrich A. Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRP– Mice / A. Dietrich – Mol. Cell. Biol., 2005. – P. 6980–6989.
20. Satoh S. Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca^{2+} channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis / S. Satoh – Cell. Biol., 2007. – P. 205–215.
21. Moran M. Transient receptor potential channels as therapeutic targets / M. Moran, A. Alexander, T. Biro, A. Szallasi – Nat. Rev. Drug Discov, 2011. – P. 601–620
22. Nulty S. The role of TRPM channels in cell death / S. Nulty E. Fonfria – Springer-Verlag, 2005. – P. 235–242.
23. Aarts M. TRPM7 and Ischemic CNS Injury / M. Aarts M. Tymianski – Neurosci., 2005. – P. 116–123.

24. Shimizu T. Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume / T. Shimizu – Springer-Verlag, 2009. – P. 795–807.
25. Sherrington C. The Integrative Action of the Nervous System / C. Sherrington – Oxford, UK, 1906. – P. 59–65
26. Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins / B. Nilius – Bull. Mem. Acad. R. Med. Bel, 2007. – P. 244–253
27. Schumacher A. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature / A. Schumacher, M. Tominaga, T. Rosen, J. Levine, D. Julius – Neuron, 1997. – P. 389.
28. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli / M. Tominaga, M. Caterina, A. Malmberg, T. Rosen, H. Gilbert, – Neuron, 1998. – P. 531–543.
29. Weber K. Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECAC1 and 2. Biochem. Biophys. / K Weber, A. Rump, J. Adamski – Res. Commun, 2001 – P. 1287–1294.
30. Flonta M. Cold current in thermoreceptive neurons / M. Flonta, L. Physiology, G. Reid – Nature, 2001. – P. 480.
31. Barceloux G. Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals./ G. Barceloux – Hoboken, 2008. – P. 48.
32. Yogalakshmi B, Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats / B. Yogalakshmi, P. Viswanathan, C. Anuradha – Toxicology, 2010. – P. 204–212.
33. Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine / [S Mahapatra S. Bhattacharjee, S. Chakraborty, S. Majumdar, S. Roy] – 2011. – P. 485–495.

34. Mahapatra S. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and *Ocimum gratissimum* Linn / S Mahapatra K. Roy, – Trop Med, 2014. – P. 391-397.
35. Zheng G. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents / Q. Kenney, L. Lam, G. Zheng – Nat Prod, 1992 –P. 999-1003.
36. Tominaga H. DPPH radical scavenging effect of several phenylpropanoid compounds and their glycoside derivatives / Y. Kobayashi, T. Goto, K. Kasemura, M. Nomura – YakugakuZasshi, 2005. – P. 371-375.
37. Slamenová D, Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines \ E. Horváthová. M. Sramková, J. Navarová D. Slamenová – Mutat Res, 2009. – P. 46-52.
38. Ito M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation / K M. Ito. Murakami, M. Yoshino – Food ChemToxicol, 2006. – P. 461-466.
39. Porto M. Citral and eugenol modulate DNA damage and pro-inflammatory mediator genes in murine peritoneal macrophages. / B. Silva, C. Luperini, F. Bachiega, M. Porto – MolBioRep, 2014. – P. 7043-7051.
40. Singh V. In vivo antioxidative and neuroprotective effect of 4-Allyl-2-methoxyphenol against chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rat brain. / V. Singh – Biochem, 2014. – P. 61-74.
41. Laekeman G. Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation./ G. Laekeman , L. Hoof, A. Haemers, – Phytother Res, 1990. – P. 90–96.

42. Berghe D. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* / D. Berghe – *Ann Clin*, 2011. – P. 20–24.
43. López P, Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. / P. López, C. Sánchez, R. Batlle, C. Nerín, – *Agric Food Chem*, 2003. – P. 6939-6946.
44. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria / [M. Lima, E. Souza, E. Diniz, M. Trajano A. Leite] – *Braz J Pharm Sci*, 2007 – P. 121–126.
45. Hemaiswarya S, Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria / S. Hemaiswarya, M. Doble – *Phytomedicine*, 1990 – P. 997-1005.
46. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and 2-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. / [A. Okoh, L. Mabinya, G. Pirochenva, A. Afolayan, S.Oyedemi] – *Biotechnol*, 2009 – P. 1280–1286.
47. Antimicrobial activity of cinnamate-eugenol: Synergistic potential, evidence of efflux pumps and amino acid effects / [G. Aparicio-Ozores, L. Dorantes-Alvarez, H. Hernández-Sánchez A. Rico-Molina] – *Food Technol*, 2012. – P. 289–300.
48. Qiu J. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. / J. Qiu, H. Feng, J. Lu, H. Xiang, D. Wang, – *Environ Microbiol*, 2012 – P. 5846-5851.
49. Nesterkina M. Synthesis and pharmacological properties of novel esters based on monocyclic terpenes and GABA / M. Nesterkina, I. Kravchenko – *harmacueticals*, 2016. – P. 1–10.

50. Nesterkina M. Synthesis and anticonvulsant activity of menthyl γ -aminobutyrate / M. Nesterkina, I. Kravchenko – Chemistry of Natural Compounds, 2016. – P. 237–239.
51. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки / [Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Дж., Тупс Э.]. – М. : Изд-во иностр. лит., 1958. – 520с.
52. Позднев В. Ф. Активация карбоновых кислот пирокарбонатами. Синтез сложных эфиров из N-ациламинокислот и вторичных спиртов с использованием системы ди-*трет*-бутилпирокарбонат-пиридин в качестве конденсирующего агента / В. Ф. Позднев // Биоорганическая химия. – 1985. – № 6. – С. 725–732