ЮГОЗАПАДЕН УНИВЕРСИТЕТ *„НЕОФИТ РИЛСКИ”*
Природо-математически факултет
Катедра „Химия”

Любомир Николов Георгиев

Синтез, биологична активност и HPLC анализ на фенилпропеноил амиди

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”

в област 4. Природни науки, математика и информатика,
направление 4.2. Химически науки

Научен ръководител: проф. дхн. Ценка Савова Милкова
Научен консултант: гл. ас. д-р Мая Георгиева Чочкова

Благоевград
2012 г.

Дисертационният труд е написан на 136 стр. формат А4. Съдържа 15 таблици, 20 схеми и 60 фигури. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 169 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет на катедра „Химия" към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски" – Благоевград на 17.04.2012г.

Дисертационният труд е изработен в катедра „Химия" към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски", гр.Благоевград.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 18.09.2012г. в катедра „Химия" към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски", гр.Благоевград, ул. „Тодор Александров" № 56, ет.3, зала 2305.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

DMF – диметилформамид;
TA – тирозиназна активност;
TLC – тънкослойна хроматография;
DCC – Дициклохексилкабодиимид;
DMSO – диметилсулфоксид;
DOPA – 3,4-дихидроксифенилаланин;
DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил;
EDC – 1-етил-3-(3′-диметиламинопропил) карбодиимид;
HOBt – N-хидроксибензотриазол;
HPLC – високо ефективна течна хроматография;
MIC – минимална инхибираща концентрация;
NMM – N-метилморфолин;
RSA – радикал улавяща активност;
Rt – време на задържане;

УВОД

Обект на настоящия дисертационен труд са производни на фенолни киселини с фенилпропенов скелет (C_6 – C_3). Важен представител на този клас съединения са каneлените киселини (канелена, *p*-кумарова, кафеена, ферулова и синапова) и техните аналози – амиди и естери. Известно е, че в растителния свят тези съединения изпълняват различни физиологични дейности, свързани основно със защитната им роля. Предполага се, че синтезът им в растенията се индуцира под въздействието на патогенни инфекции и е отговор на растенията към различни видове стресови състояния. За тези производни са установени разнообразни биологични активности: антимикробна, антиоксидантна, антитуморна, антитирозиназна и др.

Изучаването на биологичното действие на каneлените киселини и техни производни много често е затруднено от факта, че те присъстват в малки количества в растителните източници. Това е причината те да бъдат синтезирани в количества, достатъчни за детайлно изучаване на биологичните им свойства.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да бъдат получени чрез химични трансформации амиди на канелени киселини, които да се изследват за биологична активност и за наличие в растителни обекти чрез Високо ефективна течна хроматография. За постигането на целта бяха поставени следните задачи:

1. Синтез на амиди на канелена, *p*-кумарова, кафеена, ферулова и синапова киселини с ароматни моноамини;
2. Синтез на амиди на канелена, *p*-кумарова, кафеена, ферулова и синапова киселини с ароматни аминокиселини, биосинтетични предшественици на съответните ароматни моноамини;
3. Изследване на радикал улавяща, антиоксидантна, антимикробна и антитирозиназна активност на синтезираните съединения;
4. Разработване на метод за разделяне на амидите на канелени киселини с ароматни моноамини чрез Високо ефективна течна хроматография;
5. Изследване на фенолно съдържание, антиоксидантна и антимикробна активност на екстракт от семена на *Capsicum annuum*;
6. Изследване на екстракта на *Capsicum annuum* за съдържание на хидроксицинамоил амиди чрез Високо ефективна течна хроматография.

I. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

I.1. АМИДИ НА ЗАМЕСТЕНИ КАНЕЛЕНИ КИСЕЛИНИ С АРОМАТНИ АМИНИ.

I.1.1. Получаване по стандартни методи на пептидния синтез в разтвор.

За синтеза на избраните от нас амиди на канелена и хидроксиканелени киселини бяха приложени стандартните методи за създаване на амидна връзка в разтвор. Те се основават на директно взаимодействие между киселината и амина в присъствие на активиращи реагенти DCC/HOBt. За да избегнат трудностите, свързани с отстраняване на страничния продукт – дициклохексилкарбамид, бе използван водоразтворимия вариант на DCC, а именно EDC. Цинамоилтирамин и цинамоилтриптамин бяха получени и чрез директно взаимодействие на съответния амин с цинамоил хлорид. Добивите при прилагане на последния метод бяха с около 15% по-ниски. Като изходни киселини бяха използвани канелена, *p*-кумарова, ферулова, синапова и кафеена, а като ароматни амини - фенилетиламин, тирамин, допамин и триптамин. Получените амиди бяха изолирани от реакционните смеси чрез колонна или препаративна TLC и охарактеризирани чрез УВ, ИЧ, ^{1}Н-ЯМР, ^{13}С-ЯМР. Чистотата им бе потвърдена чрез Високо ефективна течна хроматография и елементен анализ. Два от получените двадесет амида не са описани в литературата (синапоил- и *p*-кумароил- фенилетиламин). На **схема 13 и таблица 3** са представени условията на провеждане за реакциите, структурите и добивите на получените производни.

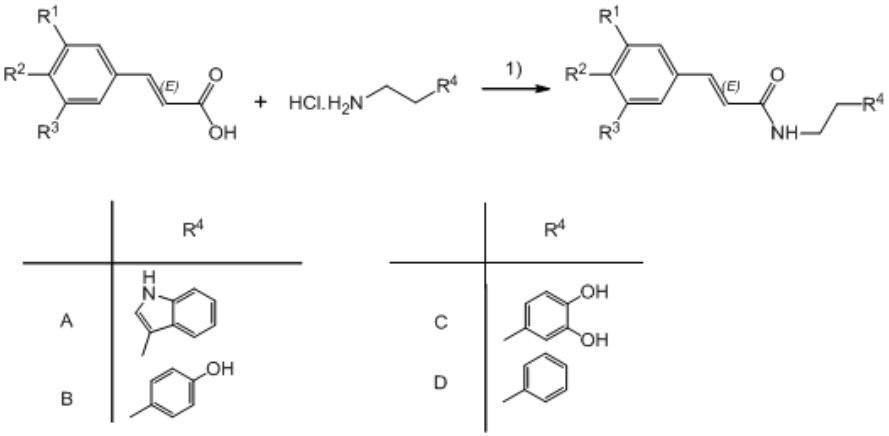


Схема 13. Синтез на цинамоил- и хидроксицинамоил амиди с ароматни моноамини. Реагенти и условия: 1) EDC, HOBt и NMM в CH_2Cl_2 (или Et_3N в DMF). Реакционно време от 4÷24 часа.

Съединение	R^1	R^2	R^3	R^4	Добив %
1.Синапоилтриптамин	OCH_3	OH	OCH_3	A	49
2.Синапоилтирамин	OCH_3	OH	OCH_3	B	36
3.Синапоилдопамин	OCH_3	OH	OCH_3	C	53
4.Синапоилфенилетиламин	OCH_3	OH	OCH_3	D	90
5.*p* -Кумароилтриптамин	H	OH	H	A	80
6.*p* -Кумароилтирамин	H	OH	H	B	73
7.*p* -Кумароилдопамин	H	OH	H	C	48
8.*p* -Кумароилфенилетиламин	H	OH	H	D	78
9.Ферулоилтриптамин	OCH_3	OH	H	A	65
10.Ферулоилтирамин	OCH_3	OH	H	B	35
11. Ферулоилдопамин	OCH_3	OH	H	C	47
12. Ферулоилфенилетиламин	OCH_3	OH	H	D	78
13. Кафеоилтриптамин	OH	OH	H	A	67
14. Кафеоилтирамин	OH	OH	H	B	48
15. Кафеоилдопамин	OH	OH	H	C	73
16. Кафеоилфенилетиламин	OH	OH	H	D	52
17. Цинамоилтриптамин	H	H	H	A	35
18. Цинамоилтирамин	H	H	H	B	49
19. Цинамоилдопамин	H	H	H	C	75
20. Цинамоилфенилетиламин	H	H	H	D	57

Таблица 3. Амиди на канелени киселини с ароматни моноамини.

В УВ спектрите на синтезираните амиди присъстват две области на поглъщане от 203 до 250 nm и от 250 до 350 nm, съответно

с по един или два максимума във всяка област при около 210, 220, 280 и 320 nm. Точното им положение се определя от вида и броя и разположението на заместителите в бензеновото ядро. Абсорбцията в по-късовълновата област от спектър се дължи на p-π спрягането на свободната електронна двойка от азотния атом с карбонилната група в амидната връзка, както и от същото спрежение между хидроксилните групи и бензеновото ядро. Абсорбцията в дълговълновата област се дължи на фенилпропеновата спрегната система C_6H_5-(CH=CH)-CO- NH-R.

В ИЧ спектрите образуването на амидна връзка бе доказано с наличие на ивици за валентно C=O трептене от амидната група в областта 1720-1630 cm^{-1} и наличие на широка ивица при 3400-3100 cm^{-1} за валентно трептене на N-H връзката. Освен тях присъстват ивици в интервала 1000-675 cm^{-1} за извън равнинни деформационни C-H трептения (γ(C-H)) за олефинови и ароматни въглеводороди, а за равнинните трептения се наблюдават ивици при 1300-1000 cm^{-1}. Присъствието на ивица при 990-930 cm^{-1} в ИЧ спектъра определя *E* конфигурация на C=C връзката в остатъка C_6H_5-(**C**H=**C**H)-CO- NH-R.

Структурата на съединенията бе потвърдена и чрез ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР. Стереохимията на амидите бе установена чрез анализ на константите на спин-спиново взаимодействие между протоните в техните ^{1}H-ЯМР спектри. Олефиновите протони се явяват като два дублета при около 6.2 и 7.5 ppm. Измерените стойности за вициналните константи на спин-спиново взаимодействие ($^3J_{H/H}$ около 15.6 Hz) на олефиновите протони на цинамоил-, ферулоил-, *p*-кумароил-, кафеоил- и синапоил киселинните остатъци определят *E*-конфигурация на двойната връзка на изследваните съединения. В някои случаи много слаби сигнали се регистрират за *Z*-изомерната форма на амидите ($^3J_{H/H}$ около 12.6 Hz). Намереното *E*:*Z* отношение, определено от интензивността на съответните резонансни сигнали в ^{1}H ЯМР спектрите, е 1:0.1÷0.05. В ^{1}H и ^{13}C-ЯМР спектрите на цинамоиламидите се наблюдават характерни резонансни сигнали за киселинната и аминната част. Образуването на амидна връзка в ^{13}C-ЯМР спектъра се потвърждава от присъствието на резонансни сигнали

при около 165.0 ppm за амидни карбонилни С-атоми. Освен това в ^{1}H-ЯМР спектъра сигналите при около 8.0 ppm (в DMSO-d_6) и 5.6 ppm (в $CDCl_3$) доказват наличие на амидни протони.

I.1.2. Изследване на радикал улавящото действие на синтезираните амиди спрямо DPPH•.

За определяне на радикал улавящата активност на синтезираните амиди спрямо DPPH• радикала бе използван методът на *Nenadis* и *Tsimidou*. При него се проследява понижението на абсорбцията на DPPH• радикала при 516 nm. Радикал улавящата активност (RSA) се определя като:

$$\%RSA = [(Abs_{(DPPH\bullet)} - Abs_{(test)} / Abs_{(DPPH\bullet)}] \times 100,$$

където $Abs_{(DPPH\bullet)}$ – абсорбция на разтвора на DPPH• без изследвана проба,
$Abs_{(test)}$ – абсорбция на разтвора на DPPH• с изследвана проба.

В **таблица 4** са представени резултатите за радикал улавящата способност на синтезираните амиди. Като референти бяха използвани типични антиоксиданти и свободни фенолни киселини. В таблицата най-активните съединения са изписани с удебелен шрифт. Резултатите показват, че двете фенолни хидроксилни групи в остатъка на кафеената киселина и в остатъка на амина, са определящият фактор за по-високата радикал улавяща активност при кафеоил амидите. Остатъците от ферулова и синапова киселини, съдържащи една, съответно две електронодонорни *о*-метокси групи спрямо *р*-фенолната хидроксилна група, също допринасят за по-ефективната стабилизация на съответния феноксиден радикал и производните им имат високи активности. Участието на тирамин в изследваните амиди не оказва положителен ефект върху активността спрямо DPPH•. Участието на триптамина и фенилетиламина не е ясно изразено. Тяхното влияние

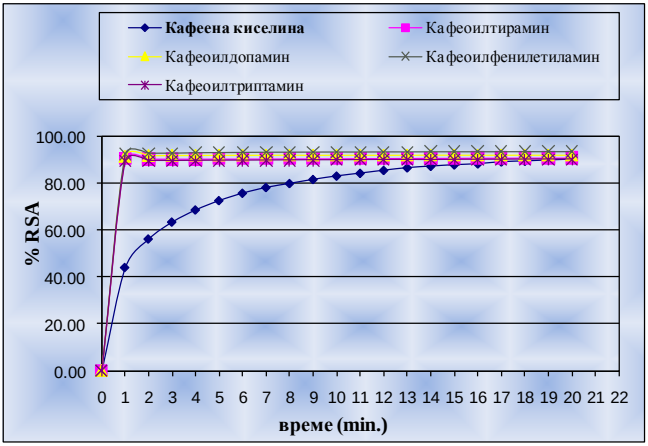
може да се отдаде на стерични причини, но като цяло производните им имат най-ниски активности. Радикал улавящата активност на тестваните съединения спрямо DPPH$^{\bullet}$ радикала се увеличава в следния ред: ферулоилтирамин (**10**) < синапоилтриптамин (**1**) < ферулоифенилетиламин (**12**) < синапоилфенилетиламин (**4**) ≈ ферулоилтриптамин (**9**) < ферулова киселина < синапоилтирамин (**2**) < *p*-кумароилдопамин (**7**) ≈ синапова киселина < допамин < цинамоилдопамин (**19**) < синапоилдопамин (**3**) < кафеоилтирамин (**14**) ≈ ферулоилдопамин (**11**) ≈ кафеоилтриптамин (**13**) ≈ кафеена киселина < кафеоилдопамин (**15**) ≈ кафеоилфенилетиламин (**16**). Активността на всички проби е дозо- зависима и корелира положително с концентрациите. Изключение правят съединение **15** (кафеоилдопамин), което показва приблизително еднаква активност при две различни концентрации (1.8 и 3.6 mM) и допаминът, който показва висока активност и при трите концентрации.

Наблюдаваната най-висока радикал улавяща активност при кафеената киселина и амидите й ни даде основание да проследим кинетиката на взаимодействието им с DPPH$^{\bullet}$, при концентрация 3.6 mM. Оказа се, че всички кафеоил амиди достигат максимална радикал улавяща активност до края на първата минута, докато за свободната кафеена киселина са необходими около 16 минути (**фигура 31).**

Този тест е подходящ за получаване на първична информация при търсенето на нови антиоксиданти и дава възможност да се правят заключения структура-активност.

Съединение	% (RSA)					
	0.9 mM		1.8 mM		3.6 mM	
	реакционно време (min.)					
	10'	20'	10'	20'	10'	20'
Кварцетин	40.43±0.32	45.18±0.52	46.68±0.15	58.36±0.15	76.01±0.20	78.05±0.15
D,L α-Токоферол	23.24±0.10	24.75±0.22	40.82±0.20	46.84±0.17	62.91±0.22	73.31±0.15
Евгенол	7.92±0.02	10.57±0.02	10.89±0.05	15.58±0.07	23.51±0.05	31.04±0.05
Изоевгенол	6.53±0.05	7.13±0.05	11.13±0.05	12.32±0.05	17.56±0.02	19.04±0.02
Синапова к-на	16.10±0.05	17.22±0.07	26.50±0.12	31.91±0.05	69.03±0.32	69.62±0.25
1.Синапоилтриптамин	8.76±0.75	9.90±0.75	16.58±3.03	18.33±2.91	30.67±2.76	33.25±2.56
2.Синапоилтирамин	15.22±4.10	17.05±3.48	26.29±3.65	28.45±2.96	45.50±4.20	47.45±3.80
3.Синапоилдопамин	**42.26±5.81**	**48.24±5.99**	**74.61±8.82**	**79.24±6.83**	**88.59±6.29**	**87.86±6.19**
4.Синапоилфенилетиламин	11.83±2.21	13.40±1.79	22.00±0.87	24.07±0.25	37.99±7.95	41.06±8.82
p -Кумарова к-на	2.10±0.05	2.90±0.07	3.70±0.05	4.70±0.10	4.50±0.07	6.10±0.10
5.*p* -Кумароилтриптамин	1.52±1.22	1.93±1.29	1.19±0.10	1.42±1.07	1.71±0.35	2.23±0.17
6.*p* -Кумароилтирамин	2.43±0.22	2.99±0.17	2.34±0.40	2.95±0.52	2.50±0.67	3.26±0.72
7.*p* -Кумароилдопамин	**17.92±3.65**	**19.18±3.73**	**33.85±6.56**	**35.74±6.61**	**66.94±8.07**	**69.64±8.17**
8.*p* -Кумароилфенилетиламин	2.24±0.92	2.58±0.35	2.52±0.72	2.91±0.84	2.92±0.12	3.25±0.12
Ферулова к-на	12.64±0.07	13.81±0.05	21.02±0.27	25.10±0.30	36.71±0.15	44.32±0.20
9.Ферулоилтриптамин	11.90±3.65	13.68±4.15	21.86±0.75	25.04±0.94	34.12±3.55	41.46±4.00
10.Ферулоилтирамин	5.34±0.67	6.79±0.55	9.61±1.49	11.77±1.69	17.91±2.41	21.20±2.73
11. Ферулоилдопамин	**30.91±2.86**	**34.49±2.98**	**56.06±7.71**	**60.44±7.63**	**90.35±0.62**	**90.47±0.50**
12. Ферулоилфенилетиламин	11.31±0.82	13.36±1.04	20.34±3.40	23.42±3.63	33.89±3.13	38.85±3.50
Кафеена к-на	33.50±0.99	31.10±0.57	62.11±4.52	64.28±4.89	88.04±3.78	91.83±1.61
13. Кафеоилтриптамин	**30.72±5.34**	**33.25±6.20**	**59.12±5.09**	**63.13±5.19**	**90.41±0.92**	**90.82±0.89**
14. Кафеоилтирамин	**32.61±4.55**	**33.98±4.47**	**59.20±7.14**	**61.19±7.22**	**89.75±0.32**	**89.95±0.55**
15. Кафеоилдопамин	**53.35±3.45**	**55.24±3.43**	**89.61±1.71**	**90.02±1.52**	**91.49±2.34**	**92.49±1.19**
16. Кафеоилфенилетиламин	**41.85±3.85**	**44.29±3.85**	**77.33±5.79**	**80.37±5.74**	**93.43±0.22**	**94.21±2.38**
Канелена к-на	0.30±0.11	0.32±0.10	0.32±0.10	0.35±0.20	0.32±0.20	0.32±0.30
17. Цинамоилтриптамин	n.d	n.d.	n.d	n.d.	n.d	n.d.
18. Цинамоилтирамин	1.10±0.12	1.45±0.05	1.16±0.25	1.53±0.12	1.57±0.65	2.01±0.72
19. Цинамоилдопамин	**20.84±2.41**	**22.30±2.38**	**41.31±0.75**	**43.64±0.82**	**77.39±3.75**	**80.66±4.40**
20. Цинамоилфенилетиламин	n.d	n.d.	n.d	n.d.	n.d	n.d.
Допамин	62.22±2.92	69.36±2.47	66.08±4.59	67.89±3.28	74.32±4.56	78.59±4.30

Таблица 4. Антирадикалова активност (RSA%) на синтезираните амиди и референтни съединения спрямо DPPH$^{\bullet}$.



Фигура 31. Кинетика на реакцията между кафеена киселина и кафеоиламиди с DPPH˙ (Концентрация 3.6mM).

I.1.3. Изследване на инхибиращото действие на синтезираните амиди върху липидно перокисление.

Основавайки се на резултатите от определяне на антирадикаловата активност на синтезираните амиди спрямо DPPH˙, избрахме осем най-активни производни (кафеоилдопамин, цинамоилдопамин, *p*-кумароилдопамин, ферулоилдопамин, синапоилдопамин, кафеоилфенилетиламин, кафеоилтирамин и кафеоилтриптамин) за определяне на антиоксидантната им активност спрямо автоокислението на триацилглицероли на слънчогледово масло. Количествена мярка за ефективността на антиоксидантите е стабилизационният фактор (F), който се определя по формулата:

$F = IP_{add} / IP_o$,

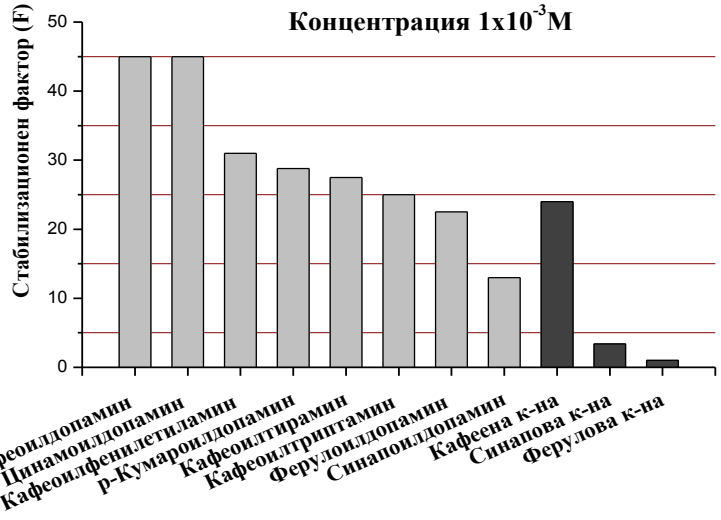
където IP_{add} е индукционният период в присъствие на изследваното съединения, а IP_o е индукционният период на контролната проба. Колкото е по-дълъг индукционният период,

толкова е по-ефективен инхибиторът на окислението - при него бавно се натрупват на пероксиди. Към края му, когато концентрацията на инхибитора е силно намаляла, започва бързо натрупване пероксиди и вторични продукти на окислението. Стабилизационният фактор изразява способността на даден инхибитор да прекъсва верижно радикаловата реакция при автоокислението на липидите чрез взаимодействието му с пероксидни радикали по реакцията:

$LO_2^{\bullet}$ + InH ⟶ LOOH + $In^{\bullet}$, където

$LO_2^{\bullet}$ - пероксиден радикал на ненаситена мастна киселина;
InH – инхибитор;

Ако стойността на (F) е 1, то пробата няма антиоксидантна активност. Като референти бяха използвани кафеена, синапова и ферулова киселини. Канелена и *p*-кумарова к-ни са неактивни при тези условия. Резултатите, представени на **фигура 33** показват, че почти всички амиди проявяват отлична антиоксидантна активност, по-висока или сравнима с тази на кафеената киселина.



Фигура 33. Стабилизиционни фактори на изследваните амиди.

Антиоксидантната активност на амидите намалява в реда кафеоилдопамин ≈ цинамоилдопамин > кафеоилфенилетиламин > *p*-кумароилдопамин > кафеоилтирамин > кафеоилтриптамин ≈ кафеена к-на > ферулоилдопамин > синапоилдопамин. Тук присъствието на метокси групи в молекулите (ферулоилдопамин и синапоилдопамин) намалява антиоксидантната ефективност (за разлика от синапова и ферулова киселини).

II.1.4. Изследване на антимикробното действие на синтезираните амиди.

Тринадесет от синтезираните амида (съединения **1**, **2**, **3**, **4**, **7**, **9**, **10**, **11**, **13**, **14**, **15**, **16**, **и 19)**, показали най-висока радикал улавяща активност, бяха подложени на изследване за антимикробна активност срещу четири Грам-положителни щама бактерии (*Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Bacillus subtilis* 1A95, *Listeria monocytogenes* C12) и срещу патогенната гъба *Candida albicans* 62. Минималната инхибираща концентрация (MIC) на всяко съединение е определена по метода на серийното разреждане в течна хранителна среда. Като положителна контрола бяха използвани свободните канелени киселини, антибиотикът тобрамицин и противогъбичния препарат кетоконазол. Резултатите от анализите са представени в **таблица 6**. Стойностите за MIC на тестваните съединения са от 62.5 до 500 μg/ml. Ферулоилтирамин, ферулоилдопамин и синапоилтирамин показват най-висока активност срещу *S. aureus* (MIC 62.5 μg/ml). Синапоилфенилетиламин, р-кумароилдопамин, ферулоилтриптамин и кафеоилтриптамин показват средна активност срещу *S. aureus* (MIC 125 μg/ml). Най-активни срещу *S. Pyogenes* са синапоилтриптамин, синапоилтирамин и кафеоилтриптамин (MIC 62.5 μg/ml). Синапоилфенилетиламин, *p*-кумароилдопамин, ферулоилтриптамин, ферулоилтирамин, ферулоилдопамин и цинамоилдопамин показват също средна активност срещу този патоген (MIC 125 μg/ml). От изследваните амиди само кафеоилфенилетиламинът показа активност срещу *L. monocytogenes*

(MIC 125 μg/ml). Антигъбичната активност на кафеоилтирамин и кафеоилдопамин спрямо *C. Albicans* се оказа съизмерима с тази на свободната кафеена киселина. Последните два амида имат и най-висока радикал улавяща активност спрямо DPPH радикала.

Никое от тестваните съединения не показа активност спрямо бактерията *Bacillus subtilis*.

От получените резултати може да се заключи, че почти половината от изследваните съединения са два пъти по-активни срещу *S.aureus* и *S.pyogenes*, сравнено със свободните киселини, и са между два и осем пъти по-слабо активни, сравнено с останалите два референта.

Съединение	Микроорганизми					
	S. aureus	*S. pyogenes*	*B. subtilis*	*L. monocytogenes*	*C. albicans*	Разтворител
	MIC					
1. Синапоилтриптамин	↓ 250	↑ 62.5	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
2. Синапоилтирамин	↑ 62.5	↑ 62.5	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
3. Синапоилдопамин	↓ 250	↓ 250	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
4. Синапоилфенилетиламин	→ 125	→ 125	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
7. *p* -Кумароилдопамин	→ 125	→ 125	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
9. Ферулоилтриптамин	→ 125	→ 125	↓ 250	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
10. Ферулоилтирамин	↑ 62.5	→ 125	↓ 250	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
11. Ферулоилдопамин	↑ 62.5	→ 125	↓ 250	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
13. Кафеоилтриптамин	→ 125	↑ 62.5	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
14. Кафеоилтирамин	↓ 250	↓ 250	↓ 250	↓ 250	→ 125	DMSO
15. Кафеоилдопамин	↓ 250	↓ 250	↓ 250	↓ 250	→ 125	DMSO
16. Кафеоилфенилетиламин	↓ 250	↓ 250	↓ 500	→ 125	↓ 250	DMSO
19. Цинамоилдопамин	↓ 500	→ 125	↓ 500	↓ 500	↓ 500	96%EtOH
Канелена киселина	-	→ 125	-	-	-	96%EtOH
Ферулова киселина	→ 125	→ 125	-	-	-	96%EtOH
Кафеена киселина	→ 125	→ 125	-	-	→ 125	96%EtOH
Синапова киселина	→ 125	→ 125	-	-	-	96%EtOH
p -Кумарова киселина	-	→ 125	-	-	-	96%EtOH
Кетоконазол	-	-	-	-	↑ 7.81	DMSO
Тобрамицин	↑ 15.62	↑ 7.81	↑ 1	↑ 62.5	-	Вода

Таблица 6. Антимикробна активност на цинамоил и хидроксицинамоил амиди с ароматни амини. (MIC (μg/ml)).

***Легенда*: Зелена стрелка – мн. добра до средна активност; Жълта стрелка – гранична активност; Червена стрелка – слаба активност до неактивно.**

***Бележка*: Номерацията на съединенията отговаря на тази в таблица 3.**

I.1.5. Изследване на тирозиназната активност на синтезираните амиди.

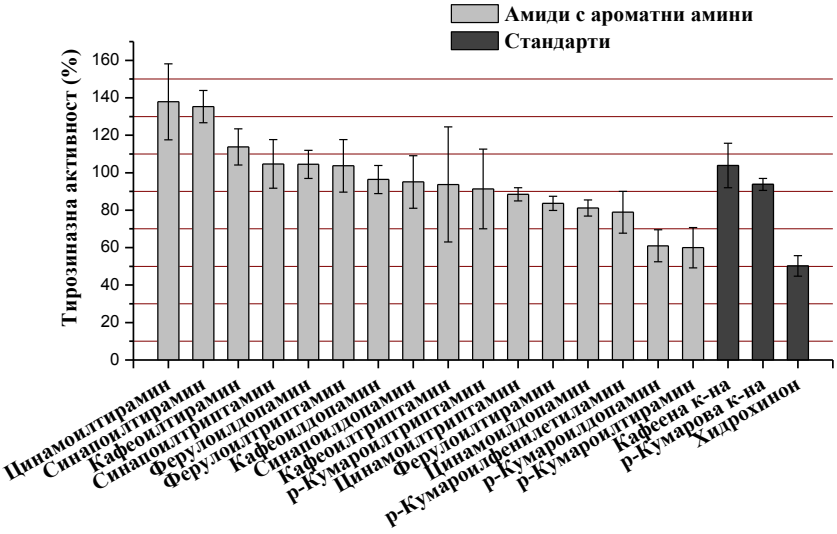
Много съединения от фенолен тип проявяват наред с антиоксидантна и антитирозиназна активност. Това ни провокира да изследваме и тирозиназната активност на синтезираните амиди.

Изследването бе проведено по метода на *Kwak* чрез спектрометрично измерване на абсорбцията на референтен разтвор (А) и на разтвор, съдържащ изследваното съединение(В), при 475 nm.

Тирозиназната активност (ТА) се определя по формулата:

$$\% \text{ ТА} = \text{B/A} \times 100$$

Като стандарти бяха използвани хидрохинон, *p*-кумарова и кафеена киселини. Резултатите от изследването са представени на **фигура 34.**



Фигура 34. Тирозиназна активност на цинамоил амиди при концентрация 200 μM.

Колкото е по-ниска стойността на %ТА , толкова е по-ефективно инхибирането на ензима. От фигурата се вижда, че производните на *p*-

кумаровата киселина притежават значителна инхибиторна активност. Тези резултати подкрепят по-рано докладвани данни за значимостта на *p*-хидроксилните групи в бензеновото ядро при търсенето на ефективни тирозиназани инхибитори. Производните на *p*-кумарова киселина с допамин и тирамин показаха инхибиторна активност близка до тази на хидрохинон и по-добра от тази на свободната *p*-кумарова киселина, които се използват като стандартни тирозиназни инхибитори. Останалите съединения показаха по-слаба активност от хидрохинона. Последният все още се използва в козметиката като избелващо средство, въпреки че има съмнения за безопасността му върху здравето. Установените стойности за ТА над 100% показват, че тестваните съединения се явяват по-скоро като субстрат за ензима, отколкото негов инхибитор. В това отношение ясно се открояват първите три производни с тирамин (**фигура 34)**. Резултатите показват, че въпреки структурното сходство между субстратите за ензима (тирозин и DOPA) и аминната част (тирамин и допамин) в молекулите на амидите, структурно подобни вещества могат да играят роля както на инхибитор, така и на кофактор за изследвания ензим. По-високата инхибиторна активност на *p*-кумароиламидите по отношение на свободната киселина отново показва значението на амидната връзка. Вероятно киселинният остатък от молекулата на амида се свързва с активния център на ензима, а аминният остатък стабилизира това свързване чрез допълнително взаимодействие с аминокиселинните остатъци от ензима. Този извод се подкрепя от проявената по-слаба активност на *p*-кумароилтриптамина в сравнение с другите амиди на *p*-кумаровата киселина. Вероятно стерични фактори и отсъствието на хидроксилни групи при триптамина затрудняват свързването на *p*-кумароилтриптамина към активния център на ензима.

I.2. АМИДИ НА ЗАМЕСТЕНИ КАНЕЛЕНИ КИСЕЛИНИ С АРОМАТНИ АМИНОКИСЕЛИНИ

I.2.1. Получаване по стандартни методи на пептидната химия в разтвор.

За синтеза на тази група съединения бе приложено директно взаимодействие между фенолните киселини и аминогрупата на аминокиселините в присъствие на активиращи реагенти. Бяха използвани същите канелени киселини (I.1.1.), а като аминокиселини – метилови или третични бутилови естери на *L*-фенилаланин, *L*-тирозин, 3,4-дихидрокси-*L*-фенилаланин и *L*-триптофан. Тези аминокиселини са биогенетични предшественици на разглежданите в глава I.1. ароматни амини. Получените производни бяха изолирани чрез колонна или препаративна TLC. Чистотата им бе доказана чрез Високо ефективна течна хроматография и елементен анализ. Всички продукти са охарактеризирани чрез УВ, ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР.

Отнасянията в УВ спектрите на синтезираните амиди са подобни на тези описани вече в II.1.1. Присъстват две области на поглъщане от 203 до 250 nm и от 250 до 350 nm съответно с по един или два максимума във всяка област при около 210, 220, 280 и 320 nm.

Структурата на синтезираните амиди бе потвърдена и чрез извършения ^{1}H и ^{13}C-ЯМР. Сигналите за амидната връзка са със същото отместване, както и при цинамоиламидите с ароматни амини. В спектрите отсъстват сигнали за *Z* конфигурация на двойната връзка от цинамоилния остатък в молекулите на амидите. Допълнително в ^{1}H-ЯМР и спектрите на амидите с ароматни аминокиселини присъстват интензивен синглет при около 3.6 ppm за трите протона от метиловата естерна група (COOC**H$_3$**) и синглет в ^{13}C-ЯМР при 52.0 ppm за въглеродния атом от същата група (COO**C**H$_3$). При 172.5 ppm присъства сигнал за карбонилен С-атом от естерна група (**C**OOCH$_3$). При 1.35 ppm в ^{1}H-ЯМР се наблюдава интензивен синглет за протоните от третичната бутилова група (9H, 3 x CH$_3$), а при 28.1 ppm в ^{13}C-ЯМР за въглеродните атоми от същата група (3 x **C**H$_3$). Освен

това в ^{1}H-ЯМР спектъра се наблюдават и три дублета или мултиплет при 4.5 ppm за протона от NH-C**H** групата, принадлежащи на аминокиселинния остатък. Синглетът при около 54.0 ppm в ^{13}C-ЯМР се дължи на С-атома от същата група.

Два от синтезираните двадесет амида са нови, неописани в литературата (метиловите естери на цинамоил- и синапоил- DOPA). На **схема 19 и таблица 7** са представени получените производни, условията на провеждане на реакциите и добивите.

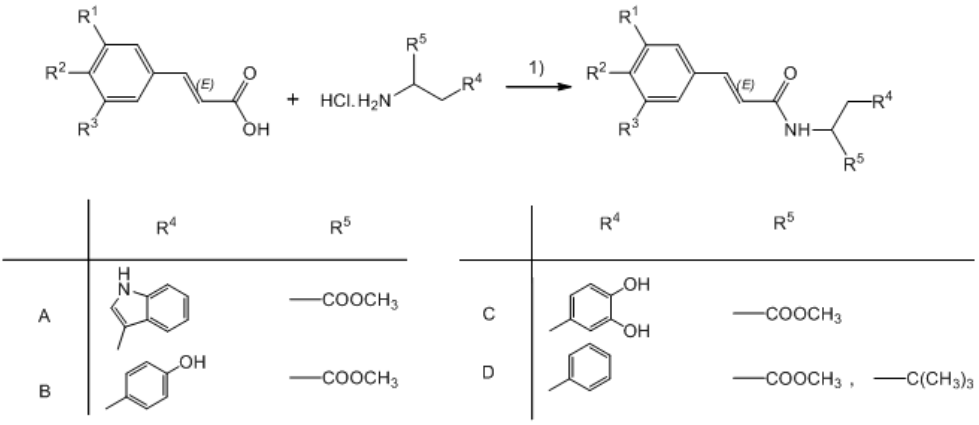


Схема 19. Синтез на цинамоил амиди с ароматни аминокиселини. Реагенти и условия: 1) EDC, HOBt и Et_3N в DMF. Реакционно време от 4÷24 часа.

Съединение	R^1	R^2	R^3	R^4	Добив %
21.Синапоилтриптофан-OMe	OCH_3	OH	OCH_3	A	46
22.Синапоилтирозин-OMe	OCH_3	OH	OCH_3	B	40
23.Синапоил-DOPA-OMe	OCH_3	OH	OCH_3	C	25
24.Синапоилфенилаланин-OBu^t	OCH_3	OH	OCH_3	D	47
25.*p* -Кумароилтриптофан-OMe	H	OH	H	A	57
26.*p* -Кумароилтирозин-OMe	H	OH	H	B	52
27.*p* -Кумароил-DOPA-OMe	H	OH	H	C	22
28.*p* -Кумароилфенилаланин-OBu^t	H	OH	H	D	74
29.Ферулоилтриптофан-OMe	OCH_3	OH	H	A	61
30.Ферулоилтирозин-OMe	OCH_3	OH	H	B	62
31. Ферулоил-DOPA-OMe	OCH_3	OH	H	C	22
32. Ферулоилфенилаланин-OBu^t	OCH_3	OH	H	D	45
33. Кафеоилтриптофан-OMe	OH	OH	H	A	55
34. Кафеоилтирозин-OMe	OH	OH	H	B	48
35. Кафеоил-DOPA-OMe	OH	OH	H	C	20
36. Кафеоилфенилаланин-OMe	OH	OH	H	D	49
37. Цинамоилтриптофан-OMe	H	H	H	A	81
38. Цинамоилтирозин-OMe	H	H	H	B	66
39. Цинамоил-DOPA-OMe	H	H	H	C	33
40. Цинамоилфенилаланин-OBu^t	H	H	H	D	71

Таблица 7. Цинамоил амиди с ароматни аминокиселини.

I.2.2. Изследване на радикал улавящото действие на синтезираните амиди спрямо DPPH˙.

Получените аминокиселинни амиди бяха тествани за способността им да улавят свободни радикали по методиката, използвана в I.1.2. Резултатите от това изследване са представени в **таблица 8**. С най-висока активност са производните на кафеената киселина и тези амиди, които съдържат остатък от метиловия естер на 3,4-дихидроксифенилаланин (*L*-DOPA). Най-активните съединения са изписани в таблицата с удебелен шрифт. Активността на амидите е дозо- зависима и корелира положително с концентрацията. Единствено изключение от последното твърдение е кафеоил-DOPA-OMe. При две различни концентрации (1.8 и 3.6 mM) това производно

показва много близки RSA стойности. Както вече се спомена, същият ефект се наблюдава и при кафеоилдопамина (I.1.2.). Резултатите показват, че най-висока активност проявяват амидите с катехолов остатък. Свързването на катехолов тип съединения към неактивни съединения като канелена и *p*-кумарова киселини води до многократно увеличаване на тяхната радикал улавяща активност. Тези резултати потвърждават по-рано описани в литературата данни за активността на катехол съдържащи антиоксиданти като ефективни уловители на радикали. Посочените в **таблица 8** данни са в много добра корелация с резултатите за %RSA на амидите с биогенни амини (**таблица 4**). И при двете групи амиди е очевидна съществената роля на катехолната група за нарастване на RSA, докато наличието на метокси групи в цинамоилната част намалява активността. Все пак ферулоил- и синапоил амидите с допамин и DOPA имат значително по-висока активност от съответните свободни киселини, което отново подчертава значението на амидната връзка.

Съединение	% (RSA)					
	0.9 mM		1.8 mM		3.6 mM	
	реакционно време (min.)					
	10'	20'	10'	20'	10'	20'
Кварцетин	40.43±0.32	45.18±0.52	46.68±0.15	58.36±0.15	76.01±0.20	78.05±0.15
D,L α-Токоферол	23.24±0.10	24.75±0.22	40.82±0.20	46.84±0.17	62.91±0.22	73.31±0.15
Евгенол	7.92±0.02	10.57±0.02	10.89±0.05	15.58±0.07	23.51±0.05	31.04±0.05
Изоевгенол	6.53±0.05	7.13±0.05	11.13±0.05	12.32±0.05	17.56±0.02	19.04±0.02
Синапова к-на	16.10±0.02	17.22±0.03	26.50±0.05	31.91±0.02	69.03±0.13	69.62±0.10
21.Синапоилтриптофан-OMe	13.67±2.55	14.63±2.61	25.97±2.04	27.30±1.59	48.14±2.22	49.92±1.57
22.Синапоилтирозин-OMe	14.17±2.11	15.55±2.09	23.14±1.84	25.01±1.56	42.96±2.38	45.28±1.90
23.Синапоил-DOPA-OMe	**23.80±3.00**	**25.37±2.16**	**43.94±1.77**	**45.75±2.43**	**80.92±3.39**	**82.75±3.17**
24.Синапоилфенилаланин-OBu^t	13.72±0.50	16.70±0.99	25.00±2.24	28.24±0.25	46.82±0.25	50.60±0.25
p -Кумарова к-на	2.10±0.05	2.90±0.07	3.70±0.05	4.70±0.10	4.50±0.07	6.10±0.10
25.*p* -Кумароилтриптофан-OMe	1.92±0.61	2.13±0.88	1.69±0.63	2.37±0.51	2.42±1.18	2.88±2.15
26.*p* -Кумароилтирозин-OMe	0.64±0.43	0.71±0.34	1.04±0.30	1.42±0.42	1.44±0.46	1.88±0.27
27.*p* -Кумароил-DOPA-OMe	**17.99±1.54**	**19.10±1.26**	**33.32±4.49**	**34.83±4.66**	**64.41±5.02**	**67.08±5.47**
28.*p* -Кумароилфенилаланин-OBu	1.97±0.70	2.30±0.29	1.89±1.12	2.23±1.11	2.46±0.49	2.92±0.25
Ферулова к-на	12.64±0.07	13.81±0.05	21.02±0.27	25.10±0.30	36.71±0.12	44.32±0.20
29.Ферулоилтриптофан-OMe	7.96±0.87	9.76±0.95	14.52±1.37	17.40±1.47	26.45±2.54	30.91±2.89
30.Ферулоилтирозин-OMe	7.04±1.22	8.79±1.43	13.65±1.00	16.25±1.64	24.84±2.33	29.25±2.20
31. Ферулоил-DOPA-OMe	**24.26±4.62**	**28.47±5.17**	**44.82±6.53**	**50.60±6.62**	**83.76±4.85**	**86.95±1.43**
32. Ферулоилфенилаланин-OBu^t	10.91±2.24	13.51±1.74	19.50±0.25	23.63±0.25	30.42±0.50	36.90±0.55
Кафеена к-на	33.50±0.99	34.10±0.57	62.11±2.52	64.28±2.89	88.04±1.78	91.83±1.61
33. Кафеоилтриптофан-OMe	**27.11±5.22**	**28.70±5.47**	**44.62±4.22**	**50.43±4.22**	**80.11±1.99**	**87.90±0.75**
34. Кафеоилтирозин-OMe	**27.39±1.07**	**28.66±0.99**	**51.01±2.85**	**52.53±3.23**	**89.61±0.83**	**90.20±0.44**
35. Кафеоил-DOPA-OMe	**44.81±6.11**	**50.48±6.71**	**82.46±6.50**	**86.01±2.48**	**88.73±0.23**	**88.81±0.59**
36. Кафеоилфенилаланин-OMe	**28.80±1.16**	**29.74±0.86**	**53.48±3.12**	**54.65±3.54**	**90.34±0.27**	**90.49±0.38**
Канелена к-на	0.30±0.11	0.32±0.10	0.32±0.10	0.35±0.20	0.32±0.20	0.32±0.30
37. Цинамоилтриптофан-OMe	0.79±0.29	0.69±0.34	1.20±0.48	1.41±0.06	1.18±0.94	1.48±0.61
38. Цинамоилтирозин-OMe	1.74±0.13	2.12±0.43	2.05±1.36	2.30±1.43	2.12±0.52	2.57±0.45
39. Цинамоил-DOPA-OMe	**24.42±0.70**	**26.60±0.61**	**45.53±3.19**	**48.42±3.16**	**84.99±4.30**	**88.11±4.08**
40. Цинамоилфенилаланин-OBu^t	2.00±1.10	2.52±0.75	2.39±1.44	2.60±1.79	2.18±1.22	2.58±0.88

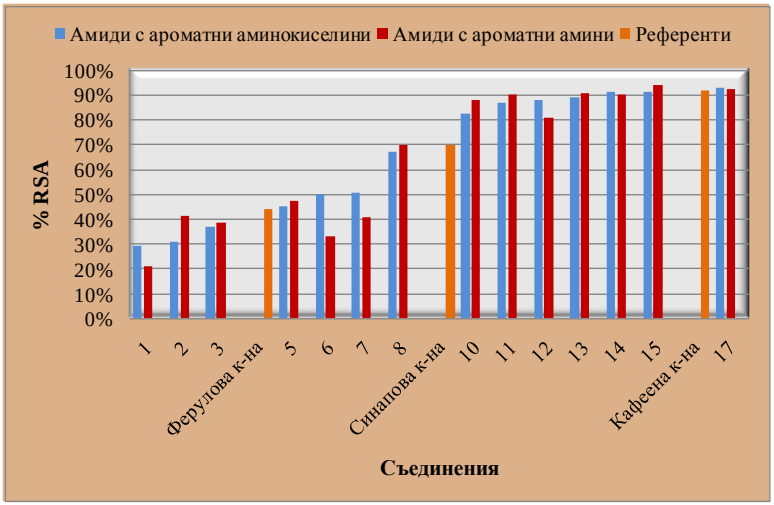
Таблица 8. Радикал улавяща активност (%RSA) на синтезираните амиди спрямо DPPH$^{\bullet}$.

Сравнението на радикал улавящата активност на цинамоил- и хидроксицинамоил амидите на ароматни амини и на съответните им аминокиселинни предшественици е представено на **таблица 9** и **фигура 35**. Сравнени са съединения, показали антирадикалова активност над 20% при концентрация 3.6 mM.

	Амиди с ароматни аминокиселини		Амиди с ароматни амини	
	Съединение	%RSA	Съединение	%RSA
1	Ферулоилтирозин-OMe	29.25	Ферулоилтирамин	21.20
2	Ферулоилтриптофан-OMe	30.91	Ферулоилтриптамин	41.46
3	Ферулоилфенилаланин-OBu^t	36.92	Ферулоилфенилетиламин	38.85
4	**Ферулова к-на**	44.32	**Ферулова к-на**	44.32
5	Синапоилтирозин-OMe	45.28	Синапоилтирамин	47.45
6	Синапоилтриптофан-OMe	49.92	Синапоилтриптамин	33.25
7	Синапоилфенилаланин-OBu^t	50.62	Синапоилфенилетиламин	41.06
8	*p* -Кумароил-DOPA-OMe	67.08	*p* -Кумароилдопамин	69.64
9	**Синапова к-на**	69.62	**Синапова к-на**	69.62
10	Синапоил-DOPA-OMe	82.75	Синапоилдопамин	87.86
11	Ферулоил-DOPA-OMe	86.95	Ферулоилдопамин	90.47
12	Цинамоил-DOPA-OMe	88.11	Цинамоилдопамин	80.66
13	Кафеоилтриптофан-OMe	88.94	Кафеоилтриптамин	90.82
14	Кафеоилтирозин-OMe	91.20	Кафеоилтирамин	89.95
15	Кафеоилфенилаланин-OMe	91.49	Кафеоилфенилетиламин	94.21
16	**Кафеена к-на**	91.83	**Кафеена к-на**	91.83
17	Кафеоил-DOPA-OMe	92.81	Кафеоилдопамин	92.49

Таблица 9. Сравнение на антирадикаловата активност на двете групи амиди.

Както се вижда от **фигура 35**, въпреки сравнително близките активности на двете групи амиди, наблюдават се няколко случая на разлики в RSA над 5% до 17 %. В два от тях амидите с ароматни амини са по-активни (двойка № 2 и 10), а при четири от случаите по-активни са аминокиселинните амиди на ферулова, синапова и канелена киселини (двойка № 1, 6, 7 и 12).

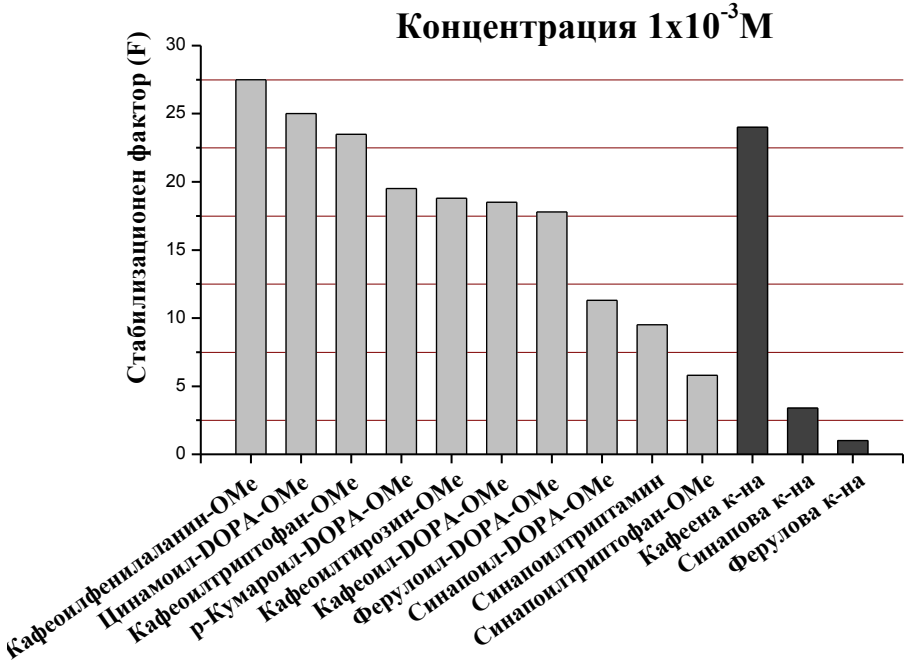


Фигура 35. Сравнение на RSA на цинамоил амиди с ароматни амини и аминокиселинните им предшественици.
***Бележка*: Номерацията на съединенията отговаря на тази в таблица 9.**

I.2.3. Изследване на инхибиращото действие на синтезираните амиди върху липидно перокисление.

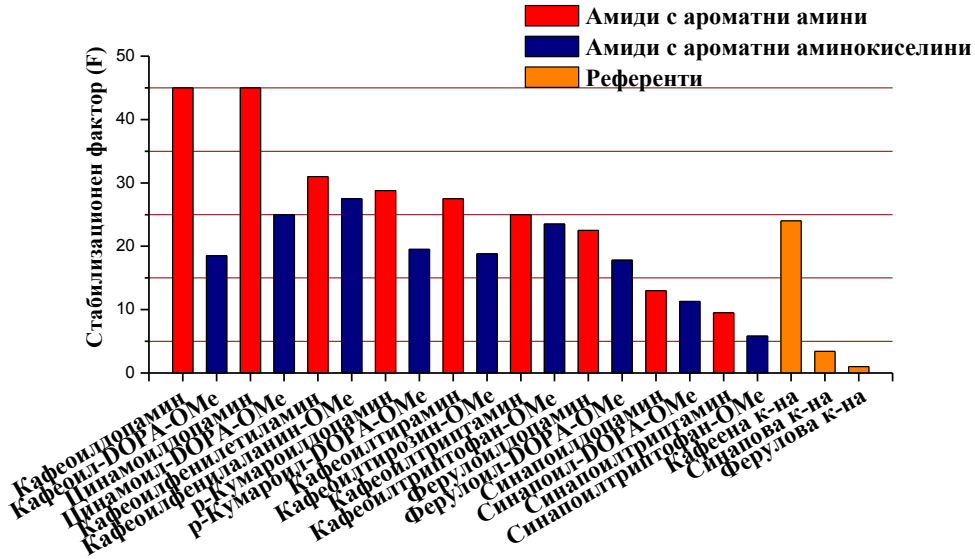
Инхибиращото действие върху липидното перокисление на тази група съединения е изразено чрез стабилизационния фактор (F) (**фигура 36**). Като референти бяха използвани кафеена, синапова и ферулова киселини. Резултатите показват, че кафеоилфенилаланин-OMe, цинамоил-DOPA-OMe и кафеоилтриптофан-OMe проявяват по-висока ефективност от кафеена киселина. Всички останали амиди са по-активни от свободните ферулова и синапова киселини. За оценка влиянието на индоловия пръстен в синтезираните амиди върху липидното перокисление бяха избрани за сравнение съединенията с най-ниска активност (синапоилтриптамин и синапоилтриптофан-OMe). При тях влиянието на индоловия пръстен няма да се припокрие от високата активност на катехоловата група. Резултатите показват положително влияние на индоловия пръстен върху инхибирането на липидното перокисление, което е съответно три и два пъти по-

ефективно при синапоилтриптамина и синапоилтриптофана спрямо свободната синапова киселина. Това сравнение, подчертаващо инхибиращата роля на индоловия пръстен, е в съгласие с литературни данни, според които индол съдържащи съединения стимулират антиоксидантните ензимни системи.



Фигура 36. Стабилизиционни фактори на изследваните амиди.

При сравняване на инхибирането на липидното перокисление от цинамоил амидите с ароматни амини и с аминокиселинните им предшественици (**фигура 37**) се вижда, че амидите с ароматни амини при всички случаи проявяват по-висока активност, като при някои от тях активността е два пъти по-висока.



Фигура 37. Сравнително представяне на инхибирането на липидно перокисление.

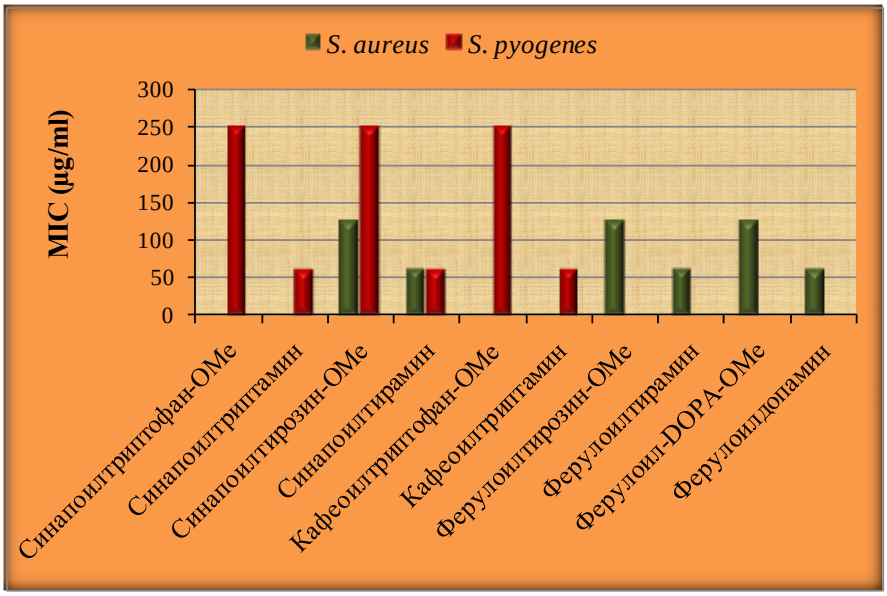
II.2.4. Изследване на антимикробното действие на синтезираните амиди.

За изследване на антимикробната активност бяха избрани пет аминокиселинни амида. Влизащите в състава им аминокиселини са биогенетични предшественици на онези ароматни амини, за чиито цинамоил амиди установихме най-високо антимикробно действие (глава I.1.4.). Техните MIC стойности бяха определени срещу две Грам-положителни щама бактерии: *Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535. Резултатите от анализите са представени в **таблица 10.** Стойностите са определени от три последователни измервания.

Съединение	Микроорганизми				Разтворител
	S. aureus		*S. pyogenes*		
	MIC				
21.Синапоилтриптофан-OMe		-	⇩	250	96%EtOH
22.Синапоилтирозин-OMe	⇨	125	⇩	250	96%EtOH
30.Ферулоилтирозин-OMe	⇨	125		-	96%EtOH
31. Ферулоил-DOPA-OMe	⇨	125		-	96%EtOH
33. Кафеоилтриптофан-OMe		-	⇩	250	96%EtOH
Ферулова киселина	⇨	125	⇨	125	96%EtOH
Кафеена киселина	⇨	125	⇨	125	96%EtOH
Синапова киселина	⇨	125	⇨	125	96%EtOH
Тобрамицин	⇧	15.62	⇧	7.81	Вода

Таблица 10. Антимикробна активност на хидроксицинамоил амиди с аминокиселини. (MIC (μg/ml)).
***Легенда*: Зелена стрелка – мн. добра до средна активност; Жълта стрелка – гранична активност; Червена стрелка – слаба активност до неактивно.**
***Бележка*: Номерацията на съединенията отговаря на тази в таблица 7.**

Както се вижда от таблицата, стойностите за MIC на изследваните съединения са 125 и 250μg/ml. Активността им е еднаква с тази на свободните киселини. Срещу бактерията *Streptococcus pyogenes* амидите са неактивни. На **фигура 38** графично е сравнена антибактериалната активност на най-активните от двете групи амиди. От нея ясно се вижда, че цинамоил амидите с ароматни амини са по-активни от тези със съответните аминокиселини. Тези резултати биха могли да се обяснят с наличието на естерифицирана хидроксилна група в аминокиселинните остатъци. Нейното влияние е свързано с промяна на полярността, отговорна за преминаването на молекулата през клетъчната стена на бактериите.



Фигура 38. Сравнение на антибактериалната активност на двете групи амиди.

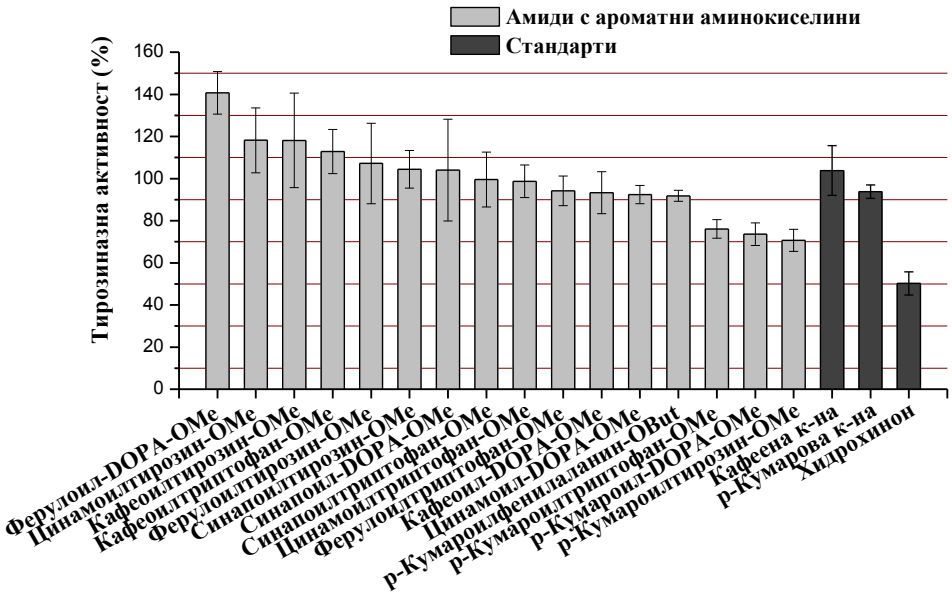
Последното предположение се потвърждава от стойностите за коефициента на разпределение в октанол/вода (Log P) на съответните амиди (**таблица 11**). По-високите стойности на Log P отговарят на по-хидрофобно съединение.

Съединение	Log P	Съединение	Log P
1.Синапоилтриптамин	2.43	21.Синапоилтриптофан-OMe	2.11
2.Синапоилтирамин	2.5	22.Синапоилтирозин-OMe	2.18
10.Ферулоилтирамин	2.62	30.Ферулоилтирозин-OMe	2.31
13. Кафеоилтриптамин	2.29	33. Кафеоилтриптофан-OMe	1.98
11. Ферулоилдопамин	2.23	31. Ферулоил-DOPA-OMe	1.92

Таблица 11. Стойности за Log P, теоретично изчислени със софтуер - „ChemBioDraw Ultra 11.0" на CambridgeSoft.
***Бележка*: Номерацията на съединенията отговаря съответно на тази в таблици 4 и 7 (структури и добиви).**

I.2.5. Изследване на тирозиназната активност на синтезираните амиди.

Резултатите от това изследването са представени на **фигура 39**. Данните показват, че *p*-кумароил- тирозин, DOPA и триптофан са най-ефективни като тирозиназни инхибитори. Активността им е с около 20÷25% по-ниска от тази на хидрохинона и с 17÷23% по-висока от активността на свободната *p*-кумарова киселина. Останалите съединения показват слаба инхибиторна активност.



Фигура 39. Тирозиназна активност на цинамоиламиди с ароматни аминокиселини.

На **фигура 40** са сравнени тирозиназните активности на цинамоил амидите от двете групи. Според резултатите, представени на последната фигура, амидите могат да се разделят условно на три групи:

1) Неутрални амиди, които не оказват влияние върху активността на ензима (с активност между 95÷105%). Към тях спадат:

- синапоилтирозин-OMe; синапоил-DOPA-OMe; синапоилдопамин; синапоилтриптофан-OMe; синапоилтриптамин.
- ферулоилдопамин; ферулоилтриптамин.
- кафеоилдопамин.
- цинамоилтриптофан метилов естер.

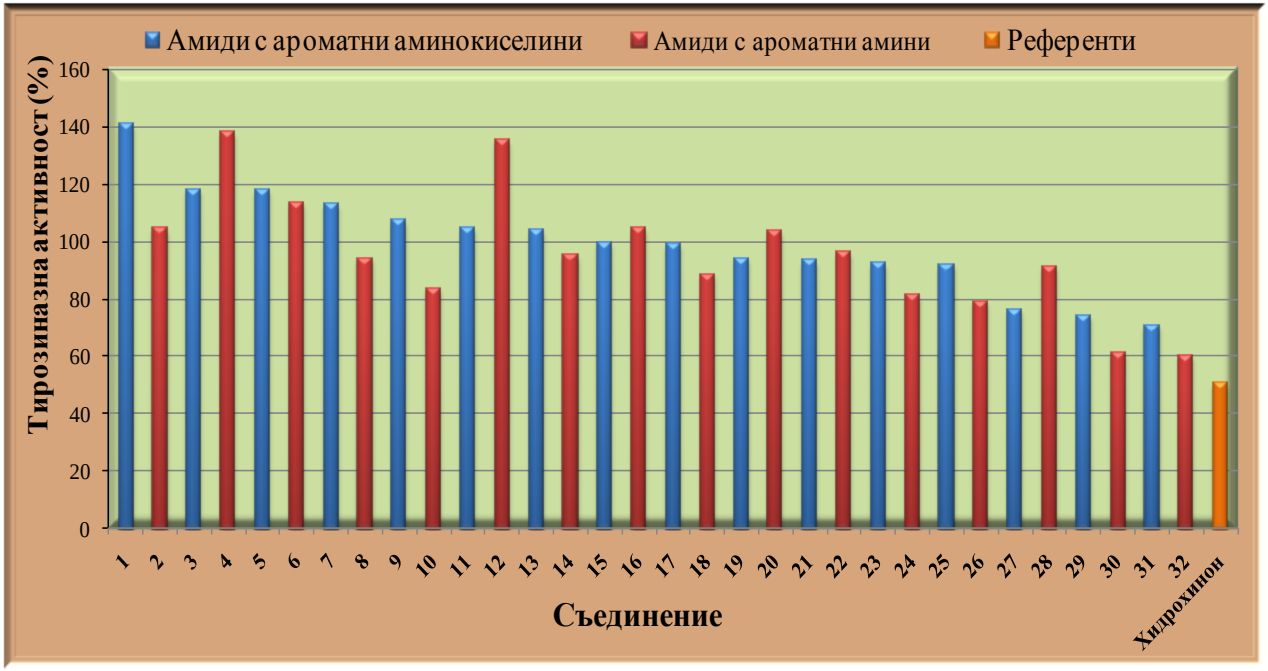
2) Амиди с протирозиназна активност (с активност между 110÷140%). Тук спадат:

- цинамоилтирозин-OMe; цинамоилтирамин.
- кафеоилтирозин-OMe; кафеоилтирамин.
- ферулоил-DOPA-OMe.
- синапоилтирамин.

3) Тирозиназни инхибитори (с активност между 90÷60%). Към тях спадат:

- цинамоилдопамин; цинамоилтриптамин.
- ферулоилтирамин.
- всички производни на *p*-кумарова киселина.

Горе представените резултати дават основание да се предположи, че подобието в структурата на синтезираните амиди (в техните киселинни и аминни остатъци) с тази на субстратите на ензима (*L*-DOPA и *L*-тирозин) е важен елемент за повлияване регулацията на ензима тирозиназа. От изследваните 32 амида, производните на *p*-кумарова киселина демонстрират най-висока инхибираща активност. Наличието на стерично незапречена хидроксилна група в *p*-позиция на цинамоилния остатък е от съществено значение за инхибирането, докато добавянето на втора хидроксилна или метокси групи в *орто* позиция спрямо *p*-хидроксилната група в същия пръстен намалява антитирозиназната активност. Тези изводи за корелация между *p*-кумароилови структури и антитирозиназна активност потвърждават и изследванията на други изследователски групи.



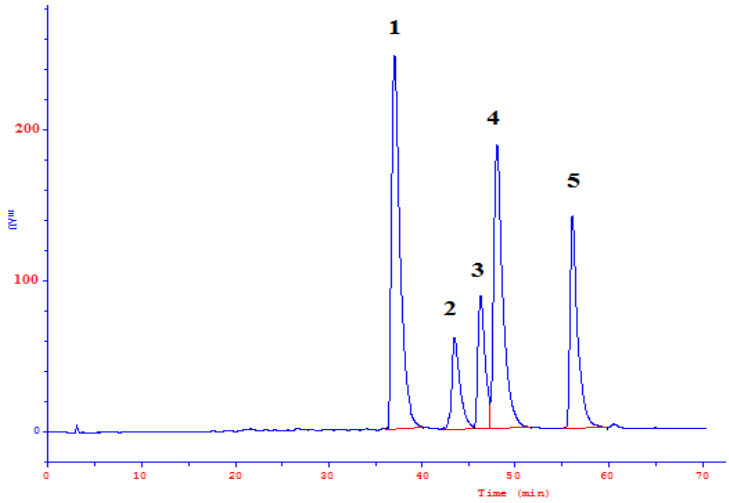
Фигура 40. Сравнителна графика на тирозиназната активност на амидите с ароматни аминокиселини и ароматни амини. Съединения: 1) Ферулоил-DOPA-OMe; 3) Цинамоилтирозин-OMe; 5) Кафеоилтирозин-OMe; 7) Кафеоилтриптофан-OMe; 9) Ферулоитирозин-OMe; 11) Синапоилтирозин-OMe; 13) Синапоил-DOPA-OMe; 15) Синапоилтриптофан-OMe; 17) Цинамоилтриптофан-OMe; 19) Ферулоилтриптофан-OMe; 21) Кафеоил-DOPA-OMe; 23) Цинамоил-DOPA-OMe; 25) *p*-Кумароилфенилаланин-OBu^t; 27) *p*-Кумароилтриптофан-OMe; 29) *p*-Кумароил-DOPA-OMe; 31) *p*-Кумароилтирозин-OMe. Съединенията с четни номера са съответните производни амиди с ароматни амини.

I.3. Разделяне на цинамоил- и хидроксицинамоил- амиди с ароматни амини чрез Високо ефективна течна хроматография.

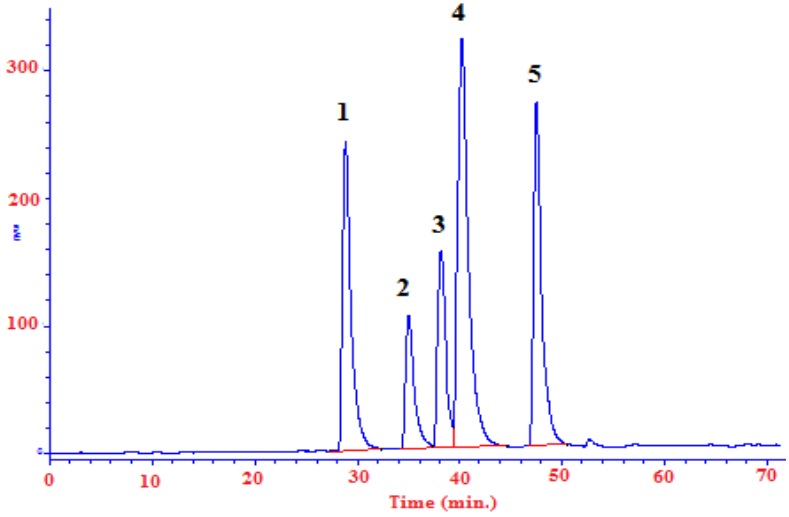
Амидите на канелени киселини с ароматни амини са по-разпространени в природата от аналозите им със съответните им аминокиселинни предшественици. В литературата има оскъдни и откъслечни данни за разделяне на смеси от тези производни чрез Високо ефективна течна хроматография, включващи единични представители. Поради това бе разработен метод за разделяне на цинамоил-, ферулоил-, кафеоил-, синапоил- и *p*-кумароил- амидите с тирамин, допамин, фенилетиламин и триптамин чрез Високо ефективна течна хроматография.

Разделянето на амидите чрез Високо ефективна течна хроматография бе извършено при следните условия: линеен градиент от 0 до 65% B за 80 мин., при поток от 1 мл/мин. Буфер A – 10% метанол в 50 mM фосфатен буфер (pH 4.6) и буфер B – 80% метанол в 50 mM фосфатен буфер (pH 4.6).

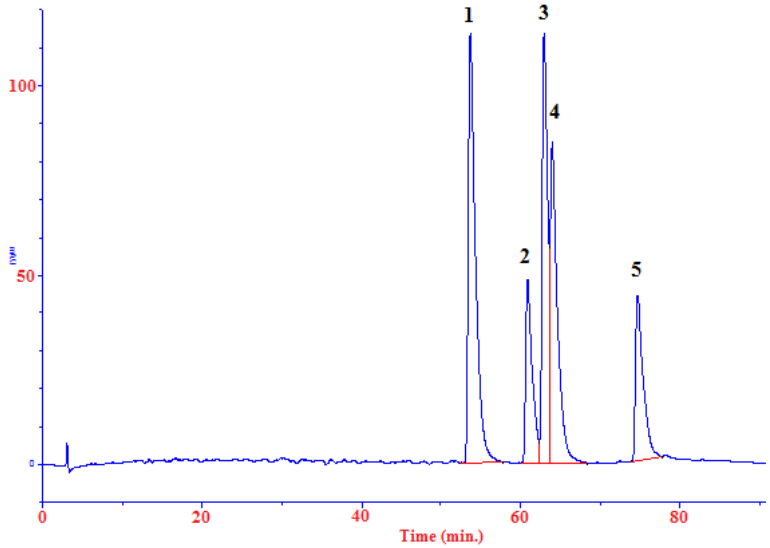
На **фигура 41** е представено разделяне на цинамоиламидите с тирамин чрез Високо ефективна течна хроматография. Разделянето на цинамоил- и хидроксицинамоил- амиди с допамин е представено на **фигура 42.** На **фигура 43** е представено разделяне на цинамоиламидите с фенилетиламин, а на **фигура 44** – с триптамин.



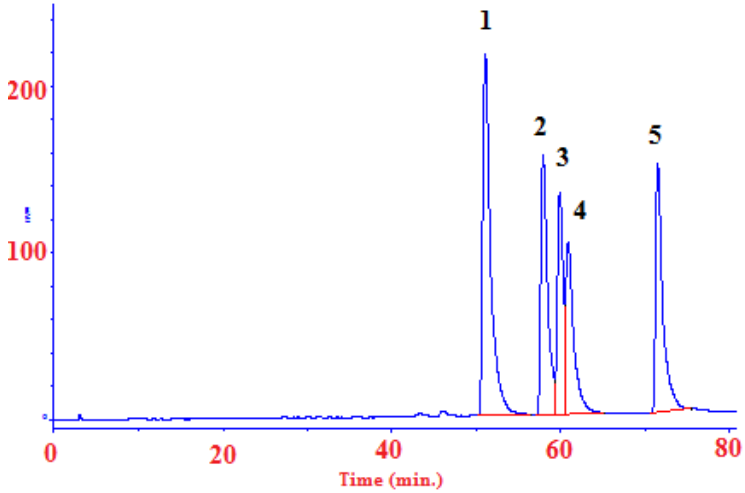
Фигура 41. Разделяне чрез Високо ефективна течна хроматография при 254 nm на кафеоилтирамин (1), *p*-кумароилтирамин (2), ферулоилтирамин (3), синапоилтирамин (4) и цинамоилтирамин (5).



Фигура 42. Разделяне чрез Високо ефективна течна хроматография при 254 nm на кафеоилдопамин (1), *p*-кумароилдопамин (2), ферулоилдопамин (3), синапоилдопамин (4) и цинамоилдопамин (5).

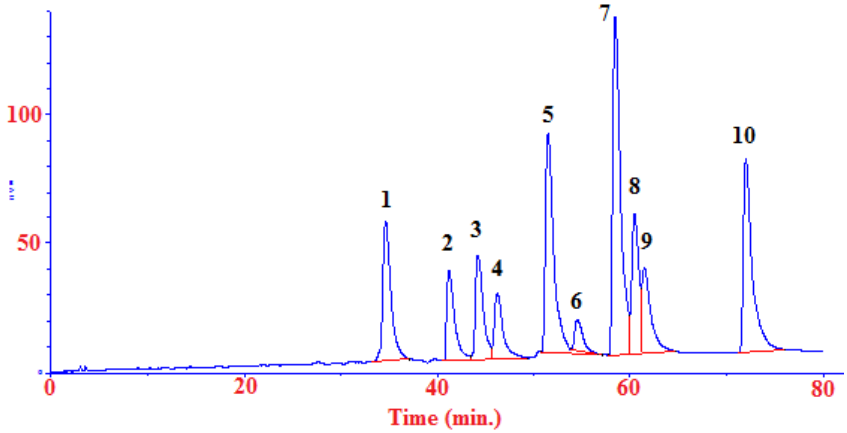


Фигура 43. Разделяне чрез Високо ефективна течна хроматография при 254 nm на кафеоилфенилетиламин (1), *p*-кумароилфенилетиламин (2), ферулоилфенилетиламин (3), синапоилфенилетиламин (4) и цинамоилфенилетиламин (5).



Фигура 44. Разделяне чрез Високо ефективна течна хроматография при 254 nm на кафеоилтриптамин (1), *p*-кумароилтриптамин (2), ферулоилтриптамин (3), синапоилтриптамин (4) и цинамоилтриптамин (5).

На **фигура 45** е представено разделяне на 10 амида чрез Високо ефективна течна хроматография.



Фигура 45. Разделяне чрез Високо ефективна течна хроматография при 280 nm на кафеоилтирамин (1), *p*-кумароилтирамин (2), ферулоилтирамин (3), синапоилтирамин (4), кафеоилтриптамин (5); цинамоилтирамин (6); *p*-кумароилтриптамин (7), ферулоилтриптамин (8), синапоилтриптамин (9) и цинамоилтриптамин (10).

II. Изследване на растителни обекти за наличие на цинамоил- и хидроксицинамоил амиди.

II.1. В семена на *Capsicum annuum*.

II.1.а. Получаване на извлеци от семена на C. annuum.

Семената са от български сорт Гороглед 6, чиято видова принадлежност е към *Capsicum annuum* L. ssp. *fasciculatum* ser. var. *macrocarpum* var. *Kapia*, любезно предоставени от доц. Николай Панайотов от Аграрен Университет – гр. Пловдив. В България този сорт пипер се използва за получаване на млян червен пипер. Семената са отпаден продукт при това производството.

Фракционирането на метанолния извлек от семената на *C. annuum* е представено на **схема 20**.

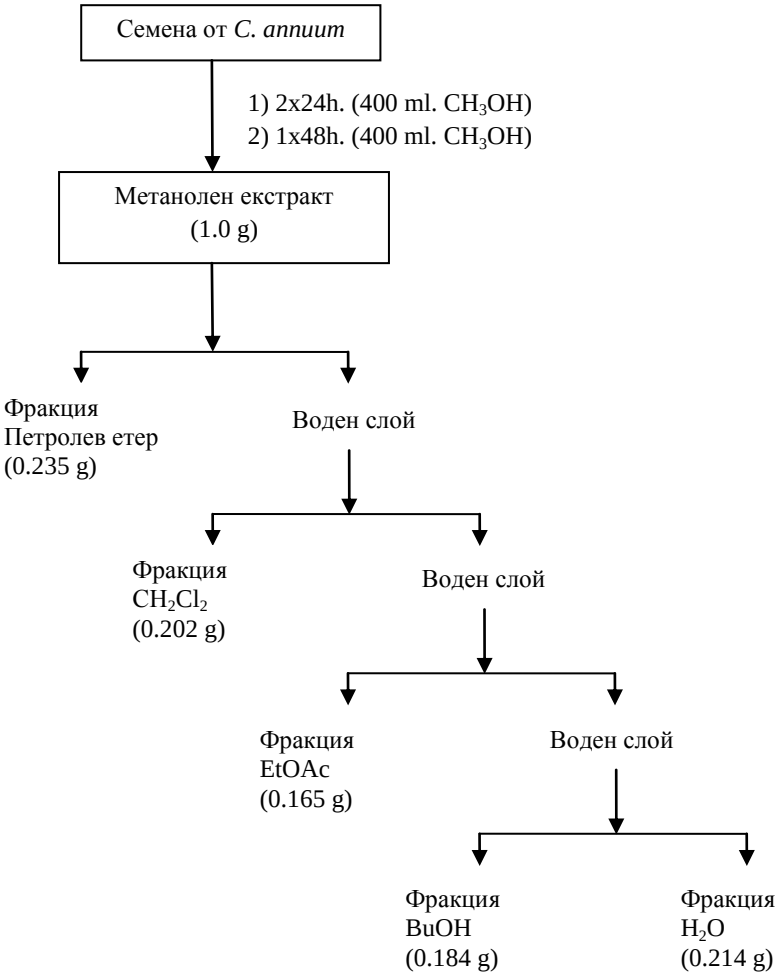


Схема 20. Фракциониране на метанолен екстракт, получен от семена на *C. annuum*.

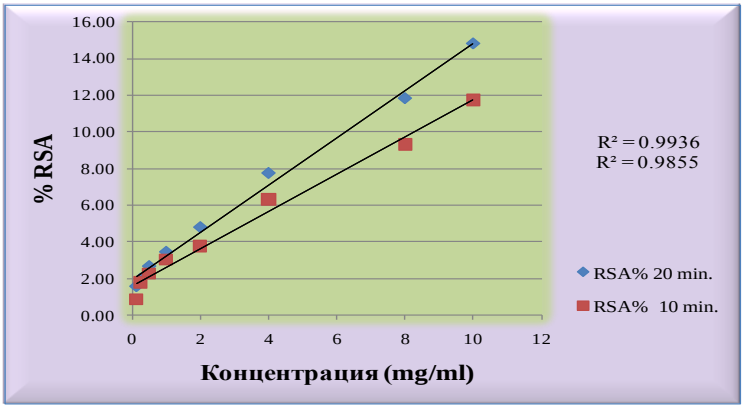
II.1.б. Изследване на радикал улавящото действие на получените фракции спрямо DPPH˙.

Получените резултати за RSA са представени в **таблица 12** и са средна стойност от три последователни измервания.

Тотален метанолен екстракт (концентрация mg/ml)	RSA%	
	10 min.	20 min.
10	11.74±1.32	14.83±1.44
8	9.31±1.76	11.84±1.67
4	6.31±1.09	7.75±0.63
2	3.76±0.16	4.79±0.34
1	3.02±0.93	3.44±0.16
0.5	2.26±0.89	2.66±0.87
0.25	1.79±0.34	1.98±0.55
0.125	0.87±0.75	1.56±0.74

Таблица 12. RSA на тотален метанолен екстракт.

RSA корелира положително с концентрацията. Зависимостта е линейна с коефициенти на корелация съответно за $10^{-та}$ и $20^{-та}$ минути – R^2=0.9855 и R^2=0.9936 (**фигура 49**).



Фигура 49. Зависимост на RSA от концентрацията.

Получените данни показват ниска активност при концентрация под 4 mg/ml. Поради това радикал улавящата активност на отделните фракции бе изследвана при концентрация 10 mg/ml. Получените

резултатите са представени в **таблица 13.** Оказва се, че етилацетатната фракция е с най-висока радикал улавяща активност (около 64%), която е близка до тази на използваните като референти силни антиоксиданти.

Референти и фракции екстракт	% (RSA) реакционно време (min.) 10'	20'	Концентрация
Кварцетин	76.01±0.20	78.05±0.15	3.6 mM
D,L α-Токоферол	62.91±0.22	73.31±0.15	3.6 mM
Метанолен екстракт	11.74±1.32	14.83±1.44	10 mg/ml
Фракция от дихлорметан	13.35±1.36	16.25±0.22	10 mg/ml
Фракция от етилацетат	46.13±0.54	63.92±0.74	10 mg/ml
Фракция от бутанол	9.19±0.84	12.88±1.17	10 mg/ml
Фракция вода	4.23±1.60	12.55±0.74	10 mg/ml

Таблица 13. Радикал улавяща активност на тоталния метанолен екстракт и отделните фракции.

II.1.в. Определяне на тотално фенолно съдържание.

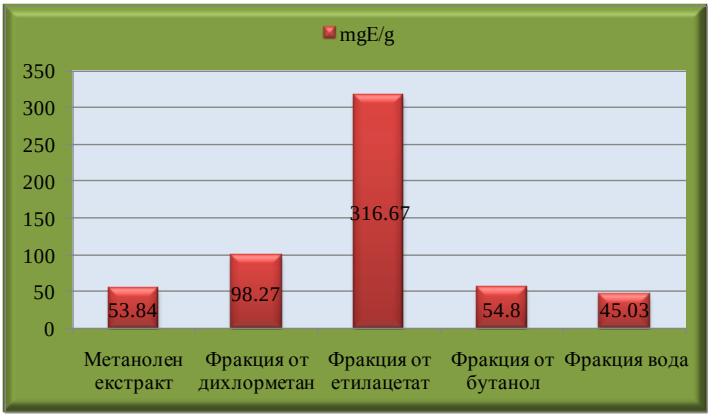
Тоталното фенолно съдържание се определя колориметрично с реагента на Folin-Ciocalteu ($3H_2O.P_2O_5.13\ WO_3.5MoO_3.10H_2O$). Реакцията, която протича с участие на фенолни и други съединения с редукционни свойства, е:

Mo(VI) (жълто) + e^- (от AH) → Mo (V) (синьо)

Анализът бе извършен по метода на *Попова* и *колектив* с използване на кафеена киселина за построяване на стандартна права. От нея се определя съдържанието на тотални феноли в екстрактите. Тоталните феноли са изразени като милиграм еквиваленти кафеена киселина за един грам екстракт (mgE/g).

Резултатите са представени графично на **фигура 51** и се припокриват отлично с тези от DPPH теста. От нея много ясно се вижда, че най-голямата част от фенолите се съдържа в етилацетатната фракция, последвана от дихлорометановата фракция. Последната

съдържа почти два пъти повече феноли от най-полярните фракции (бутанол и вода).



Фигура 51. Графично представяне на тотално фенолно съдържание в тоталния метанолен екстракт и неговите фракции.

II.1.г. Изследване на инхибиращото действие на метанолния екстракт върху липидно перокисление.

Метанолният екстракт не прояви инхибираща активност.

II.1.д. Изследване на антимикробното действие на тотален метанолен екстракт.

Минималната инхибираща концентрация на тоталния метанолен екстракт бе определена срещу четири Грам-положителни щама бактерии (*Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Bacillus subtilis* 1A95, *Listeria monocytogenes* C12) и срещу патогенната гъба *Candida albicans* 62. От представените в **таблица 15** резултати се вижда, че екстрактът проявява активност срещу четири патогена с MIC стойности от 62.5 µg/ml, а спрямо бактерията *L. monocytogenes* тази стойност е 125 µg/ml. Тези резултати са многообещаващи. Прави впечатление, че срещу бактерията *S.*

pyogenes повишаване на първоначална концентрация на екстракта от 1 на 2 mg/ml увеличава активността четири пъти, докато при останалите щамове увеличението е само два пъти. Освен това трябва да се отбележи, че бе изследвано антимикробното действие само на тоталния метанолен екстракт, но не и на неговите подфракции. Тъй като някои от фракциите се оказаха в пъти по активни при DPPH$^{\bullet}$ теста, при тях би могло да се очаква и по-висока антимикробна активност. Разбира се, за да се докаже това предположение са необходими допълнителни изследвания.

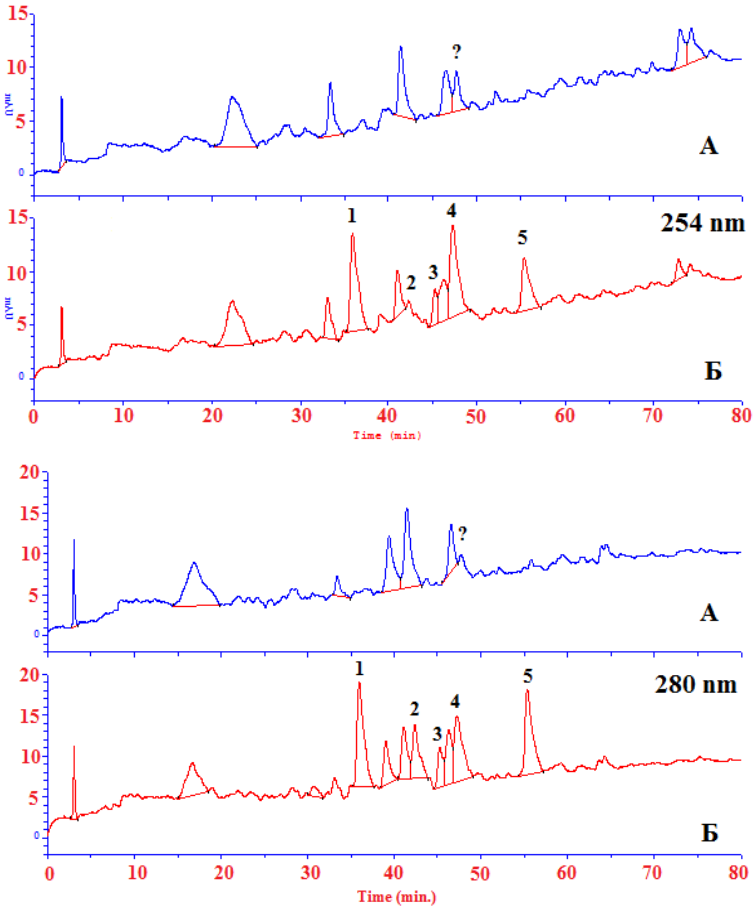
Съединение	Микроорганизми					Разтворител
	S. aureus	*S. pyogenes*	*B. subtilis*	*L. monocytogenes*	*C. albicans*	
	MIC					
Тобрамицин	↑ 15.62	↑ 7.81	↑ 62.2	↑ 1	-	Вода
Кетоконазол	-	-	-	-	↑ 7.81	DMSO
Екстракт 1 mg/ml	→ 125	↓ 250	-	-	→ 125	96%EtOH
Екстракт 2 mg/ml	↑ 62.5	↑ 62.5	→ 125	↑ 62.5	↑ 62.5	96%EtOH

Таблица 15. Антимикробно изследване на тотален метанолен екстракт. (MIC (µg/ml)).
***Легенда*: Зелена стрелка – мн. добра до средна активност; Жълта стрелка – гранична активност; Червена стрелка – слаба активност до неактивно.**

II.1.е. Изследване на семена на Capsicum annuum за наличие на хидроксицинамоил амиди.

В литературата се съобщава, че в цветовете от *C.annuum* се съдържат ферулоил- и *p*-кумароилтирамин. Няма данни за съдържание на цинамоил амиди в семената на този растителен източник. Това ни насочи към изследването им за съдържание на разглежданите производни. TLC анализът на получените фракции от метанолния извлек от семената на *C.annuum* даде указание, че тези цинамоил амиди с ароматни амини би трябвало да са концентрирани главно в дихлорометановия и етилацетатния извлек. Поради това бе приложен разработеният метод за разделяне на синтезираните хидроксицинамоил амиди чрез Високо ефективна течна хроматография, описан в I.3, за анализ на дихлорометановата фракция.

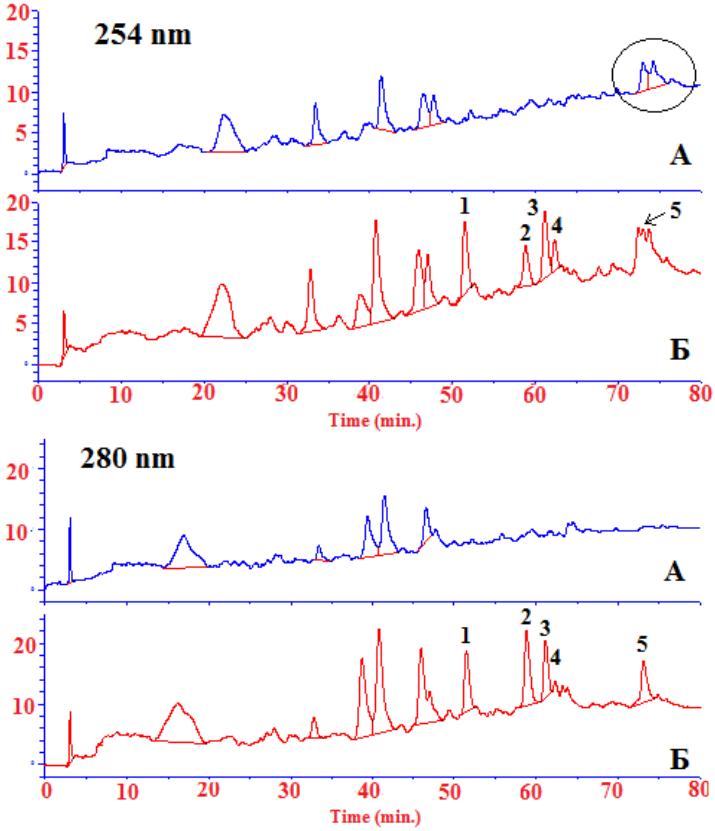
Сравняването на хроматограмата на дихлорометановия извлек (**фигура 55 (А)**) с хроматограмата на смес от дихлорометанов извлек със свидетели цинамоиламиди с тирамин (**фигура 55 (Б)**) показва, че в дихлорометановата фракция на *C. annuum* не се съдържа кафеоил, -ферулоил-, *p*-кумароил- и цинамоилтирамин.



Фигура 55. Високо ефективна течна хроматография:
-(А) на дихлорметанова фракция;
-(Б) на смес от дихлорометанова фракция и кафеоилтирамин (1); *p*-кумароилтирамин (2); ферулоилтирамин (3); синапоилтирамин (4); цинамоилтирамин (5).

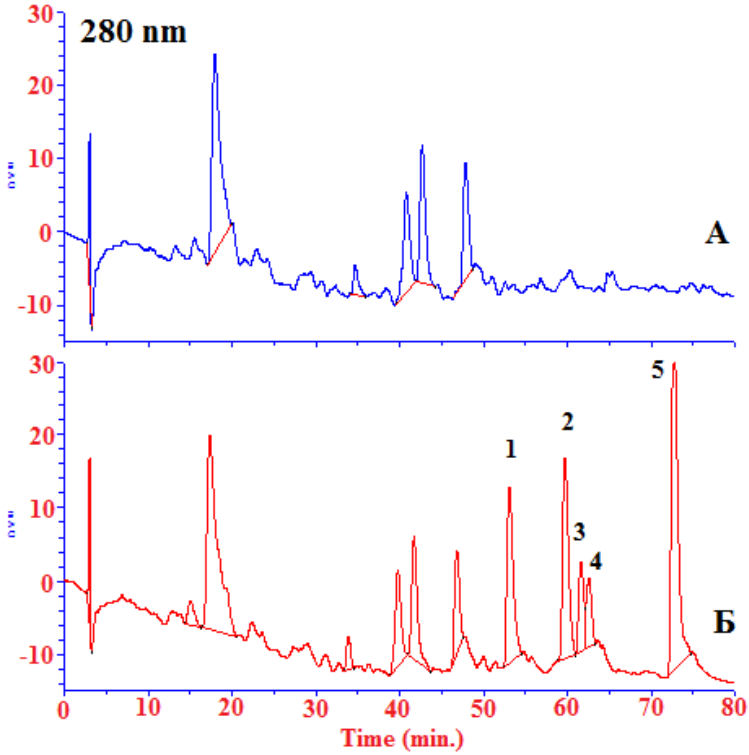
Но пикът, отбелязан с въпросителен знак в хроматограмата на дихлорометановия извлек (**фигура 55 (А)**), се припокрива много добре с пика на синапоилтирамин (**фигура 55 (Б)**). Последното наблюдение ни дава основание да предположим, че синапоилтирамин вероятно присъства в дихлорометановата фракция. За да се потвърди или отхвърли това предположение са необходими допълнителни изследвания – изолиране и спектрално охарактеризиране на този компонент от дихлорометановата фракция.

В хроматограмата на дихлорометановата фракция (**фигура 55 (А)**) се наблюдават два съседни пика с време на задържане (Rt) в интервала 72-76 min. Оказва се, че цинамоилфенилетиламин има време на задържане в този интервал при използваните условия. Поради това бе анализирана дихлорометановата фракция в смес с кафеоил-, *p*-кумароил-, ферулоил-, синапоил- и цинамоилфенилетиламин. Получените резултати са показани на **фигура 56**. В хроматограмата на сместа от дихлорометановия извлек и изброените свидетели при 254 nm в посочената област се явява нов трети пик, а при 280 nm в хроматограмата на чистата дихлорометанова фракция липсва както пик в споменатата област, така и пикове за останалите амиди на фенилетиламин. Това ни дава основание да заключим, че дихлорометановият извлек не съдържа нито един от амидите на фенилетиламин.



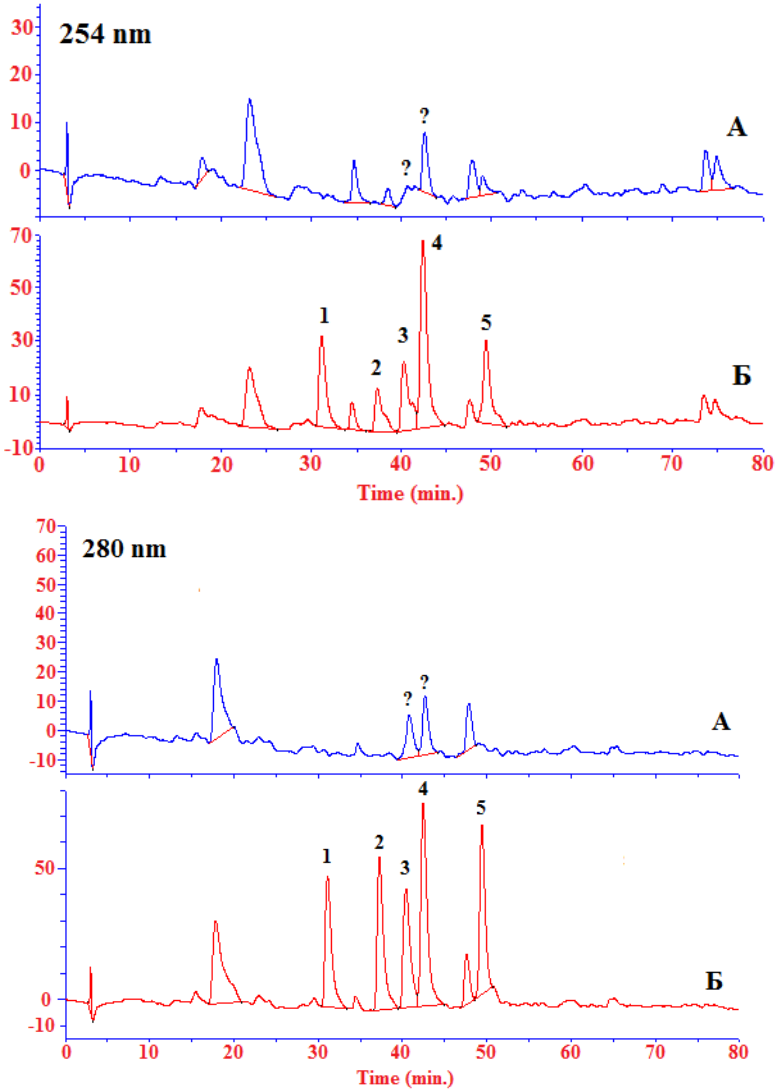
Фигура 56. Високо ефективна течна хроматография:
-(А) на дихлорметанова фракция;
-(Б) на смес от дихлорометанова фракция и кафеоилфенилетиламин (1), *p*-кумароилфенилетиламин (2), ферулоилфенилетиламин (3), синапоилфенилетиламин (4), цинамоилфенилетиламин (5).

Сравняването на хроматограмата на дихлорометановия извлек (А) с хроматограмата на смес (Б) от дихлорометанова фракция с цинамоил триптамини, са показани на **фигура 57.** От нея ясно се вижда, че тези съединения не присъстват в дихлорометановата фракция от *C.annuum*.



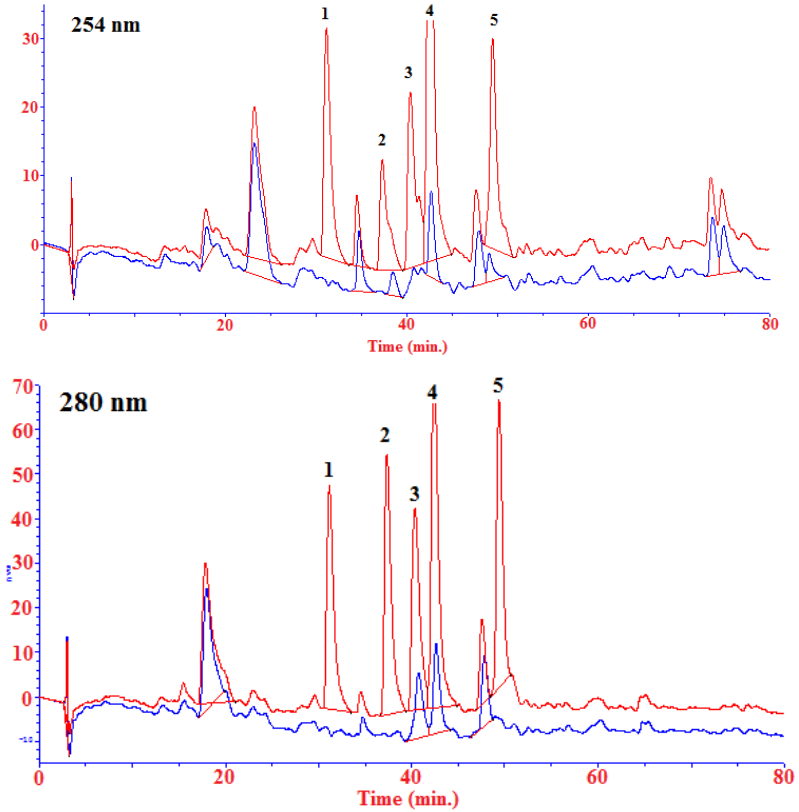
Фигура 57. Високо ефективна течна хроматография:
-(А) на дихлорметанова фракция;
-(Б) на смес от дихлорометанова фракция и кафеоилтриптамин (1), *p*-кумароилтриптамин (2), ферулоилтриптамин (3), синапоилтриптамин (4), цинамоилтриптамин (5).

Хроматограмите на дихлорометановата фракция и на сместа й с цинамоил амидите с допамин при 254 и 280 nm (**фигура 58)** ни даде основание да отхвърлим възможността за присъствие на кафеоилдопамин, *p*-кумароилдопамин и цинамоилдопамин в разглеждания извлек. Но пиковете в дихлорометановия извлек, отбелязани с въпросителен знак на **фигура 58**, съвпадат много добре с тези за ферулоилдопамин и синапоилдопамин. Това ни дава основание да предположим, че тези два амида вероятно се съдържат в екстракта от *C. annuum*.



Фигура 58. Високо ефективна течна хроматография:
-(А) на дихлорметанова фракция;
-(Б) на смес от дихлорометанова фракция и кафеоилдопамин (1), *p*-кумароилдопамин (2), ферулоилдопамин (3), синапоилдопамин (4), цинамоилдопамин (5).

Последното предположение е онагледено на **фигура 59**, но за да се потвърди или отхвърли са необходими допълнителни изследвания – изолиране и спектрално охарактеризиране на тези компоненти от дихлорометановата фракция.



Фигура 59. Високо ефективна течна хроматография:
- на дихлорметанова фракция (син цвят);
- на смес от дихлорметанова фракция и кафеоилдопамин (1), *p*-кумароилдопамин (2), ферулоилдопамин (3), синапоилдопамин (4), цинамоилдопамин (5) (червен цвят).

Резултатите от това изследване дадоха основание да се предположи наличие на синапоилтирамин, ферулоил- и синапоилдопамин в дихлорометановата фракция от семена на *C. annuum*.

III. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.

1. Синтезирани и спектрално охарактеризирани са общо 41 съединения, от които 4 са нови, неописани в литературата: синапоил- и *p*-кумароил- фенилетиламин и метиловите естери на цинамоил- и синапоил- DOPA.
2. Определена е антирадикаловата активност чрез DPPH$^{\bullet}$-тест на 40 амида на канелени киселини с ароматни амини и съответните им аминокиселини предшественици. И двете групи производни показват близка радикал улавяща активност, като 16 от синтезираните амиди са с близка или по-висока активност от съответните свободни канелени киселини. Установено е, че най-активни спрямо DPPH$^{\bullet}$ са кафеоил амидите.
3. Изследвана е инхибиращата активност на 18 амида върху автоокислението на триацилглицероли на слънчогледово масло: 9 производни с ароматни амини и 9 производни с ароматни аминокиселини. Установено е, че всички амиди с ароматни амини са по-ефективни инхибитори на автоокислението от съответните им производни с ароматни аминокиселини. При това активността им е по-висока от тази на използваните референти.
4. Изследвана е антимикробната активност на 13 цинамоил- и хидроксицинамоил амиди с ароматни амини и на 5 амида с ароматни аминокиселини. Най-активни съединения срещу *S. aureus* и *S. pyogenes* са производни на ароматни амини и имат MIC 62.5 μg/ml (синапоилтриптамин; синапоилтирамин; ферулоилтирамин; ферулоилдопамин и кафеоилтриптамин). Съответните им производни с ароматни аминокиселини са по-слабо активни срещу изследваните бактерии.
5. Модифициран е описан в литературата метод за изследване на влиянието на синтезираните производни върху активността на ензима тирозиназа. При изследване на тирозиназната

активност на двете групи амиди, производните на *p*-кумарова киселина се оказаха най-ефективни тирозиназни инхибитори.

6. Разработен е метод за анализ на цинамоил- и хидроксицинамоил амиди с ароматни амини чрез Високо ефективна течна хроматография. Разделянето е осъществено при четири групи от пет амида. Методът дава възможност да се идентифицират 10 амида в една смес.

7. Изследвани са семена от *C. annuum*:

- Установено е тоталното фенолно съдържание и радикал улавящата активност на тотален метанолен екстракт от *C. annuum* и всички полярни фракции. С най-високо съдържание на феноли е етилацетатната фракция, последвана от дихлорометановата фракция. Активността спрямо DPPH$^{\bullet}$ съответства с установеното фенолно съдържание.
- Не е установена инхибираща активност на метанолния екстракт върху липидното перокисление на триацилглицероли на слънчогледово масло.
- Установената антимикробната активност на метанолния екстракт спрямо *L. Monocytogenes, S.aureus, S.pyogenes* и *C. albicans,* изразена с MIC е 62.5 μg/ml.
- Получените резултати за RSA и антимикробна активност на фракциите от семената на *C. Annuum* са от интерес и практическо значение за бъдещо оползотворяване на този отпаден продукт.
- Анализът на дихлорометановата фракция на семената от *C. annuum* чрез Високо ефективна течна хроматография даде основание да се предположи, че тя съдържа синапоилтирамин, ферулоил- и синапоилдопамин.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Списък на научните публикации, включени в дисертационния труд:

1. **Георгиев Л.**, „Производни на фенилпропенови киселини – изолиране, синтез и биологична активност". *Докторантите в диалог с науката, Югозападен университет „Неофит Рилски"*, 2010, 312-319;

2. Chochkova M., Nikova H., Ivanova G., **Georgiev L.**, Milkova Ts., „Radical Scavenging Activity of Hydroxycinnamoylamides of Amino Acids - Precursors of Biogennic Amines". In *Peptides: tales of peptides; Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium* (Lebl M., Meldal M., Jensen K., Hoeg-Jensen T., eds.), 2010, 56-57, (ISBN: 0-9715560-5-9);

3. **Georgiev L.**, Totseva I., Seizova K., Marinova E., Chochkova M., Milkova Ts., „Antioxidant Potential of Phenolic Acid Amides of Aromatic Amines". In *Peptides: tales of peptides; Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium* (Lebl M., Meldal M., Jensen K., Hoeg-Jensen T., eds.), 2010, 60-61, (ISBN: 0-9715560-5-9);

4. Chochkova M., **Georgiev L.**, Milkova Ts., „Phenylpropanoids as naturally occurring and synthetical antioxidants: from plant defense to human health". In*: Proceedings of the Fourth International Scientific Conference – FMNS2011*, 2011, 1, 325-334.

5. **Georgiev L.**, Chochkova M., Ivanova G., Najdenski H., Ninova M., Milkova Ts., „Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines". *La rivista italiana delle sostanze grasse*, 2012, *in press.*

6. Marinova E., **Georgiev L.**, Totseva I., Seizova K., Milkova Ts., „Antioxidant activity and mechanism of action of some synthesized phenolic acid amides of aromatic amines". *Czech Journal of Food Sciences*, 2012, *in press*.

Участия в научни конференции и форуми:

1. **Georgiev L.**, Spasova M., Stojkova B., Dzaganova E., Ivanova G., Milkova Ts., „DPPH radical scavenging effect of N-phenylpropenoyl amides of some biogenic monoamines". *11th International Congress on amino acids and proteins, Vienna, Austria, 3-7August 2009;*

2. **Георгиев Л.**, „Производни на фенилпропенови киселини – изолиране, синтез и биологична активност". *ДОКТОРАНТСКИ ФОРУМ "ДОКТОРАНТИТЕ В ДИАЛОГ С НАУКАТА", Благоевград, България 22-23 октомври 2009г.;*

3. Chochkova M., Nikova Hr., Ivanova G., **Georgiev L.**, Milkova Ts., „Radical scavenging activity of hydroxycinnamoylamides of amino acids - precursors of biogennic amines". *31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, 5-9 September 2010*;

4. **Georgiev L.**, Totseva I., Seizova K., E Marinova., Chochkova M., Milkova Ts., „Antioxidant potential of phenolic acid amides of aromatic amines". *31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, 5-9 September 2010*;

5. Chochkova M., **Georgiev L.**, Milkova Ts., "Phenylpropanoids as naturally occurring and synthetical antioxidants: from plant defense to human health". *Fourth International Scientific Conference FMNS-2011, Blagoevgrad, Bulgaria, 08 – 11 June 2011.*