

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ČELHAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ČELHAR

SINTEZA 5-FENIL-1,5-DIHIDRO-PIRANO[2,3-*d*]PIRIMIDIN-2,4-DIONOV IN 5-BENZOILPIRIMIDIN-2,4,6-TRIONOV TER VREDNOTENJE NJIHOVIH ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

SYNTHESIS OF 5-PHENYL-1,5-DIHYDRO-PYRANO[2,3-*d*]PYRIMIDINE-2,4-DIONES AND 5-BENZOYLPYRIMIDINE-2,4,6-TRIONES, AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETIC SCIENCE

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja, mag. farm.. Spektroskopske meritve smo izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorju doc. dr. Nacetu Zidarju za pomoč in vse nasvete pri izvajanju laboratorijskega dela in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, za pomoč in nasvete pri opravljanju DPPH-testa. Zahvaljujem se tudi svojim bližnjim za podporo pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja, mag. farm..

Ana Čelhar

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. Radikali	1
1.1.1. Osnove radikalov	1
1.1.2. Oksidacija DNA	1
1.1.3. Radikali pri staranju kože	2
1.2. Antioksidanti	3
1.2.1. Antioksidativna mreža v koži	3
1.2.2. Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih	4
1.3. Testi za določanje antioksidativnih lastnosti spojin	6
1.3.1. Antioksidativno testiranje z DPPH-testom	7
1.4. Barbiturna kislina in njeni derivati	8
2. NAMEN DELA	10
2.1. Načrtovanje potencialnih antioksidantov	10
2.2. Določanje antioksidativnega delovanja	11
3. MATERIALI IN METODE	12
4. EKSPERIMENTALNO DELO	14
4.1. SINTEZA	14
4.1.1. Sinteza <i>N,N</i> -dimetilbarbiturne kisline (3)	14
4.1.2. Sinteza 1,5-dihidro-piranopirimidin-2,4-dionov	15
4.1.3. Sinteza 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov	20
4.2. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI SPOJIN	26
4.2.1. Priprava raztopin DPPH in vzorcev	26
4.2.2. Priprava mikrotitrne ploščice, merjenje absorbanc in izračun vrednosti EC ₅₀	26
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1. Rezultati meritev antioksidativnega delovanja spojin	28
5.1.1. Vrednosti srednjih efektivnih koncentracij spojin	33
5.2. Komentar rezultatov antioksidativnega vrednotenja	35
6. SKLEP	38
7. LITERATURA	39

POVZETEK

Antioksidanti so pomemben del našega življenja, saj ustavijo radikalske reakcije, ki povzročajo oksidacijo pomembnih gradnikov v telesu. Radikali so povsod okrog nas, nastajajo tako v našem telesu, kot tudi v zunanjem okolju. Ker so radikali zelo pogosti, lahko hitro pride do porušanja ravnovesja med antioksidanti in radikali, kar našemu telesu povzroča škodo. Antioksidanti so zaradi svojih pozitivnih učinkov, ki se kažejo tako pri vnosu v telo, kot tudi pri nanosu na kožo, že vrsto let predmet številnih raziskav, uporabljajo pa se tako v farmaciji, kot tudi v kozmetiki in prehrambeni industriji.

Barbiturna kislina sama po sebi ni biološko aktivna molekula, so pa biološko aktivni njeni derivati. Nekateri derivati barbiturne kisline so, poleg ostalih bioloških učinkov, izkazali antioksidativno delovanje, kar je spodbudilo nadaljnje raziskave na tem področju.

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali serijo desetih derivatov barbiturne kisline, ki smo jih fizikalno-kemijsko ovrednotili in jim določili antioksidativno delovanje s pomočjo DPPH-testa. Sintetizirali smo dva strukturna razreda spojin, in sicer serijo 5-fenil-1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov in serijo 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov. Kot osnovne gradnike pri sintezi spojin smo uporabili barbiturno, tiobarbiturno ali *N,N'*-dimetilbarbiturno kislino ter različno substituirane benzaldehide ali benzojsko kislino. Pripravljene spojine smo primerjali med seboj glede na njihovo antioksidativno delovanje in iskali povezavo med njihovo strukturo in delovanjem.

Za vrednotenje antioksidativnih lastnosti spojin smo uporabili *in vitro* testiranje, in sicer DPPH-test, ki temelji na principu redukcije stabilnega radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH). Raztopina DPPH je sprva obarvana temno vijolično, ko pride do reakcije med DPPH in antioksidantom pa se barva raztopine spremeni v svetlo rumeno. Delež DPPH, ki je po reakciji z našimi spojinami ostal nereduciran, smo določili s pomočjo spektrofotometrične meritve. Učinkovitost naših spojin smo ovrednotili z izračunom srednje efektivne koncentracije (EC_{50}). Najmočnejše antioksidativno delovanje je izkazala spojina **24** z *N,N'*-dimetilbarbiturnim obročem in hidroksilno skupino vezano na fenilni obroč. V splošnem so močnejše antioksidativno delovanje od derivatov barbiturne kisline pokazale spojine, ki so vsebovale tiobarbiturni ali *N,N'*-dimetilbarbutrni obroč.

Na podlagi rezultatov lahko sklenemo, da sta najobetavnejše antioksidativno delovanje izkazali spojini **13** in **24**, zato bi bilo z njima smiselno izvesti še dodatne *in vitro* poskuse.

Ključne besede: antioksidant, DPPH, barbiturna kislina, 5-fenil-1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dion, 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trion

ABSTRACT

Antioxidants are important part of our lives, because they can stop free radical reactions, which can cause oxidation of important biomolecules. Radicals are all around us and their origin is either endogenous or exogenous. Because of the abundant presence of radicals in our environment, the balance between antioxidants and radicals can be broken quickly, which can affect our biological functions. Because of their positive effects on our body, antioxidants are subject of intense research. They are used in pharmacy, cosmetic science and food industry.

Unsubstituted barbituric acid is not biologically active, but its derivatives are. Some of the derivatives possess, besides other biological activities, also antioxidant activity, which has led to substantial research in this field.

Ten barbituric acid derivatives were synthesized, chemically characterized and evaluated for their antioxidant activities with DPPH test. Two types of compounds were prepared, 5-phenyl-1,5-dihydro-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-diones and 5-benzoylpyrimidine-2,4,6-triones. As the basic scaffolds, barbituric, thiobarbituric or *N,N'*-dimethylbarbituric acid, and different substituted benzaldehydes or benzoic acid were used. Compounds were compared based on their structure and antioxidant activity, and their structure-activity relationships were analysed.

Antioxidant properties of compounds were analysed with *in vitro* DPPH test. This method is based on reduction of stable radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). A solution of DPPH has a deep purple colour, which turns light yellow when DPPH is reduced because of the reaction with antioxidant. Spectrophotometric method was used to determine the amount of residual DPPH after the reactions with our compounds. Half-maximum effective concentration values were calculated to evaluate antioxidant activity of our compounds. Compound **24** with *N,N'*-dimethylbarbituric acid and hydroxyl group on the phenyl ring had the best antioxidant activity. In general, compounds possessing *N,N'*-dimethyl barbituric acid or thiobarbituric acid had higher antioxidant activity than compounds with barbituric acid.

To sum up, based on the given results, the most promising antioxidant activities were determined for compounds **13** and **24**, for which further *in vitro* tests would be necessary.

Key word: antioxidant, DPPH, barbituric acid, 5-phenyl-1,5-dihydro-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-dione, 5-benzoylpyrimidine-2,4,6-trione

SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
ATP	adenozin trifosfat
DMSO- d_6	devteriran dimetilsulfoksid
DMPD	<i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -fenilen diamin dihidroklorid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EC ₅₀	srednja efektivna koncentracija
FRAP	železo reducirajoča antioksidativna moč
HCl	klorovodikova kislina
IR (ATR)	infrardeča spektroskopija (tehnika oslABLJENE popolne odbojnosti)
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
<i>m</i>	multiplet
NMR	jedrska magnetna resonanca
NADPH	nikotinamid adenindinukleotid fosfat
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
<i>s</i>	singlet
SN	standardna napaka
SOD	superoksid dismutaza
<i>T</i>	temperatura
<i>t</i>	triplet
TRAP	parameter za popolno zaviranje radikala z antioksidantom
δ	kemijski premik
UV	ultravijolično

1. UVOD

1.1. Radikali

1.1.1. Osnove radikalov

Med radikale uvrščamo nevtralne spojine, ione in atome, ki imajo v zunanji orbitali vsaj en nesparjen elektron. V našem telesu prevladujejo reaktivne dušikove zvrsti (RNS) in reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Radikali nastajajo po različnih mehanizmih. V telesu nastajajo v kataliziranih in nekataliziranih reakcijah in pri vnetju. Pri nekataliziranih reakcijah gre za eksotermne reakcije z majhno reakcijsko energijo. Pri kataliziranih reakcijah sodelujejo encimi, ki sodijo v skupino oksidoreduktaz. Pri teh reakcijah lahko nastajajo superoksidni radikal, vodikov peroksid in voda (1).

1.1.2. Oksidacija DNA

Radikali reagirajo z različnimi biomolekulami v človeškem organizmu, pri čemer je izpostavljena tudi molekula DNA. Oksidativne poškodbe DNA vodijo do staranja, mutageneze in kancerogeneze (2). Radikali lahko sprožijo oksidacijo na deoksiribozi v DNA (1). Reakcije oksidacije lahko potekajo s hidroksilnim radikalom, ki reagira z vodikom na sladkorju. Hidroksilni radikal je močan elektrofil, ki največkrat reagira na tri načine: z adicijo na dvojno vez med atomoma C=C ali C=N, z odtegnitvijo H-atoma ali pa kot prenašalec elektrona (3). Hidroksilni radikal z DNA reagira preko dveh tipov reakcij, in sicer z adicijo na dvojno vez heterocikličnih baz ali z odtegnitvijo H-atoma z vseh petih C-atomov deoksiriboze ali metilne skupine na timinu (2). Hidroksilni radikal na deoksiribozi najlažje reagira z vodiki, ki imajo najnižjo energijo kovalentne vezi in niso sterično ovirani. Najbolj so primerni vodiki na mestih 1, 3, 4 in 5. Radikal najlažje nastane na mestu 5. Do reakcij prihaja tudi na purinskih in pirimidinskih bazah DNA. Radikali najlažje dostopajo do vodikovih atomov v velikem in malem jarku. Radikal, ki nastaja v bližini DNA in je odgovoren za največ reakcij, je hidroksilni radikal (1). Reakcije so odvisne od dostopnosti mesta, največ reakcij pa poteka na timinu in citozinu na dvojni vezi med mestoma 5 in 6 na pirimidinskem obroču, kjer pride do adicije hidroksilnega radikala na dvojno vez (1,2). Na adeninu je najbolj izpostavljena dvojna vez med mestoma 7 in 8 in dvojna vez, ki je skupna petčlenskemu in šestčlenskemu obroču. Poškodbe DNA lahko povzročajo tudi reaktivni elektrofil, ki nastanejo pri lipidni peroksidaciji. Če pride do oksidacije lipidov v telesu, lahko elektrofil, ki pri tem nastanejo, reagirajo z DNA, pri

čemer lahko pride do mutacij DNA. Pri teh reakcijah se spremeni možnost za nastanek vodikovih vezi, ki so pomembne za pravilno prepisovanje in podvajanje DNA (1).

1.1.3. Radikali pri staranju kože

Koža je izpostavljena različnim zunanjim vplivom, ki jo lahko poškodujejo. Mednje sodijo sevanje, zrak in onesnaženo okolje. Prav tako je koža pokazatelj dogajanj v telesu, kot so stres ter vnašanje alkohola in nezdrave prehrane v telo. Vse to lahko sproži nastanek radikalov. Reaktivne kisikove zvrsti v koži lahko nastajajo tudi kot produkt metabolizma (4).

1.1.3.1. Poškodbe kože zaradi UV-sevanja

Kot največji organ ima koža vlogo zaščite notranjosti telesa pred vplivi iz okolja in je tista, ki je direktno izpostavljena UV-sevanju. Če kožo brez zaščite prekomerno izpostavljamo UV-žarkom, lahko ti povzročijo lokalno ali sistemsko imunosupresijo, fotostarjanje kože in fotokancerogenezo. Fotostarjanje kože je dolgotrajen proces, katerega posledice niso vidne takoj, sčasoma pa koža postaja groba, suha, pojavijo se globoke gube, pigmentacijska znamenja in izguba tonusa. Ko UV-sevanje pride do celice, ga tam absorbirajo celični kromofori, kot so DNA, aromatične aminokisline, porfirin in urokanska kislina. Ti kromofori lahko nato reagirajo z molekularnim kisikom, kar vodi v nastanek ROS. ROS reagirajo z znotrajceličnimi antioksidanti, v primeru njihovega presežka pa lahko pride do oksidativnega stresa, kar lahko povzroči celično smrt (5). UV-sevanje lahko kožo poškoduje, kar sproži nastajanje citokinov IL-1 in TNF- α . Na mesto poškodbe nato prispejo še fagociti, ki proizvajajo ROS in dušikov oksid. Ti radikali lahko skupaj tvorijo peroksinitril, ki povzroča lipidno peroksidacijo, kar vodi v nadaljnje poškodbe (6).

1.1.3.2. Nastajanje ROS pri vnetju

Pri vnetju v koži se zaradi različnih patofizioloških in fizioloških stanj tvorijo ROS. Radikali se tvorijo v nekaterih imunskih celicah. Primarno se vodikov peroksid, superoksid in hidroksilni radikal tvorijo v polinuklearnih limfocitih in fagocitih kot odgovor na vnetje. Na poškodbe, ki jih povzročajo ROS, je koža zaradi svoje sestave še zlasti občutljiva. Koža namreč vsebuje veliko nenasičenih maščobnih kislin, ki lahko reagirajo z ROS, ki nastajajo zaradi vplivov UV-svetlobe in kisika v zraku, kot tudi z ROS, ki nastajajo v notranjosti kot produkti imunskih celic v koži, ki jih aktivira vnetje. Reakcija ROS z lipidi, ki se nahajajo v celični membrani, lahko povzroči poškodbo membrane, s tem pa tudi smrt celice, saj

membrana postane propustna. Pri lipidni peroksidaciji med drugim nastajajo tudi aldehidi, ki lahko reagirajo s stranskimi skupinami na aminokislinah in nukleinskih kislinah, kar lahko povzroči poškodbe proteinov in DNA. Eden izmed pomembnejših radikalov je hidroksilni radikal, ki lahko povzroči poškodbe DNA, lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov (6).

1.2. Antioksidanti

Antioksidante lahko opredelimo na različne načine. Po eni izmed definicij so antioksidanti katerekoli spojine, ki so prisotne v nizkih koncentracijah v primerjavi z oksidanti in preložijo, ali preprečijo oksidacijo spojine. Po drugi definiciji so antioksidanti snovi, ki preložijo, preprečijo ali odpravijo oksidativno poškodbo tarčne molekule, po tretji definiciji pa so to spojine, ki direktno reagirajo z ROS, indirektno uravnavajo antioksidativno zaščito ali zavirajo nastanek ROS. Pri človeku se je endogena antioksidativna zaščita razvila tako, da se v telesu ohranja ravnovesje med radikali in oksidativnim stresom (7).

Antioksidanti delujejo po različnih mehanizmi:

- z zaviranjem radikalskih reakcij in zaviranjem tvorbe lipidnih radikalov (preventivni antioksidanti),
- s prekinitvijo propagacije pri avtooksidacijskih verižnih reakcijah,
- lahko delujejo v sinergizmu z drugimi antioksidanti,
- z redukcijo hidroksilnih radikalov v stabilne oblike,
- kot kelatorji kovinskih ionov (npr. železovih ali bakrovih ionov) in
- kot inhibitorji prooksidativnih encimov (npr. lipoksigenaze) (7).

1.2.1. Antioksidativna mreža v koži

Koža je izpostavljena tako endogenim kot eksogenim virom radikalov. Radikali v koži so lahko rezultat onesnaženja, kemikalij, UV-sevanja ali vpliva atmosferskih plinov, kot tudi celičnega metabolizma in vnetij v koži (8). Previsoka koncentracija radikalov v koži lahko povzroči poškodbe celic, staranje kože in raka. Proti radikalom se koža bori na različne načine, in sicer s popravljivimi mehanizmi, fizičnimi preprekami in antioksidativno zaščito (8,9).

Koža tvori antioksidativno mrežo, ki je kompleksen sistem zaščite pred oksidativnim stresom. Antioksidativna mreža je sestavljena iz encimov in nizkomolekularnih

antioksidantov, ki so lahko topni v hidrofilnem ali lipofilnem okolju. Poleg zaščite pred oksidativnim stresom lahko antioksidanti sodelujejo tudi med seboj, in sicer tako da se njihovo delovanje dopolnjuje ali pa eden od antioksidantov regenerira drugega. Nekateri antioksidanti so preventivni in preprečujejo tvorbo radikalov, medtem ko drugi antioksidanti preprečijo iniciacijo ali propagacijo verižnih reakcij, v katerih sodelujejo radikali. Kadar je kljub temu oksidativni stres premočan in ga antioksidanti ne morejo preprečiti ali omiliti, pride v koži do poškodb, staranja ali razvoja raka (9).

Antioksidante lahko delimo na encimske in nizkomolekularne. Encimski antioksidanti vedno vsebujejo še kofaktor, ki je odgovoren za antioksidativno delovanje. Ta deluje na principu prenosa elektronov, ki nevtralizirajo ROS. Najpomembnejši encimski antioksidanti, ki jih najdemo v koži, so superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutation peoksidaza, kinon reduktaza in tiroksin reduktaza. Pri nizkomolekularnih antioksidantih je delovanje odvisno tudi od njihove topnosti. Lipidotopne antioksidante najdemo v celičnih membranah in ostalih z lipidi bogatih predelih, kot so npr. lipidne lamelarne strukture v roženi plasti kože. Vodotopne antioksidante najdemo tako v citosolu kot zunaj celic. Nizkomolekularni antioksidanti lahko delujejo kot preventivni antioksidanti ali kot zaviralci že sproženih oksidativnih reakcij, njihovi mehanizmi delovanja pa se med seboj razlikujejo. Med vodotopne antioksidante prištevamo askorbinsko kislino, urokansko kislino in glutation, medtem ko med lipidotopne antioksidante prištevamo α -tokoferol, koencim Q₁₀ in beta-karoten. Poleg naštetih, med antioksidante prištevamo tudi melanin, ki je sicer kožni in lasni pigment, vendar ima ključno vlogo tudi pri nevtralizaciji radikalov (9).

Poleg naštetih antioksidantov v našem telesu najdemo še nekaj zelo pomembnih antioksidantov, ki varujejo celice pred oksidativnimi reakcijami, kot so bilirubin, feritin, L-karnitin, α -lipojska kislina in metalotionein (9).

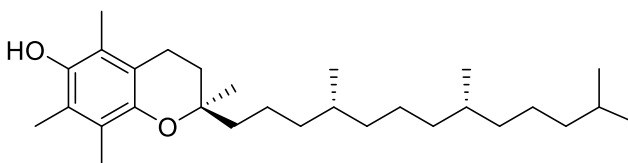
1.2.2. Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih

Antioksidanti so zelo pogoste sestavine kozmetičnih izdelkov. Uporabljajo se kot kozmetično aktivne sestavine in kot tehnični antioksidanti, ki ščitijo sestavine izdelka pred oksidacijo. To je še zlasti pomembno, če so v izdelku prisotne nenasičene maščobe, saj lahko pri njih pride do lipidne peroksidacije. Kot kozmetično aktivne sestavine se antioksidanti uporabljajo zaradi njihovih ugodnih učinkov na koži, ker jo ščitijo pred vplivom radikalov (10). Uporaba antioksidantov v izdelkih za nego kože v splošnem

izboljša zdravje in stanje kože, saj zmanjša škodljive učinke UV-žarkov, ki povzročajo fotostarjanje, fotoimunosupresijo in nastanek kožnega raka (9). Slaba lastnost nekaterih antioksidantov je, da so nestabilni in lahko povzročajo težave pri formulaciji izdelka, prav tako pa se lahko zaradi nestabilnosti njihova učinkovitost zmanjša, če izdelek predolgo stoji na policah. Zaradi tega so nujno potrebna testiranja, ki zagotavljajo enako koncentracijo antioksidanta skozi celoten čas uporabe izdelka. V kozmetiki se uporabljajo tako sintezni kot naravno pridobljeni antioksidanti, vendar imajo kot kozmetično aktivne sestavine naravni antioksidanti navadno boljše delovanje, ker so sestavljeni iz mešanice snovi, ki lahko delujejo sinergistično (10). Trije najpogostejši antioksidanti, ki jih najdemo v kozmetičnih izdelkih so:

- Vitamin E

Vitamin E je eden od esencialnih vitaminov, ki je topen v lipidih in jih ščiti pred lipidno peroksidacijo. Vitamin E v naravi obstaja v osmih oblikah, in sicer kot štirje tokoferoli in štirje tokotrienoli. Ker je občutljiv na svetlobo in kisik, ga moramo hraniti v temnem prostoru, v embalaži, zaščiteni pred kisikom. V koži in v telesu ima najvišjo biološko aktivnost α -tokoferol, katerega struktura je prikazana na sliki 1, sledi mu γ -tokoferol, ostale oblike pa kljub primerljivim antioksidativnim lastnostim nimajo enake biološke uporabnosti. Vitamin E ščiti fosfolipidni dvosloj celične membrane pred oksidacijo, preprečuje škodljive učinke UV-sevanja in ščiti pred poškodbami DNA. V kozmetičnih izdelkih ga najdemo v obliki α -tokoferola ali v obliki njegovih bolj obstojnih sinteznih derivatov, kot je α -tokoferilacetat. V naravi ga največkrat najdemo v rastlinskih oljih, veliko pa ga je tudi v mandljih in sončničnih semenih. Pridobivamo ga lahko tudi sintezno (9,11).

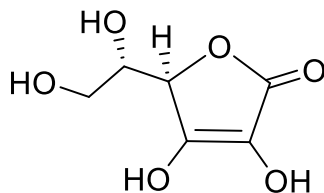


Slika 1: Kemijska struktura α -tokoferola oz. vitamina E.

- Vitamin C

Vitamin C ali askorbinska kislina je eden od najpomembnejših vodotopnih vitaminov, ki jih najdemo v koži in v telesu. Njegova kemijska struktura je prikazana na sliki 2. Deluje tako znotrajcelično kot zunajcelično, tako da varuje pred radikali v hidrofilnem okolju. Sodeluje tudi pri obnavljanju vitamina E tako, da ga po oksidaciji ponovno pretvori v aktivno obliko. Pomemben je tudi kot kofaktor pri sintezi kolagena, hkrati pa uravnava

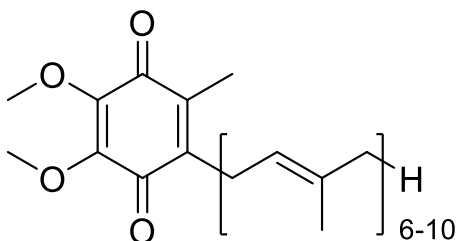
nivo ogrodnih metaloproteinaz, ki razgrajujejo kolagen. Ne deluje kot UV filter, vendar kljub temu, če je nanesen dermalno, ščiti pred fotostaranjem, fotoimunosupresijo in eritemom. Askorbinsko kislino v kozmetičnih izdelkih uporabljamo predvsem za zaščito izdelkov. Največkrat se uporablja derivat askorbinske kisline askorbilpalmitat, ki je topen v lipidih, prav tako pa ta oblika prodre globlje v roženo plast od ostalih oblik, tam pa jo lipaze razgradijo do aktivne oblike – askorbinske kisline. Vitamin C v prosti obliki se zaradi nestabilnosti večinoma ne uporablja (9,11).



Slika 2: Kemijska struktura askorbinske kisline oz. vitamina C.

- Ubikinon ali koencim Q₁₀

Ubikinon je lipidotopen antioksidant, katerega kemijska struktura je prikazana na sliki 3. Najdemo ga v mitohondrijih, kjer igra pomembno vlogo pri aerobnem celičnem dihanju, kjer se tvori ATP. Koencim Q₁₀ je pomemben člen pri prenosu elektronov, njegovo delovanje pa je ključno za zdravje kožnih celic, kar je zelo pomembno zlasti pri staranju, ko se mitohondrijska funkcija manjša. Koencim Q₁₀ najdemo kot aktivno sestavino v kozmetičnih izdelkih proti staranju (9).



Slika 3: Kemijska struktura Koencima Q₁₀.

1.3. Testi za določanje antioksidativnih lastnosti spojin

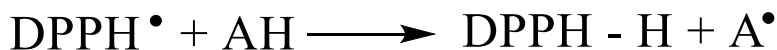
Antioksidanti so v zadnjem času postali ena od zelo intenzivno preiskovanih skupin učinkovin, saj se uporabljajo tako v farmaciji, kozmetiki kot tudi v prehrani. Zaradi njihove široke uporabe so razvili številne metode, ki se uporabljajo za določanje njihovih antioksidativnih lastnosti. Te metode na različne načine vrednotijo učinkovitost antioksidantov. V grobem jih delimo na *in vitro* in *in vivo* metode, ki se izvajajo na živih organizmih. Pri vrednotenju antioksidativnega delovanja spojin se za testiranje enega

antioksidanta navadno uporablja kombinacija več različnih metod, čeprav rezultatov testov ne moremo neposredno primerjati med seboj. *In vitro* metode večinoma temeljijo na redukciji radikalov, s katerimi spojina reagira. Med *in vitro* metode prištevamo (i) DPPH-test, (ii) TEAC-test, t.j. test razbarvanja radikal kationa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline) (ABTS), (iii) TRAP-test, t.j. test razbarvanja radikal kationa *N,N*-dimetil-*p*-fenilen diamin dihidroklorida (DMPD), ki se uporablja za merjenje antioksidativne kapacitete krvne plazme in drugih bioloških tekočin in (iv) FRAP-test, ki meri sposobnost antioksidantov za redukcijo trivalentnega železa. *In vivo* testi se navadno izvajajo na živalih (miši, podgane) v odmerku, ki je opisan v izbrani metodi. Po določenem času testne živali žrtvujejo, njihovo kri in tkiva pa uporabijo za test. Nekateri izmed *in vivo* testov, ki se uporabljajo, so (i) sposobnost plazme, da reducira železo, pri katerem se meri padec absorbance, (ii) superoksid dizumatzni test, s katerim lahko določimo antioksidativno moč vzorca in (iii) test lipidne oksidacije, pri katerem se meri nastanek malondialdehida, ki je eden od končnih produktov lipidne peroksidacije (9,12).

1.3.1. Antioksidativno testiranje z DPPH-testom

Metodo testiranja antioksidativnih lastnosti z uporabo radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je razvil Marden Blois. Gre za preprosto in poceni metodo, ki daje ponovljive rezultate. Test se izvaja pri sobni temperaturi, s čemer preprečimo termični razpad testiranih spojin. Omejitve metode so v tem, da ne moremo testirati antioksidativnih lastnosti plazme, saj se proteini v alkoholnem mediju oborijo. Uporablja se za določanje antioksidativnih lastnosti antioksidantov v hrani in v bioloških sistemih. DPPH je stabilen radikal, ki je stabiliziran z delokalizacijo nesparsjenega elektrona po molekuli. Topen je v organskih topilih, največkrat pa se za test uporabljata metanolna in etanolna raztopina. Raztopina DPPH je obarvana temno vijolično, ko pa se prosti elektron spari, t.j. ko se radikal DPPH[•] reducira do DPPH-H (Slika 4), pride do spremembe barve raztopine v svetlo rumeno. Pri testu pomešamo raztopino DPPH z raztopino našega vzorca, ki pri reakciji odda vodikov atom molekuli DPPH. Pri tem pride do stabilne oblike 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH-H), intenzivna vijolična barva pa zbledi. Ko poteče reakcija, se vodik iz antioksidanta veže na dušik v DPPH z nesparsjenim elektronom in tako stabilizira radikal (13). Antioksidativno delovanje ovrednotimo s pomočjo merjenja absorbance. DPPH ima absorpcijski vrh pri 515 nm, pri redukciji pa se absorbanca pri tej valovni dolžini zmanjša. Več kot pri reakciji nastane reduciranega DPPH-H, nižja je absorbanca in

bolj razbarvana je raztopina DPPH. Reakcija, ki poteče pri testu, je prikazana na sliki 4, kjer je z AH označen antioksidant. Po reakciji z antioksidantom dobimo stabilno spojino DPPH-H (Slika 4). Rezultat podajamo kot vrednost EC₅₀, ki označuje koncentracijo antioksidanta, ki je potrebna, da pride do redukcije 50% radikala DPPH (14).



Slika 4: Reakcija antioksidanta (AH) z DPPH (prirejeno po 14).

1.4. Barbiturna kislina in njeni derivati

Med heterocikličnimi spojinami igrajo pomembno vlogo v bioloških sistemih tudi pirimidini. Ena izmed pomembnih spojin iz skupine pirimidinov je barbiturna kislina (2,4,6-trihidroksipirimidin) (14), ki jo je leta 1864 prvič sintetiziral nemški kemik Adolf von Baeyer s kondenzacijo sečnine z dietil malonatom. Derivati barbiturne kisline, barbiturati, so se v farmaciji začeli uporabljati v začetku 20. stoletja. Barbiturati imajo širok spekter bioloških učinkov, saj lahko delujejo kot sedativi, hipnotiki, antiepileptiki, antispazmodiki, lokalni anestetiki, antibiotiki, hipotenzivi, delujejo pa tudi protivnetno in kot zaviralci matriksne metaloproteinaze (15). Barbiturna kislina sama po sebi nima bioloških učinkov, te dobi šele, ko vodik na petem C-atomu nadomestimo z alkilno ali arilno skupino. Najpogostejša metoda sinteze barbiturne kisline in njenih derivatov je Michaelova reakcija, ki poteka s kondenzacijo sečnine z ustrezno substituiranim dietil malonatom, v prisotnosti natrijevega etoksida v brezvodnem etanolu (16,17). Ta metoda se uporablja za pripravo barbiturne kisline in njenih derivatov v laboratorijih in v industriji. Lastnost barbiturne kisline, ki se jo izkorišča pri pripravi njenih derivatov, je tudi ta, da jo je mogoče enostavno derivatizirati na aktivirani metilenski skupini na poziciji 5. S pomočjo Japp-Klingemannove reakcije med barbiturno kislino in aromatskimi diazonijevimi solmi v etanolni raztopini z dodatkom baze, dobimo arilhidrazone barbiturne kisline, ki se uporabljajo kot intermediati v organskih sintezah ali kot ligandi v koordinacijski kemiji (16). Za sintezo derivatov barbiturne kisline se uporablja tudi Knoevenagelova kondenzacija, ki je definirana kot reakcija med ketonom ali aldehydom in spojino z aktivirano metilensko skupino ob dodatku baze, kot katalizatorja. Knoevenagelovi kondenzaciji pa lahko sledita Michaelova adicija ali Diels-Alderjeva reakcija (18, 19). Najpogosteje se pri sintezi uporablja barbiturna kislina, poleg nje pa še njeni derivati, kot so tiobarbiturna kislina, izonitrobarbiturna kislina, dimetilbarbiturna kislina,

dietilbarbiturna kislina, *N,N'*-dimetilbarbiturna kislina, 5-nitrobarbiturna kislina, *N,N'*-dimetilizonitro barbiturna kislina in purpurna kislina. Barbiturati lahko tvorijo dve vrsti tautomerov, ki se razlikujejo po vsebnosti ciklične iminske ali amidne skupine, kar imenujemo laktam-laktim tautomerija. Do tautomerije lahko pride na eni, dveh ali vseh treh skupinah NHCO . Barbiturna kislina se navadno nahaja v laktamski tautomerni obliki, ker je ta bolj stabilna (16).

2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali dve novi seriji potencialnih antioksidantov na osnovi barbiturne, *N,N'*-dimetilbarbiturne in tiobarbiturne kisline, in sicer serijo 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov (7, 10, 11, 12, 13) in serijo 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov (15, 16, 17, 23, 24). Spojine bomo fizikalno-kemijsko ovrednotili in določili njihovo antioksidativno delovanje. Antioksidativno delovanje bomo ugotavljali s pomočjo DPPH-testa. Spojinam bomo določili srednje efektivne koncentracije (EC₅₀), rezultate pa bomo primerjali med seboj in ugotavljali povezavo med strukturami spojin in njihovim antioksidativnim delovanjem.

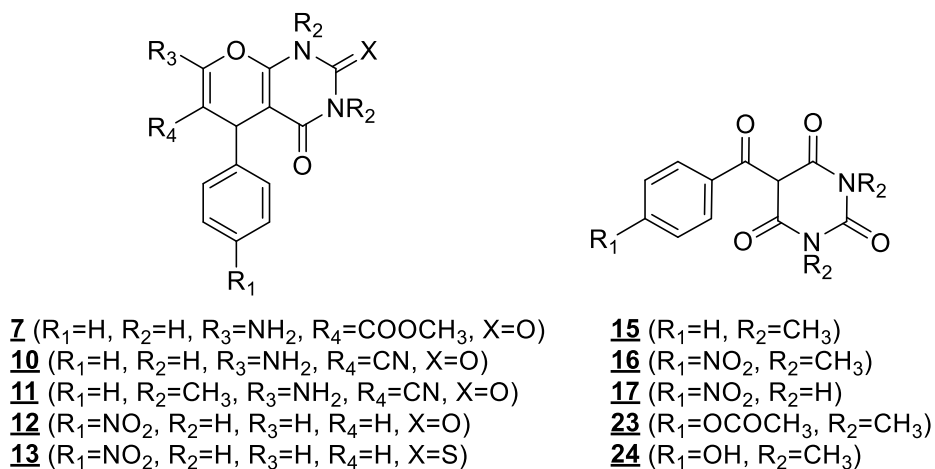
2.1. Načrtovanje potencialnih antioksidantov

S pripravo serij 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov (7, 10, 11, 12, 13) in 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov (15, 16, 17, 23, 24), bomo ugotavljali kako spremembe v strukturi spojin vplivajo na njihovo antioksidativno delovanje. Pri seriji 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov bomo primerjali analoge z nesubstituiranim fenilnim obročem (7, 10, 11) in spojine, ki bodo na *para*-mestu fenilnega obroča vsebovale nitro skupino (12, 13). Pripravili bomo tako derivate barbiturne (7, 10, 11, 12), kot tiobarbiturne kisline (13). Na mesto 6 osnovnega 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionskega skeleta bomo pri nekaterih derivatih uvedli estrsko (7), pri nekaterih pa ciano skupino (10, 11). Pripravili bomo tudi spojino, kjer bomo na dušikove atome osnovnega skeleta uvedli metilne skupine (11) in spojini, ki bosta na mestu 7 vsebovali ciano skupino (10, 11).

Pri seriji 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov nas bo zanimalo, kako na antioksidativne lastnosti vplivajo spremembe na osnovnem skeletu, in sicer uvedba metilnih skupin na dušikove atome (15, 16, 23, 24) ter dodajanje različnih substituentov na fenilni obroč. Na fenilni obroč bomo tako uvedli nitro skupino (16, 17), acetiloksi skupino (23) ali hidroksilno skupino (24).

Najprej bomo pripravili vmesne produkte, ki jih bomo potrebovali pri sintezi končnih spojin. Iz malonske kisline in *N,N'*-dimetilsečnine bomo pripravili *N,N'*-dimetilbarbiturno kislino (3). Pripravili bomo tudi izhodni spojini metil-2-ciano-3-fenilakrilat (6) in 2-benzildenemalononitril (9), ki ju bomo potrebovali za nadaljnje reakcije. Sintaza 5-(4-hidroksibenzoil)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6-triona (24) bo obsegala štiri stopnje, v katerih

bomo najprej zaščitili hidroksilno skupino v 4-hidrobenzojski kislini in z dobljeno spojino nadaljevali sintezo.



Slika 5: Strukture načrtovanih spojin: 1,5-dihidro-piranopirimidin-2,4-dionov (**7**, **10**, **11**, **12**, **13**) in 5-benzoylpirimidin-2,4,6-trionov (**15**, **16**, **17**, **23**, **24**).

2.2. Določanje antioksidativnega delovanja

Končnim spojinam bomo določili antioksidativne lastnosti s pomočjo DPPH-testa. Gre za enega najpogostejše uporabljenih *in vitro* testov za določanje antioksidativnega delovanja spojin. Test je preprost in hiter, njegovi rezultati pa so ponovljivi. Za test bo potrebno najprej izbrati ustrezno topilo, v katerem bodo vse spojine dobro topne, da bomo lahko rezultate med seboj primerjali. Najprej bomo pripravili raztopino DPPH in ji določili absorpcijski maksimum, ki ga bomo potrebovali za kasnejše meritve. Nato bomo pripravili raztopine vzorcev in standarda α -tokoferola. Absorbance bomo merili po končani reakciji med izbrano spojino in radikalom DPPH. Iz dobljenih rezultatov bomo določili vrednosti EC_{50} , ki predstavljajo koncentracijo spojin, ki povzroči redukcijo 50% radikala DPPH. Dobljene rezultate testiranj bomo primerjali s standardom α -tokoferolom. S primerjavo antioksidativnega delovanja pripravljenih spojin med seboj, bomo poskušali ugotoviti, kateri del spojine najbolj vpliva na antioksidativno delovanje.

3. MATERIALI IN METODE

Topila in reagenti

Pri eksperimentalnem delu, smo za izvedbo reakcij uporabljali topila in reagente proizvajalcev: Acros Organics, Carlo Erba, Fluka, Sigma-Aldrich in Merck. Deionizirana voda, ki smo jo uporabljali pri reakcijah, je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo .

Aparature in laboratorijska oprema

Precizna tehtnica: Mettler Toledo PB403

Analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245

Polavtomatske pipete in nastavki za pipete: BRAND in Thermo Scientific

Rotavapor: Buchi 461 WaterBath

Ultrazvočna kopel: Sonis 3 Iskra

Kivete: 1.5 ml semi-mikro kivete za enkratno uporabo, (dimenzije: 12.5 x 12.5 x 45 mm)

Računalniška programska oprema

ChemBioDraw Ultra 14.0 (proizvajalec: CambridgeSoft): risanje kemijskih struktur in reakcijskih shem, poimenovanje spojin in izračun njihovih molekulskih mas.

MS Excel 2010: izpis rezultatov, izris grafov in premic, izračun statističnih podatkov in vrednosti EC₅₀.

Karakterizacija sintetiziranih spojin

Tankoplastna kromatografija (TLC): vzorec smo nanašali na kromatografsko ploščico na aluminijastem nosilcu z 0,22 mm debelo plastjo silikagela (TLC Silica gel 60 F254, Merck). Za detekcijo smo uporabili UV-svetilko z valovno dolžino 254 nm. Mobilna faza, ki smo jo uporabili je bila dikolorometan/metanol v različnih razmerjih.

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR-spektre ¹H in ¹³C smo merili z spektrofotometrom Bruker Avance DPX 400 na Fakulteti za farmacijo. Vzorce smo delektirali v devteriranem topilu DMSO-*d*₆ pri 400 MHz. Spektre smo analizirali z programoma MestReC 4.7.0.0 in MesrReNova 11.0.

Infrardeča (IR) spektroskopija: IR-spektre smo merili s spektrofotometrom Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo. Za merjenje smo uporabili tehniko

oslabljene popolne odbojnosti (ATR). Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P.5.2.

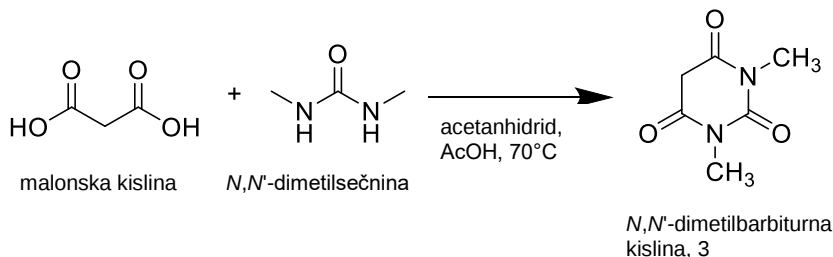
Določanje tališč: Sintetiziranim spojinam smo določali tališča z mikroskopom z ogrevalno mizico, ki segreva spojino, in termometrom. Mikroskop, ki smo ga uporabili, je proizvedla Leica.

Vrednotenje antioksidativnih lastnosti: Za preverjanje jakosti antioksidativnega delovanja spojin smo uporabili test DPPH. Pri tem testu merimo redukcijo radikala DPPH. Za določitev absorpcije testnih raztopin smo uporabili UV/VIS-spektrofotometer CARY 50 CONC. Meritve smo izvajali v plastičnih kivetah. Absorbance smo izmerili z mikrotitrskim čitalcem Synergy H4 Hybrid Reader Biotek, protokol pa smo nastavili v programu Gen5 Biotek. Za test smo uporabili mikrotitrške ploščice s 96 vdolbinami (Techno Plastic Products).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SINTEZA

4.1.1. Sinteza *N,N'*-dimetilbarbiturne kisline (3)



Slika 6: Reakcijska shema sinteze spojine 3.

V 100 ml bučko natehtamo *N,N'*-dimetilsečnino (22.7 mmol, 2.00 g) in malonsko kislino (22.7mmol, 2.36 g) ter dodamo 30 ml očetne kisline in acetanhidrid (4.35 ml, 4.70 g). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri 70 °C na oljni kopeli. Naslednji dan na rotavaporju uparimo topilo pod znižanim tlakom. Preostanku v bučki dodamo etanol (10 ml) in ga uparimo pod znižanim tlakom. Nato preostanku v bučki dodamo še dietileter (10 ml) in ga uparimo pod znižanim tlakom. Pri tem dobimo oborino v obliki prozornih kristalov, ki jih suspendiramo v dietiletru, odnučamo ter speremo z dietiletrom (5 ml). Produkt sušimo v sušilniku pri 65 °C 10 min, da odstranimo ves dietileter.

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 776 mg

Molekulska masa:156.14 g/mol

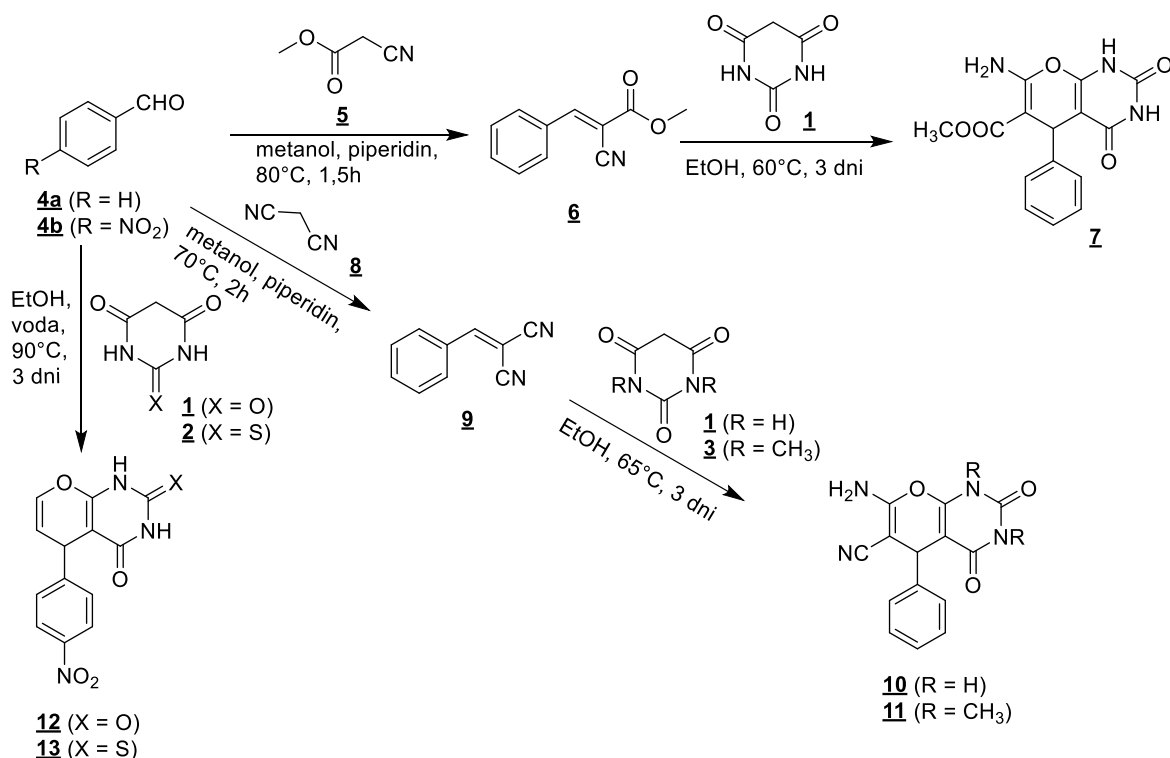
Izkoristek reakcije: 22%

Tališče: 100-104 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.11 (s, 6H, 2 $\times$ CH $_3$), 3.71 (s, 2H, CH $_2$) ppm

IR (ATR): 2969, 2929, 1691, 1654, 1526, 1446, 1418, 1387, 1356, 1313, 1276, 1261, 1211, 1150, 1116, 1032, 985, 933, 786, 762, 714, 688, 636 cm $^{-1}$

4.1.2. Sinteza 1,5-dihidro-piranopirimidin-2,4-dionov



Slika 7: Shema sinteze 1,5-dihidro-piranopirimidin-2,4-dionov (**7**, **10**, **11**, **12**, **13**)

Sinteza metil (*E*)-2-ciano-3-fenilakrilata (**6**)

V 50 ml bučko dodamo metanol (13 ml), benzaldehid (1.05 ml, 1.06 g, 10 mmol, **4a**) in 2-cianoacetat (0.9 ml, 1.87 g, 10 mmol; **5**) ter nekaj kapljic piperidina. Po dodatku piperidina se barva raztopine spremeni iz brezbarvne v rumeno. Tako pripravljeno reakcijsko zmes mešamo 1.5 ure pri 80 °C. Bučko pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo in jo postavimo v hladilnik, kjer se začnejo tvoriti kristali. Kristale odnučamo, speremo s hladnim metanolom (20 ml) in jih posušimo na sobni temperaturi.

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 996 mg

Molekulska masa: 189.21 g/mol

Izkoristek reakcije: 53%

Temperatura tališča: 71-74 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.87 (s, 3H, CH₃), 7.52-7.70 (m, 3H, Ar-H), 8.01-8.14 (m, 2H, Ar-H), 8.43 (s, 1H, CH) ppm

IR (ATR): 3034, 2955, 2225, 1725, 1690, 1606, 1570, 1498, 1448, 1429, 1320, 1295, 1263, 1203, 1149, 1103, 1090, 1072, 1001, 968, 920, 840, 786, 765, 751, 705, 682, 615, 582 cm⁻¹

Sinteza metil-7-amino-2,3-diokso-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirano[2,3-d]pirimidin-6-karboksilata (7**)**

V 25 ml bučki v etanolu (2 ml) raztopimo metil-2-ciano-3-fenilacetat (100 mg, 0,53mmol; **6**). V drugi 25 ml bučki naredimo suspenzijo barbiturne kisline (68 mg, 0.53 mmol; **1**) v etanolu (2 ml). Vsebino prve bučke dodamo k vsebini druge bučke. Reakcijsko zmes segrevamo tri dni pri 60 °C. Bučko ohladimo na sobno temperaturo, oborino odnučamo ter speremo z etanolom (5 ml). Dobljen produkt sušimo v sušilniku eno uro pri 80 °C. Surov produkt čistimo tako, da ga prelijemo z vodo (3 ml), suspenzijo odnučamo in produkt posušimo.

Lastnosti produkta:

Izgled: bela trdna snov

Masa: 23 mg

Molekulska masa: 315.28 g/mol

Izkoristek reakcije: 14%

Temperatura tališča: 181-184 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.51 (s, 3H, CH₃), 4.52 (s, 1H, CH), 7.04-7.32 (m, 5H, Ar-H), 7.64 (s, 2H, NH₂), 11.00 (s, 1H, NH), 12.05 (s, 1H, NH) ppm

IR (ATR): 3386, 3292, 3140, 3028, 2814, 1693, 1645, 1624, 1504, 1493, 1433, 1417, 1384, 1334, 1287, 1254, 1232, 1195, 1080, 1057, 1029, 1006, 938, 911, 871, 840, 815, 785, 771, 756, 737, 720, 690, 673, 662, 619, 611 cm⁻¹

Sinteza 2-benzildenemalononitrila (9**)**

V 50 ml bučko odmerimo metanol (18 ml) in benzaldehid (1.50 ml, 1.50 g, 15.0 mmol; **4a**). V bučko dodamo malononitril (0.991 g, 15.0 mmol; **8**) in piperidin (nekaj kapljic). Bučko refluktiramo 2 uri pri 70 °C, ohladimo na sobno temperaturo in čez noč postavimo v

hladilnik. Naslednji dan se produkt obori v obliki belih kristalov. Produkt odnučamo in speremo s hladnim metanolom (20 ml).

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 233 mg

Molekulska masa: 154.17 g/mol

Izkoristek reakcije: 10%

Temperatura tališča: 71-75 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.60-7.75 (m, 3H, Ar-H), 7.93-8.00 (m, 2H, Ar-H), 8.57 (s, 1H, CH) ppm

IR (ATR): 3033, 2223, 1673, 1589, 1567, 1519, 1490, 1450, 1373, 1353, 1335, 1317, 1297, 1216, 1186, 1164, 1151, 1101, 1069, 1027, 1000, 970, 958, 918, 858, 831, 800, 776, 754, 704, 677, 624, 616 cm⁻¹

Sinteza 7-amino-2,4-diokso-5-fenil-1,3,4,5-tetrahidro-2H-pirano[2,3-*d*]pirimidin-6-karbonitrila (10**)**

V 25 ml bučki v 2 ml etanola raztopimo 2-benzilmalononitril (100 mg, 0.65 mmol; **9**), pri čemer si pomagamo s segrevanjem in z ultrazvokom. V drugi 25 ml bučki v 2 ml etanola suspendiramo barbiturno kislino (83.3 mg, 0.65 mmol; **1**). Vsebino prve bučke prenesemo v drugo bučko. Suspenzijo segrevamo 48 ur na oljni kopeli pri 65 °C. Oborino odnučamo in speremo s 5 ml etanola.

Lastnosti produkta:

Izgled: bela trdna snov

Masa: 130 mg

Molekulska masa: 282.25 g/mol

Izkoristek reakcije: 71%

Temperatura tališča: 184-187 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.22 (s, 1H, CH), 7.12 (s, 2H, NH₂), 7.16-7.25 (m, 3H, Ar-H), 7.25-7.36 (m, 2H, Ar-H), 11.07 (s, 1H, NH), 12.08 (s, 1H, NH) ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 35.62, 58.80, 88.43, 119.18, 126.69, 127.26, 128.25, 144.13, 149.49, 152.24, 157.57, 162.42 ppm

IR (ATR): 3382, 3186, 3068, 2961, 2356, 2194, 2211, 2168, 2158, 2143, 2068, 2049, 2022, 1994, 1975, 1907, 1721, 1661, 1637, 1600, 1585, 1521, 1484, 1441, 1405, 1344, 1295, 1278, 1240, 1217, 1194, 1181, 1083, 1052, 1026, 998, 978, 954, 913, 839, 821, 806, 780, 766, 753, 731, 705, 690, 657, 608 cm⁻¹

Sinteza 7-amino-1,3-dimetil-2,4-diokso-5-fenil-1,3,4,5-tetrahidro-2H-pirano[2,3-d]pirimidin-6-karbonitrila (11)

V 25 ml bučki v 2 ml etanola raztopimo 2-benzilidenmalononitril (100 mg, 0.65 mmol; 9), pri čemer si pomagamo s segrevanjem in z ultrazvokom. V drugi 25 ml bučki v 2 ml etanola suspendiramo *N,N'*-dimetilbarbiturno kislino (103 mg, 0.65 mmol; 3). Vsebino prve bučke prenesemo v drugo bučko. Suspenzijo segrevamo 48 ur na oljni kopeli pri 65 °C. Oborino odnučamo in speremo s 5 ml etanola.

Lastnosti produkta:

Izgled: pastelno rumena trdna snov

Masa: 97 mg

Molekulska masa: 310.31 g/mol

Izkoristek reakcije: 48%

Temperatura tališča: 195-199 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.08 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 3H, CH₃), 4.32 (s, 1H, CH), 7.13-7.30 (m, 5H, Ar-H), 7.33 (s, 2H, NH₂) ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.64, 29.09, 36.47, 58.59, 88.76, 119.05, 126.74, 127.30, 128.25, 144.11, 149.97, 151.10, 157.63, 160.45 ppm

IR (ATR): 3374, 3305, 3261, 3190, 2195, 1702, 1681, 1637, 1600, 1491, 1455, 1405, 1386, 1370, 1341, 1307, 1264, 1231, 1192, 1082, 1040, 1030, 1001, 968, 947, 910, 848, 834, 809, 785, 767, 752, 741, 714, 702, 684, 669 cm⁻¹

Sinteza 5-(4-nitrofenil)-1,5-dihidro-2H-pirano[2,3-d]pirimidin-2,4(3H)-diona (12)

V 50 ml bučko natehtamo barbiturno kislino (128 mg, 1.00 mmol; 1) in 3-nitrobenzaldehyd (151 mg, 1.00 mmol; 4b) ter dodamo 10 ml vode in 10 ml etanola. Suspenzijo segrevamo 48 ur na oljni kopeli pri 90 °C. Drugi dan dodamo 10 ml vode in 10 ml etanola, oborino odnučamo in speremo z 20 ml etanola. Sušimo v sušilniku 1 uro na 70 °C.

Lastnosti produkta:

Izgled: rumena trdna snov

Masa: 65 mg

Molekulska masa: 287.23 g/mol

Izkoristek reakcije: 22,6 %

Temperatura tališča: >250 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.79 (d, 1H, *J*=15.6 Hz, CH), 7.91 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, Ar-H-2,6), 8.01 (d, 1H, *J*=11.8 Hz, CH), 8.31 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, Ar-H-3,5), 8.54 (dd, 1H, *J*=15.6, 11.8 Hz, CH), 11.29 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH) ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 117.94, 124.34, 127.80, 129.34, 141.44, 148.02, 148.58, 150.28, 151.76, 162.80, 162.87 ppm

IR (ATR): 3173, 3109, 3011, 2855, 1740, 1663, 1606, 1587, 1563, 1513, 1446, 1416, 1370, 1332, 1305, 1218, 1168, 1113, 1104, 1060, 998, 954, 840, 746 cm⁻¹

Sinteza 5-(4-nitrofenil)-2-tiookso-1,2,3,5-tetrahidro-4*H*-pirano[2,3-*d*]pirimidin-4-ona (13)

V 50 ml bučko natehtamo tiobarbiturno kislino (144 mg, 1.00 mmol; **2**) in 3-nitrobenzaldehyd (151 mg, 1.00 mmol; **4b**) ter dodamo 10 ml vode in 10 ml etanola. Suspenzijo segrevamo 48 ur pri 90 °C. Dobljeni produkt odnučamo in speremo z 20 ml etanola. Produkt sušimo v sušilniku 1 uro na 70 °C.

Lastnosti produkta:

Izgled: oranžna trdna snov

Masa: 42 mg

Molekulska masa: 303.9 g/mol

Izkoristek reakcije: 14%

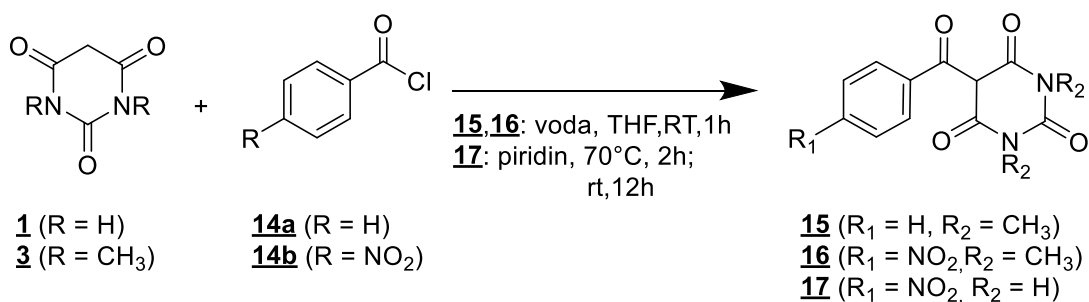
Temperatura tališča: >250 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.88 (s, 1H, CH), 7.92 (d, 2H, *J*=8.9 Hz, Ar-H-2,6), 8.03 (d, 1H, *J*=11.8 Hz, CH), 8.31 (d, 2H, *J*=8.9 Hz, Ar-H-3,5), 8.54 (dd, 1H, *J*=15.6, 11.8 Hz, CH), 12.38 (s, 1H, NH), 12.41 (s, 1H, NH) ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 118.02, 124.36, 128.04, 129.49, 141.35, 148.12, 149.42, 152.61, 160.67, 161.12, 178.63 ppm

IR (ATR): 3040, 2882, 1708, 1660, 1592, 1551, 1510, 1445, 1414, 1375, 1337, 1312, 1290, 1213, 1169, 1113, 1103, 1052, 1008, 992, 950, 886, 868, 838, 802, 784, 745, 693, 652 cm⁻¹

4.1.3. Sinteza 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov



Slika 8: Shema sinteze 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov (**15**, **16**, **17**)

Sinteza 5-benzoil-1,3-dimetilpirimidin-2,3,6-triona (**15**)

V 50 ml bučki v 5 ml vode raztopimo natrijev hidrogen karbonat (4.80 mmol, 403 mg) in *N,N*-dimetilbarbiturno kislino (500 mg, 3.20 mmol, **3**) in mešamo na sobni temperaturi 5 minut. V drugo 50 ml bučko odmerimo 20 ml THF, dodamo benzoil klorid (370 µl, 448 mg, 3.20 mmol; **14a**) in to raztopino dodamo k raztopini *N,N*-dimetilbarbiturne kisline. Po eni uri se barva raztopine spremeni iz rumene v temno rdečo. Večino topila odparimo in prostanek nakisamo z 1 M HCl do pH 2. Oborino odnučamo in jo speremo z vodo (5 ml). Surov produkt čistimo s kristalizacijo iz etanola (4 ml).

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 68 mg

Molekulska masa: 260.25 g/mol

Izkoristek reakcije: 8%

Temperatura tališča: 97-98 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.19 (s, 6H, 2×CH₃), 7.42-7.51 (m, 2H, Ar-H), 7.54-7.58 (m, 3H, Ar-H) ppm – signal za CH je skrit pod signalom za vodo

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.75, 95.68, 127.59, 128.30, 131.35, 135.11, 150.24, 164.57, 189.28 ppm

IR (ATR): 3068, 2962, 2531, 2046, 2034, 2018, 1980, 1923, 1721, 1660, 1600, 1585, 1532, 1481, 1445, 1428, 1403, 1351, 1295, 1272, 1207, 1181, 1082, 1053, 998, 976, 954, 851, 821, 806, 780, 766, 753, 727, 706, 692, 673, 645, 577 cm⁻¹

Sinteza 4-nitro-5-benzoil-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6-triona (16)

V 50 ml bučki v 5 ml vode raztopimo natrijev hidrogen karbonat (2.40 mmol, 201 mg) in *N,N*-dimetilbarbiturno kislino (500 mg, 1.60 mmol; 3) in mešamo na sobni temperaturi 5 minut. V drugo 50 ml bučko odmerimo 20 ml THF, dodamo 4-nitrobenzoil klorid (297 mg; 1,60 mmol; 12b) in to raztopino dodamo k raztopini *N,N*-dimetilbarbiturne kisline. Po eni uri se barva raztopine spremeni iz rumene v temno rdečo. Večino topila odparimo in preostanek nakisamo z 1 M HCl do pH 2. Oborino odnučamo in jo speremo z vodo (5 ml). Surov produkt čistimo s kristalizacijo iz etanola (4 ml).

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 211 mg

Molekulska masa: 305.24 g/mol

Izkoristek reakcije: 84%

Temperatura tališča: 183-185 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.17 (s, 3H, 2×CH₃), 7.76 (d, *J*=8.8 Hz, Ar-H-2,6), 8.30 (d, *J*=8.8 Hz, Ar-H-3,5) ppm – signal za CH je skrit pod signalom za vodo

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.69, 96.26, 122.95, 129.25, 148.42, 150.32, 164.42, 165.91, 187.04 ppm

IR (ATR): 3104, 3052, 2856, 2362, 2162, 1719, 1670, 1620, 1598, 1515, 1486, 1441, 1349, 1313, 1294, 1270, 1219, 1202, 1112, 1073, 1007, 977, 950, 858, 829, 812, 800, 777, 754, 702, 680 cm⁻¹

Sinteza 5-(4-nitrobenzoil)pirimidin-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (17)

V 25 ml bučki suspendiramo barbiturno kislino (250 mg, 1.24 mmol; 1) v piridinu (10 mL) in suspenzijo segrevamo čez noč pri 70 °C na oljni kopeli, pri čemer se barbiturna kislina delno raztopi. V bučko nato dodamo 4-nitrobenzoil klorid (231 mg, 1.24 mmol; 14b) in reakcijsko zmes mešamo dve uri pri 70 °C in nato čez noč pri sobni temperaturi. Topilo odparimo pod znižanim tlakom do nastanka trdne temne oborine. Trden preostanek

raztopimo v 40 ml vroče vode, nakisamo z 1 M HCl do pH 2 in pustimo dve uri na sobni temperaturi, da izpade bela oborina. Oborino odnučamo in speremo z 10 ml vode.

Lastnosti produkta:

Izgled: bela trdna snov

Masa: 13 mg

Molekulska masa: 277.19 g/mol

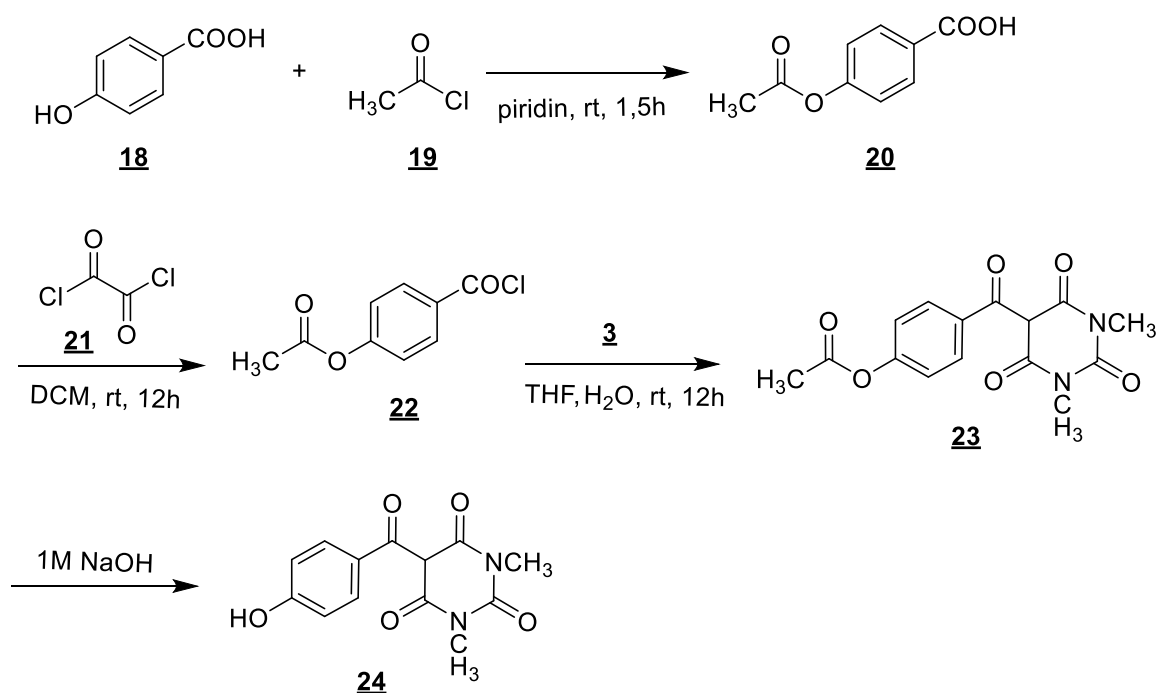
Izkoristek reakcije: 4%

Temperatura tališča: >250 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.80 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, Ar-H-2,6), 8.28 (d, 2H, *J*=8.8 Hz, Ar-H-3,5), 11.56 (s, 2H, 2×NH) ppm – signal za CH je skrit pod signalom za vodo

IR (ATR): 3111, 3020, 2832, 1747, 1652, 1600, 1515, 1472, 1429, 1350, 1312, 1296, 1257, 1186, 1163, 1123, 1112, 1061, 1014, 998, 965, 863, 851, 802, 760, 740, 712, 686 cm⁻¹

Sinteza 5-(4-hidroksibenzoil)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**24**)



Slika 9: Shema sinteze 5-(4-hidroksibenzoil)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**24**)

1. stopnja: Sinteza 4-acetoksibenzojske kisline (20)

V 50 ml bučki raztopimo 4-hidrobenzojsko kislino (2.00 g, 14.5 mmol; 18) v 6 ml piridina. Raztopino mešamo na ledeni kopeli 5 min in nato dodamo acetilklorid (1.2 ml, 95.4 mg, 16.9 mmol; 19). Reakcijsko zmes mešamo pol ure na ledeni kopeli in nato še 1 h na sobni temperaturi. V 100 ml bučko nalijemo 50 ml hladne vode in vanjo prilijemo raztopino iz prve bučke. Raztopino nakisamo do pH 2 s koncentrirano HCl, nastalo oborino odnučamo, speremo z 20 ml vode in posušimo na zraku.

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 13 mg

Molekulska masa: 180.16

Izkoristek reakcije: 23%

Temperatura tališča: 167-171 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.30 (s, 3H, CH₃), 7.27 (d, 2H, $J=8.6$ Hz, Ar-H-3,5), 7.99 (d, 2H, $J=8.6$ Hz, Ar-H-2,6), 13.03 (s, 1H, COOH) ppm

IR (ATR): 3035, 2955, 2841, 2670, 2558, 2359, 2226, 1755, 1726, 1678, 1604, 1570, 1508, 1429, 1370, 1318, 1295, 1186, 1163, 1129, 1104, 1092, 1045, 1014, 938, 913, 862, 840, 824, 790, 759, 697, 674, 633, 616, 593 cm⁻¹

2. stopinja: Sinteza 4-(klorokarbonil)fenil acetata (22)

4-acetilbenzojsko kislino (100 mg, 0.55 mmol; 20) posušimo na membranski črpalki, jo raztopimo v brezvodnem diklorometanu (4 ml) in raztopino mešamo pod inertno atmosfero na sobni temperaturi 20 ur. Dodamo oksalil klorid (95.3 μL , 141 mg, 1.11 mmol; 21) in reakcijsko zmes mešamo na sobni temperaturi čez noč. Z rotavaporjem odparimo topilo, da dobimo oljast preostanek, ki ga uporabimo v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

Lastnosti produkta:

Izgled: svetlo rumeno olje

Molekulska masa: 198.6 g/mol

3. stopnja: Sinteza 4-(1,3-dimetil-2,4,6-trioksoheksahidropirimidin-5-karbonil)fenil acetata (**23**)

V 25 ml bučki v 2 ml vode raztopimo *N,N*-dimetilbarbiturnokislino (85.9 mg, 0.55 mmol; **3**) in natrijev hidrogen karbonat (69 mg, 0.82 mmol) ter raztopino mešamo pri sobni temperaturi 5 minut. V drugi bučki raztopimo spojino **22** (109 mg, 0.55 mmol) v 3 ml THF in to raztopino postopoma dodamo k raztopini *N,N*-dimetilbarbiturne kisline. Reakcijsko zmes mešamo pri sobni temperaturi čez noč. Po poteku reakcije se barva raztopine spremeni iz rumene v rdečo. Raztopino nakisamo do pH 2 z 1 M HCl, bučko postavimo na ultrazvok, da se začne tvoriti bela oborina, ki jo odnučamo in speremo z 5 ml vode. Surov produkt čistimo s prekristalizacijo iz etanola (4 ml).

Lastnosti produkta:

Izgled: beli kristali

Masa: 64 mg

Molekulska masa: 318.18 g/mol

Izkoristek reakcije: 37%

Temperatura tališča: 157-160 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.31 (s, 3H, COCH₃), 3.19 (s, 6H, 2×CH₃), 7.23 (d, 2H, *J*=8.6 Hz, Ar-H-2,6), 7.63 (d, 2H, *J*=8.6 Hz, Ar-H-3,5) ppm – signal za CH je skrit pod signalom za vodo

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.88, 27.77, 95.66, 121.13, 130.15, 132.54, 150.24, 152.77, 164.74, 168.93, 188.38 ppm

IR (ATR): 1760, 1728, 1674, 1592, 1530, 1480, 1428, 1371, 1294, 1267, 1200, 1166, 1114, 1081, 1049, 1010, 982, 943, 914, 851, 833, 816, 794, 775, 752, 728 cm⁻¹

4. stopnja: Sinteza 5-(4-hidroksibenzoil)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**24**)

V 20 ml bučki raztopimo spojino **23** (46 mg, 0.14 mmol) v 3 mL metanola, dodamo 1 M NaOH (210 μ L) in raztopino mešamo pri sobni temperaturi čez noč. Odparimo topilo, dodamo 15 ml etil acetata in 20 ml 0.1 M HCl ter fazi ločimo. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo na rotavaporju, da dobimo produkt v obliki bele trdne snovi.

Lastnosti produkta:

Izgled: bela trdna snov

Masa: 23 mg

Molekulska masa: 276.24 g/mol

Izkoristek reakcije: 60%

Temperatura tališča: 229-233 °C

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.19 (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 6.80 (d, 2H, J =8.8 Hz, Ar-H-3,5), 7.54 (d, 2H, J =8.8 Hz, Ar-H-2,6), 10.34 (s, 1H, OH) ppm – signal za CH je skrit pod signalom za vodo

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 27.79, 94.40, 114.22, 124.84, 131.89, 150.25, 161.55, 164.88, 188.81 ppm

IR (ATR): 3272, 2961, 1727, 1641, 1606, 1590, 1530, 1484, 1443, 1400, 1363, 1308, 1270, 1211, 1178, 1112, 1086, 1055, 981, 949, 850, 839, 804, 772, 752, 729, 707 cm⁻¹

4.2. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI SPOJIN

4.2.1. Priprava raztopin DPPH in vzorcev

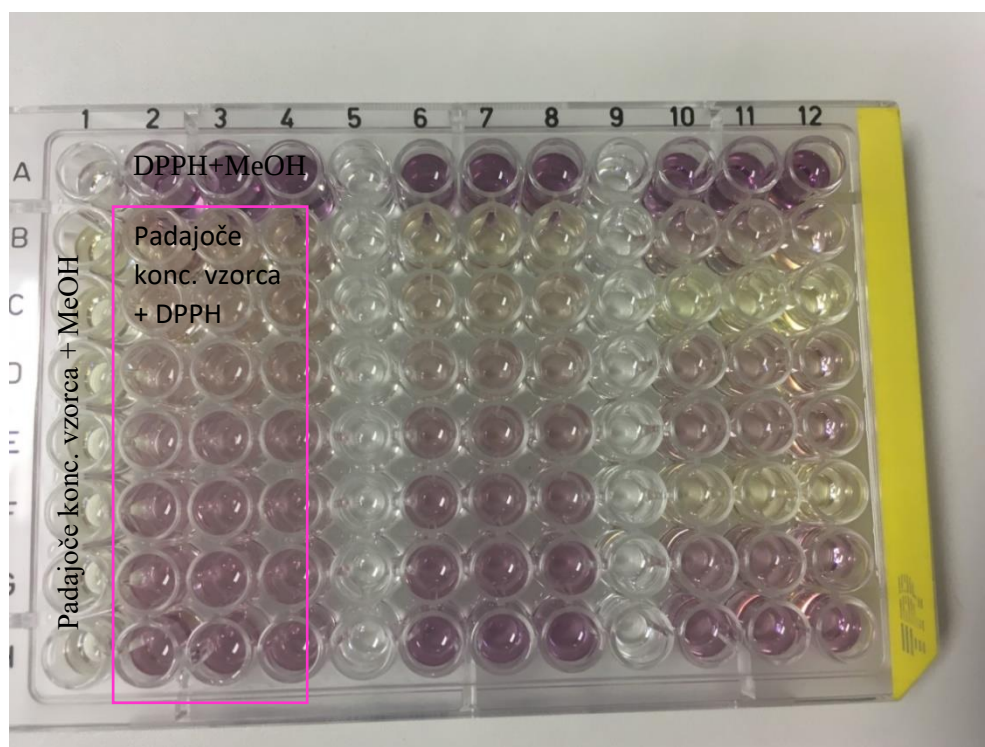
Raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo v 25 ml merilno bučko natehtali 6.90 mg DPPH, bučko najprej do tretjine dopolnili z metanolom, jo dobro premešali, da se je ves DPPH raztopil, nato pa dopolnili do oznake z metanolom. Bučko smo zaščitili z aluminijasto folijo, ker je DPPH občutljiv na svetlobo, ter jo do uporabe hranili v hladilniku. Tako pripravljeno raztopino DPPH smo v hladilniku hranili dva dni, po tem času pa smo jo zavrgli in pripravili svežo. Koncentracija DPPH v tako pripravljene raztopini je bila 700 μM , pred uporabo pa smo jo redčili do koncentracije 140 μM . To smo storili tako, da smo 2 ml osnovne raztopine v merilni bučki z metanolom dopolnili do 10 ml. Meritve absorbanc in absorpcijskih maksimumov smo izvajali z UV/VIS spektrofotometrom. Testno raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo v kiveti zmešali 500 μL 140 μM DPPH in 500 μL metanola, da smo dobili končno koncentracijo DPPH 70 μM . Absorbanca tako pripravljene raztopine je znašala 0.89, absorpcijski maksimum pa je bil pri 515 nm.

V nadaljevanju smo pripravili 600 μM raztopino standarda α -tokoferola. Pripravili smo jo tako, da smo ustrezno količino α -tokoferola (0.93 mg) raztopili v mešanici metanola in DMSO v razmerju 1:1 (3.6 mL). Čeprav je α -tokoferol topen v metanolu, smo zaradi lažje primerjave uporabili enako topilo, kot za vzorce. Vzorce smo pripravili tako, da smo ustrezno količino vzorca natehtali v penicilinko in mu dodali mešanico metanola in DMSO v razmerju 1:1. Tako smo dobili najvišjo koncentracijo vzorca, ki smo jo nato šestkrat redčili. Najprej smo pripravili dva vzorca z najvišjo koncentracijo 0.6 mM in najnižjo koncentracijo 0.025 mM. Ostale vzorce smo na podlagi rezultatov meritev prvih dveh vzorcev pripravili v koncentracijah od 0.8 mM do 0.05 mM.

4.2.2. Priprava mikrotitrne ploščice, merjenje absorbanc in izračun vrednosti EC_{50}

Vse pripravljene raztopine smo nanесли na mikrotitrsko ploščico. Na eno ploščico smo nanесли tri različne vzorce. Pri ploščici smo morali biti pozorni, da je bila čista, suha in da se je nismo dotikali s spodnje strani, saj bi bile lahko v nasprotnem primeru meritve netočne. Za eno spojino smo porabili 4 stolpce. V prvo vdolbino smo nanесли 100 μL

mešanice metanola in DMSO v razmerju 1:1 in 100 μL metanola. V naslednje vdolbine v istem stolpcu smo nanесли slepe vzorce, t.j. raztopine vzorcev v padajočih koncentracijah. V vsako vdolbinico smo nanесли 100 μL vzorca in ji dodali 100 μL metanola. Prvi stolpec nam je služil kot ozadje, ki smo ga kasneje odšteli od rezultatov absorbanc testnih raztopin po končani reakciji z DPPH. V naslednje tri vdolbinice v prvi vrstici smo nanесли 100 μL mešanice metanola in DMSO v razmerju 1:1 in 100 μL 140 μM raztopine DPPH. Zaradi redčenja smo v vdolbinicah dobili polovične koncentracije DPPH, torej je bila merjena koncentracija DPPH 70 μM . V preostalih vrsticah smo v vdolbine nanесли po 100 μL 140 μM raztopine DPPH in 100 μL ustrezne raztopine vzorca, tako da je bila v posamezni vrstici enaka koncentracija vzorca, koncentracija pa je padala po stolpcu navzdol. Koncentracije vzorcev, ki smo jih nanašali v vdolbine niso bile za vse vzorce enake, saj so bile odvisne tudi od aktivnosti spojin. Za bolj aktivne spojine smo morali meritve ponoviti večkrat z različnimi koncentracijami, da smo dobili optimalne rezultate. Po nanosu vseh testnih raztopin, smo mikrotitrsko ploščico inkubirali 1.5 h v temi pri sobni temperaturi in nato z mikrotitrskim čitalcem, po ustreznem protokolu, izmerili vrednosti absorbanc. Rezultate meritev smo analizirali s programom Excel. Izračunali smo odstotke reduciranega DPPH, narisali graf s trendno črto in po ustrezni enačbi izračunali vrednosti srednjih efektivnih koncentracij (EC_{50}).

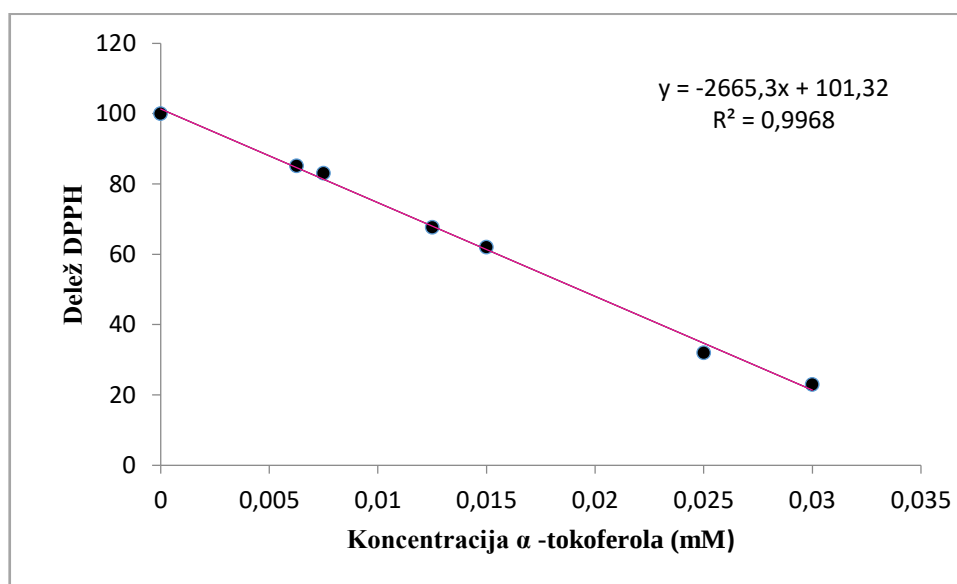


Slika 10: Mikrotitrsko ploščica po reakciji med spojinami in DPPH

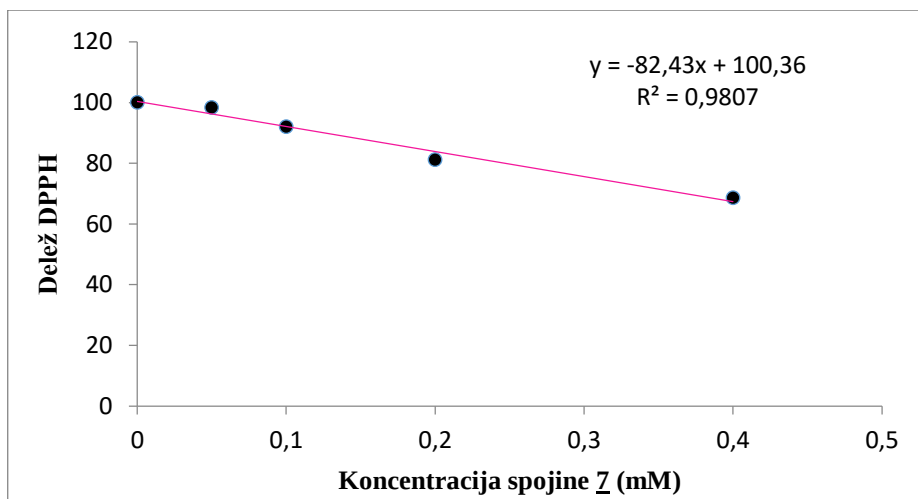
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Rezultati meritev antioksidativnega delovanja spojin

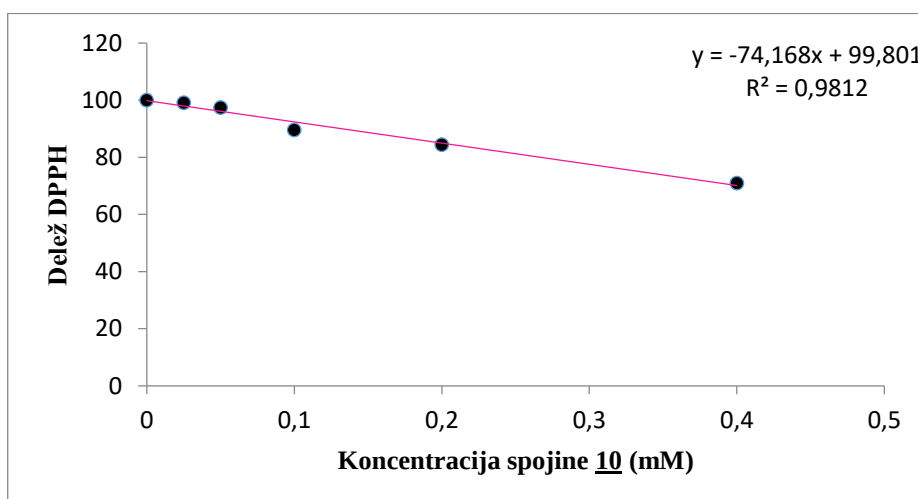
Antioksidativno delovanje spojin smo določali s pomočjo DPPH-testa, ki temelji na principu redukcije stabilnega radikala DPPH v DPPH-H, ki pri valovni dolžini 515 nM absorbira šibkeje. Pri meritvah smo spremljali delež DPPH, ki se je reduciral v končni točki reakcije, kar je bilo v našem primeru po 1.5 h. Uporabljene testne koncentracije spojin so se razlikovale, saj so bile spojine različno aktivne. Vsako spojino smo merili pri vsaj sedmih različnih koncentracijah, v treh paralelah. Te meritve smo uporabili za izračun vrednosti EC_{50} , t.j. koncentracije testne spojine, kjer pride do redukcije 50% DPPH. Rezultate smo predstavili v obliki diagramov (Slike 11-21). Poleg diagramov za naše spojine je dodan tudi diagram za standard α -tokoferola, s katerim smo naše spojine primerjali.



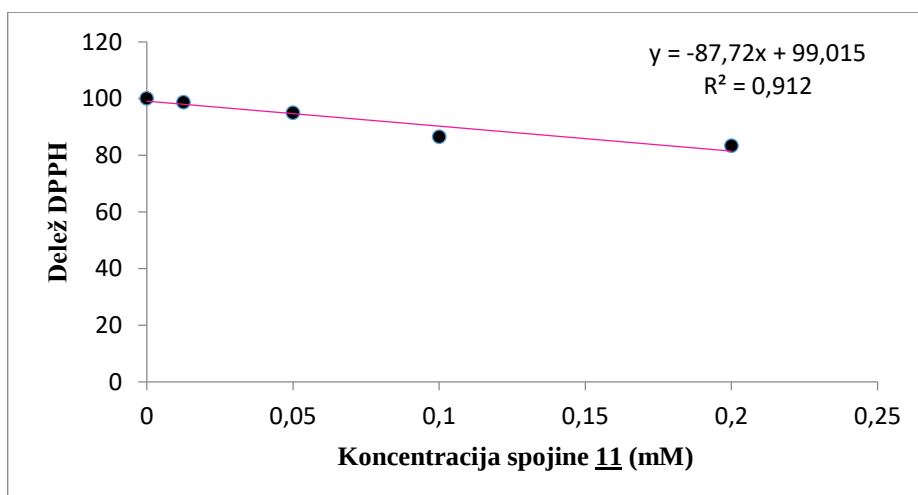
Slika 11: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije α -tokoferola.



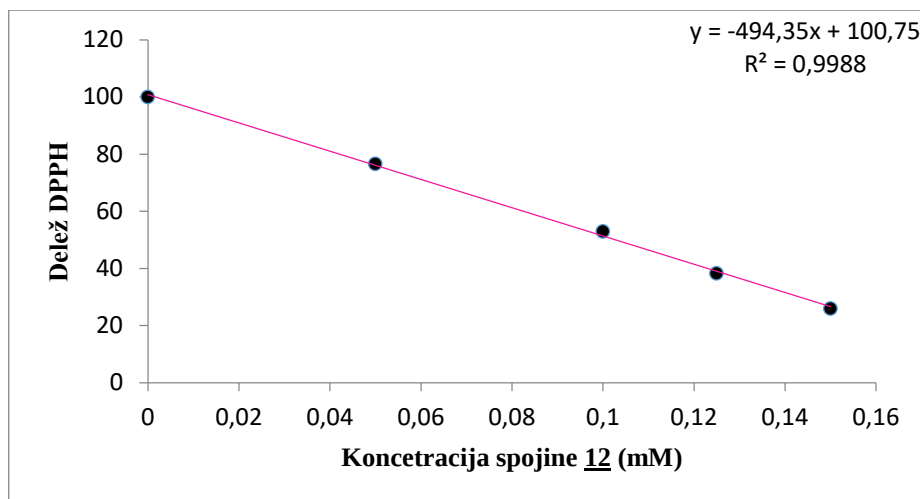
Slika 12: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 7



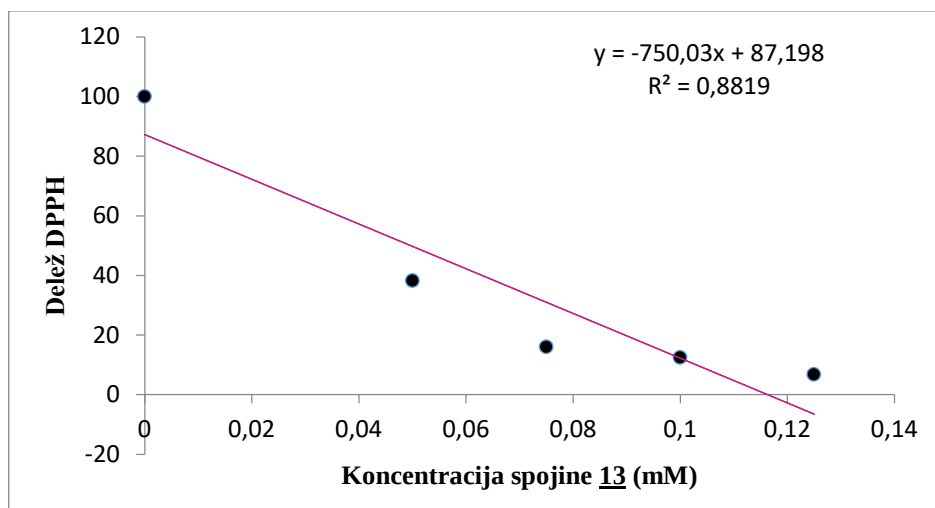
Slika 13: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 10



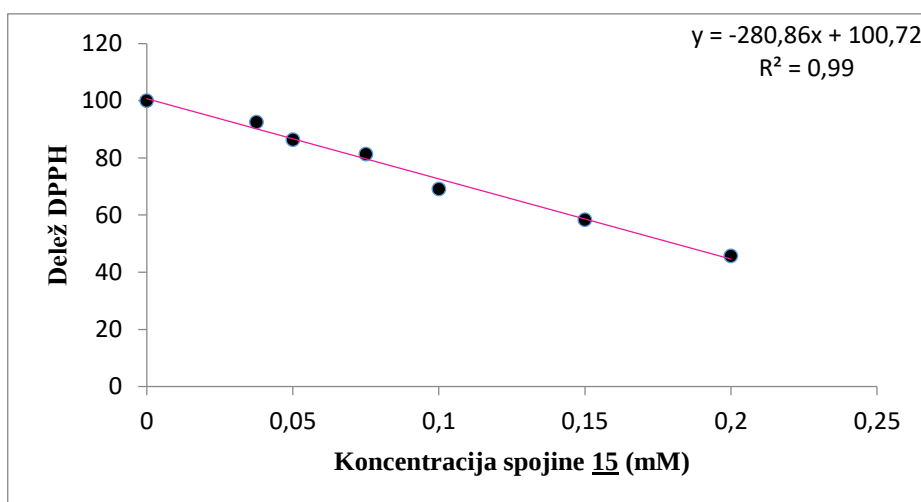
Slika 14: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 11



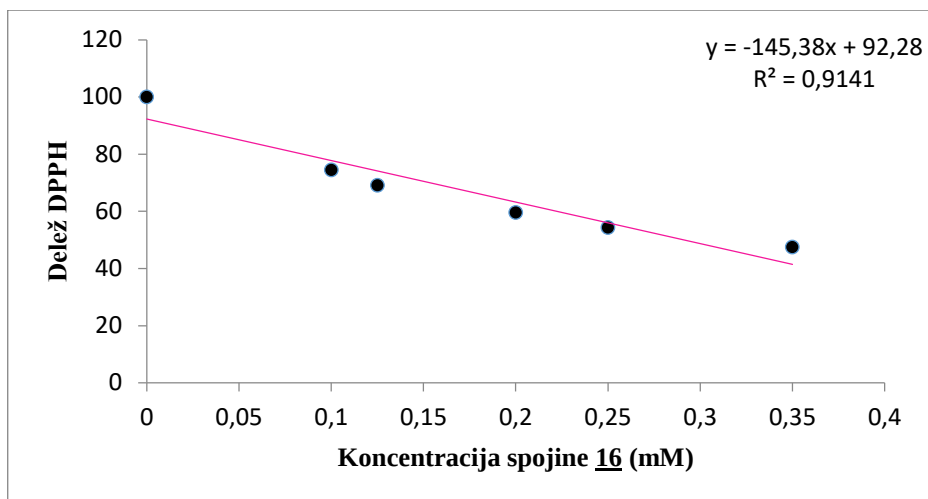
Slika 15: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 12



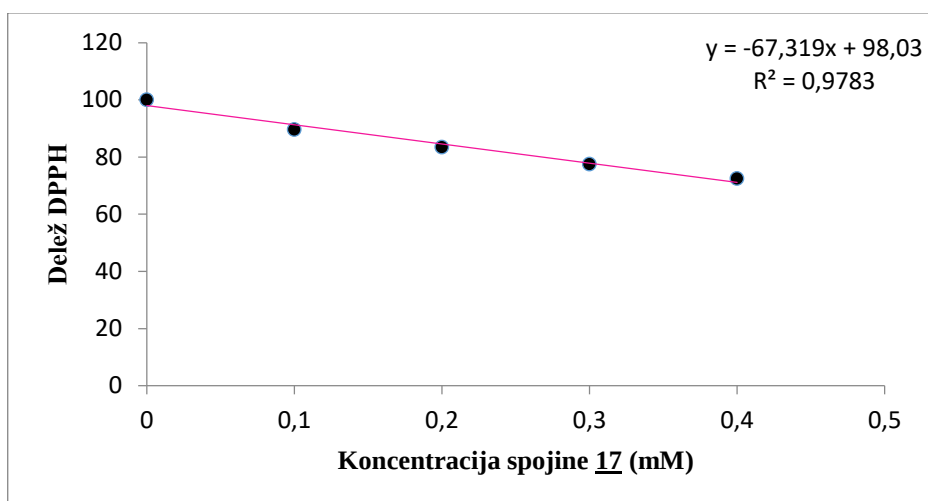
Slika 16: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 13



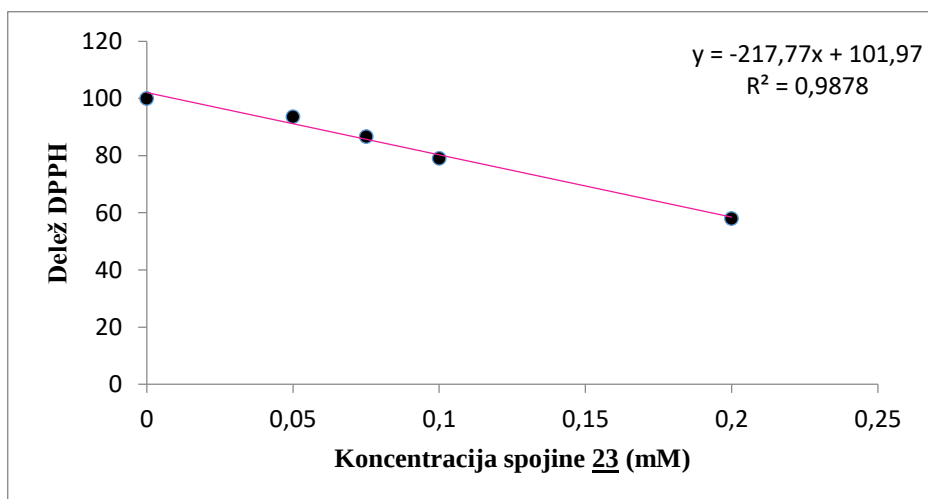
Slika 17: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 15



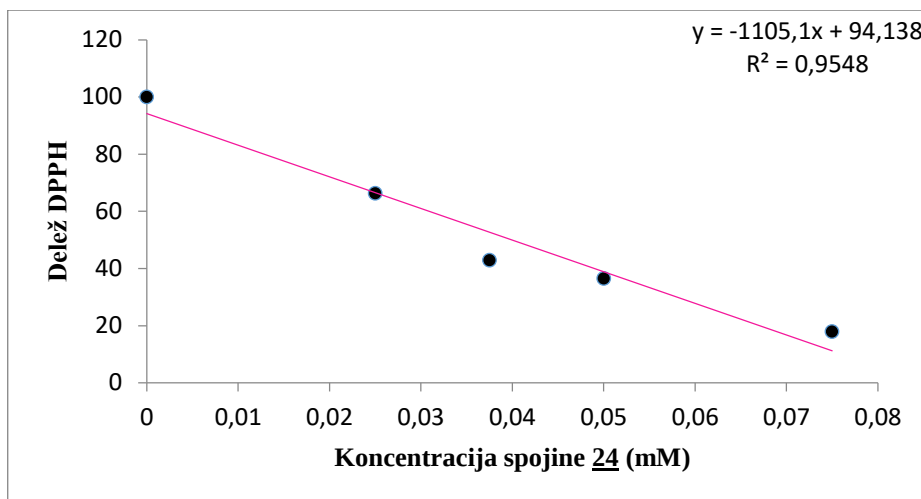
Slika 18: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **16**



Slika 19: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **17**



Slika 20: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **23**

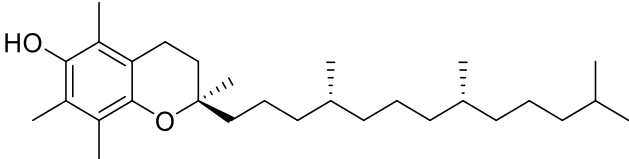
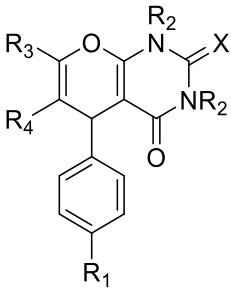
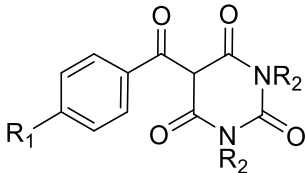


Slika 21: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 24

5.1.1. Vrednosti srednjih efektivnih koncentracij spojin

V Tabeli 1 so podane vrednosti EC_{50} in njihova standardna napaka za spojine **7**, **10-13**, **15-17**, **23** in **24** in standard α -tokoferol. Vrednost EC_{50} nam pove, pri kateri koncentraciji je prišlo do redukcije 50% radikala DPPH. Izračunali smo jo iz enačbe umeritvene premice.

Tabela 22: Vrednosti srednjih efektivnih koncentracij (EC_{50}) spojin **7**, **10-13**, **15-17**, **23** in **24** in standarda α -tokoferola.

spojina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	$EC_{50}^a \pm SN^b$ (mM)
						
α -tokoferol	/	/	/	/	/	0.0192 ± 0.0006
						
7	H	H	NH ₂	COOCH ₃	O	0.611 ± 0.026
10	H	H	NH ₂	CN	O	0.671 ± 0.083
11	H	CH ₃	NH ₂	CN	O	0.559 ± 0.029
12	NO ₂	H	H	H	O	0.103 ± 0.003
13	NO ₂	H	H	H	S	0.0496 ± 0.019
						
15	H	CH ₃	/	/	/	0.181 ± 0.008
16	NO ₂	CH ₃	/	/	/	0.291 ± 0.042
17	NO ₂	H	/	/	/	0.713 ± 0.027

<u>23</u>	OCOCH ₃	CH ₃	/	/	/	0.239 ± 0.009
<u>24</u>	OH	CH ₃	/	/	/	0.0399 ± 0.007

^a srednja efektivna koncentracija

^b standardna napaka

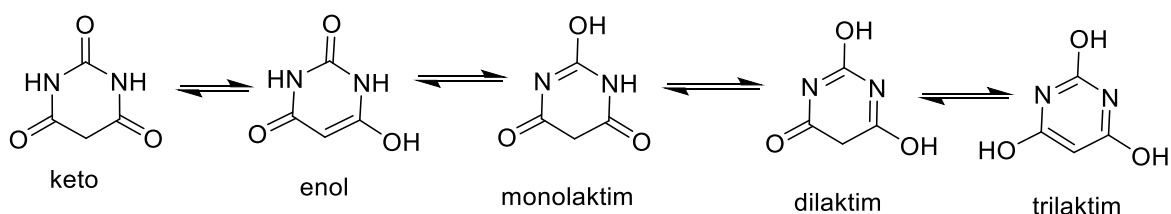
5.2. Komentar rezultatov antioksidativnega vrednotenja

S pomočjo DPPH-testa smo pripravljenim spojinam določili antioksidativno delovanje, kot standard pa smo uporabili α -tokoferol. V literaturi najdemo različne podatke o vrednosti EC_{50} za α -tokoferol, ki se gibljejo med 0.011 mM in 0.025 mM (20,21). α -Tokoferol je eden od boljših antioksidantov in lahko reagira z dvema molekulama DPPH. Tokoferilni radikal, ki nastane pri reakciji, je resonančno stabiliziran zaradi možne delokalizacije nesparjenega elektrona po strukturi molekule (1).

Standard smo pripravili po enakem postopku kot naše spojine. Z vrednotenjem aktivnosti standarda smo zagotovili ustreznost testne metode, saj je vrednost EC_{50} za α -tokoferol znašala 0.019 mM, kar je v skladu z vrednostmi iz literature (20, 21).

Večina naših spojin je izkazovala šibkejše antioksidativno delovanje od standarda. Najbolj se mu je približala spojina **24**, katere vrednost EC_{50} je znašala 0.0399 mM. Če primerjamo obe skupini spojin, ki smo jih sintetizirali, lahko opazimo, da imajo v splošnem 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trioni (**15**, **16**, **17**, **23**, **24**) boljše antioksidativno delovanje od 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov (**7**, **10**, **11**, **12**, **13**).

Pomembna lastnost derivatov barbiturne kisline je možnost obstoja v različnih tautomernih oblikah. Pri barbiturni kislini lahko namreč pride do laktam-laktim tautomerije, kjer hkrati potečeta premestitev dvojne vezi in prenos vodikovega atoma (Slika 23). Ker barbiturna kislina vsebuje tri karbonilne skupine (keto oblika, Slika 23), lahko teoretično pride do nastanka treh laktimskih skupin (trilaktimska oblika, Slika 23) (16). Aromatske –OH skupine v trilaktimski obliki lahko delujejo kot donorji H-atomov. Pri tem pride do prenosa vodika iz hidroksilnih skupin na radikal, ki se na ta način stabilizira. Da se prepreči nadaljnja oksidacija, se mora antioksidant pri tem pretvoriti v stabilen radikal. Pogoji, da je nastali radikal stabilen, je možnost resonančne stabilizacije nesparjenega elektrona po strukturi molekule, ki pa jo naše sintetizirane spojine imajo.



Slika 23: Možne tautomerne oblike barbiturne kisline.

V skupini 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov je najboljše antioksidativno delovanje izkazala spojina **13** ($EC_{50} = 0.0496$ mM). Za razliko od vseh ostalih spojin ima ta spojina na drugem mestu namesto kisika vezano žveplo. Možen razlog za dobro antioksidativno delovanje te spojine je, da je pri njej prišlo do tautomerizacije do tiolaktimske oblike, pri čemer je nastala –SH skupina, za katero je značilno, da je dober donor H-atoma. Če primerjamo aktivnosti spojin **7** ($EC_{50} = 0.611$ mM) s $COOCH_3$ in **10** ($EC_{50} = 0.671$ mM) s CN skupino na mestu R_4 , opazimo, da imata podobno antioksidativno delovanje. Zaključimo lahko, da ti dve skupini ne vplivata bistveno na antioksidativne lastnosti spojin. Spojina **11** ($EC_{50} = 0.559$ mM) se od spojine **10** ($EC_{50} = 0.671$ mM) loči po tem, da vsebuje na obročnih dušikih namesto vodikov vezane metilne skupine. Rezultat antioksidativnega vrednotenja teh dveh spojin ni bil pričakovan, saj ob prisotnosti metilnih skupin ne more priti do laktam-laktim tautomerije, zaradi česar bi sklepali, da bo spojina **10** bolj aktivna. Spojini **12** ($EC_{50} = 0.103$ mM) in **13** ($EC_{50} = 0.0496$ mM) imata na *para*-mestu na fenilnem obroču vezano nitro skupino. Ti dve spojini sta glede na ostale spojine izkazali precej dobro antioksidativno delovanje. Njuno dobro aktivnost si lahko razložimo z močno izraženim elektron-privlačnim značajem nitro skupine, ki lahko vpliva na večjo kislost obročnih NH skupin (ali OH skupin v primeru laktimske tautomerne oblike), ki na ta način postanejo boljši donorji H-atomov. Izmed spojin **12** in **13** je imela boljše delovanje spojina **13**, ki ima na mestu 2 namesto kisika vezano žveplo.

V skupini 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov je imela najboljše antioksidativno delovanje spojina **24** ($EC_{50} = 0.0399$ mM), ki ima na fenilnem obroču na *para*-mestu vezano hidroksilno skupino, ki lahko deluje kot donor H-atoma. Spojina **15** ($EC_{50} = 0.181$ mM) brez substituentov na fenilnem obroču je izkazovala boljše delovanje od spojine **16** ($EC_{50} = 0.291$ mM) z nitro skupino na *para*-mestu fenilnega obroča. Ker tako spojina **15**, kot spojina **16** vsebujeta metilni skupini na obročnih dušikih, v tem primeru nitro skupina ne more vplivati na kislost NH skupin. Presenetljivo, je najšibkejšo delovanje znotraj serije 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov izkazovala spojina **17** ($EC_{50} = 0.713$ mM) z nesubstituiranima obročnima dušikoma in z nitro skupino na *para*-mestu fenilnega obroča. Najverjetneje je razlog, da prisotnost nitro skupine v tem primeru ne poveča antioksidativnega delovanja v tem, da se njen elektron-privlačni značaj iz fenilnega obroča preko karbonilne skupine ne prenese na obroč barbiturne kisline. S primerjavo spojin **15** ($EC_{50} = 0.181$ mM) in **24** ($EC_{50} = 0.0399$ mM) lahko ugotovimo, da igra ključno vlogo pri antioksidativnem delovanju dodatna hidroksilna skupina na fenilnem obroču. Fenolna

hidroksilna skupina je dober donor vodika, kar je značilnost vseh fenolnih antioksidantov, kamor spada tudi α -tokoferol.

6. SKLEP

Radikali so reaktivne spojine, ki so zelo pogoste tako v našem okolju kot tudi znotraj našega telesa. Radikalom najbolj izpostavljen organ je koža, ki se mora boriti proti radikalom endogenega in eksogenega izvora. Snovi, ki reagirajo z radikali in jih pretvorijo v stabilne spojine, imenujemo antioksidanti. V telesu so antioksidanti organizirani v t.i. antioksidativno mrežo, tako da delujejo sinergistično in drug drugega obnavljajo. Nahajajo se tako v lipidnem dvosloju celic kot v citosolu in zunajcelični tekočini. Radikali in antioksidanti so v telesu v ravnovesju, ki lahko ob porušenju privede do oksidativnega stresa. Antioksidanti so, zaradi izpostavljenosti kože eksogenim dejavnikom kot sta UV-sevanje in onesnaženje, ena od najpomembnejših aktivnih kozmetičnih sestavin.

V okviru diplomske naloge smo uspešno sintetizirali deset potencialnih antioksidantov na osnovi barbiturne kisline in ovrednotili njihovo antioksidativno delovanje s pomočjo DPPH-testa ter izračunom vrednosti EC_{50} . Pripravili smo dve seriji spojin, serijo 5-benzoilpirimidin-2,4,6-trionov (**15**, **16**, **17**, **23**, **24**) in serijo 1,5-dihidro-pirano[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionov (**7**, **10**, **11**, **12**, **13**). Najboljše antioksidativno delovanje je izkazala spojina **24** ($EC_{50} = 0.0399$ mM), ki ima na fenilnem obroču pripeto hidroksilno skupino, ki lahko deluje kot donor H-atoma. Zelo dobri aktivnosti sta imeli tudi spojini **12** ($EC_{50} = 0.103$ mM) in **13** ($EC_{50} = 0.0496$ mM) z nitro skupinama, vezanima na *para*-mesto na fenilnem obroču. Njuno dobro aktivnost si lahko razložimo z močno izraženim elektron-privlačnim značajem nitro skupine, ki vpliva na večjo reaktivnost obročnih NH ali OH skupin.

Za najbolj aktivni spojini, **13** in **24**, bi bilo zanimivo izvesti še dodatna *in vitro* testiranja s katerimi bi preučili mehanizem njunega delovanja.

7. LITERATURA

1. Mravljak J. in Pečar S.: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 12-42, 119-135
2. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H.: Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*. 32 (11); 2002: 1102-1115
3. Von Sonntag C.: Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006: 48-51
4. Poljšak B., Dahmane R., 2012. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and practice*, [internet]. Dostopno na: <https://www.hindawi.com/journals/drp/2012/135206/abs/> [junij 2017]
5. Fisher J. G., Xu Y.: Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *Journal of Dermatological Science Supplement*. 1(2); 2005: S1-S8
6. Pillai S., Oresajo C., Hayward J.: Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *International Journal of Cosmetic Science*. 27; 2005: 17-34
7. Carocho M., Ferreira C.F.R. I.: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51; 2013:15-25
8. Kohen R.: Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother*, 53(4); 1999: 181-192
9. McMullen L. R.: Antioxidants and the skin. *Allured Business Media*, 2013:185-206, 227-296
10. Atta-ur-Rahman.: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, 2013: 485.491
11. Kočevar Glavač N., Janeš D.: Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora. Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 245-290
12. Alam M.N., Bristi J. N., Rafiquzzaman M.: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21; 2013: 143-152
13. Kedare B. S., Singh P. R.: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48(4); 2011: 412-422

14. Habibi A., Tarameshloo: A New and Convenient Method for Synthesis of Barbituric Acid Derivates. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 8(1); 2011: 287-291
15. Sokmen B.B., Urgas S., Sarikaya H.Y., Urgas H.I., Yanardag R.:Antibacterial, antiurease, and antioxidant activities of some arylidene barbiturates. *Applied biochemistry and biotechnology*. 171(8); 2013: 2030-2039
16. Mahmudov T.K., Kopylovich N. M., Maharramov M. A., Kurbanova M. M., Gurbanov V. A., Pombeiro J.L.A.:Barbituric acids as useful tool for the construction of coordination and supramolecular compounds. *Coordination Chemistry Reviews*. 265; 2014:1-37
17. Costa B.A.: Arthur Michael (1853-1942). The meeting of thermodynamics and organic chemistry. *J. Chem. Educ.*48(4); 1971: 243-246
18. Zidar N., Kikelj D.: Convergent domino Knoevenagel hetero-Diels-Alder and domino oxidation reactions revealed in an unexpected synthesis of 5-Aryl-1H-pyrano[2,3-d]pyrimidine-2,4(3H,5H)-diones and 5-Aryl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-pyrano[2,3-d]pyrimidin-4(5H)-ones. *Helvetica Chimia Acta*. 94; 2011: 859-867
19. Adams, R.: *Organic reactions*. John Wiley & Sons, New York, 1942:205-220
20. Capuzzo A., Occhipinti A., Maffei M.E.: Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. *Natural Product Research*. 28(24); 2014: 2321-2323
21. Loo A.Y., Jain K., Darah I.: Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*. 104; 2007: 300-307