

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA KASTELIC

## **DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA KASTELIC

**SINTEZA IN VREDNOTENJE DERIVATOV 3,5-DIFENIL-1,2,4-TRIAZOLA KOT MOŽNIH  
ANTIOKSIDANTOV ZA UPORABO V KOZMETIČNIH IZDELKIH**

**SYNTHESIS AND ASSESSMENT OF DERIVATES OF 3,5-DIPHENYL-1,2,4-TRIAZOL AS  
POTENTIAL ANTIOXIDANTS IN COSMETIC PRODUCTS**

**UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY**

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

## **Zahvala**

Ob zaključnem pisanju diplomske naloge se najlepše zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku za strokovno pomoč, dragocene nasvete in usmerjanje pri nastajanju diplomske naloge.

Največja zahvala pa vsekakor velja moji družini: očetu Jožetu in materi Jožici, ki sta mi finančno in moralno stala ob strani skozi ves študij, ter sestram Suzani, Darji in Lidiji za neskončno razumevanje in vso potrpežljivost. Hvala fantu Gregorju, ki je verjel vame v vseh vzponih in padcih ter me optimistično spodbujal.

Hvala prijateljem in ostalim sorodnikom, ki so kakorkoli pripomogli pri ustvarjanju diplomske naloge.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Irena Kastelic

**Predsednica komisije:** izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos, mag. farm.

**Član komisije:** asist. dr. Zoran Lavrič, mag. farm.

**Mentor:** izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

# Vsebina

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Vsebina .....                                                                   | I   |
| Kazalo slik .....                                                               | III |
| Kazalo preglednice .....                                                        | IV  |
| POVZETEK .....                                                                  | V   |
| ABSTRACT .....                                                                  | VI  |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....                                                           | VII |
| 1 UVOD.....                                                                     | 1   |
| 1.1 OKSIDATIVNI STRES IN REAKTIVNE ZVRSTI .....                                 | 1   |
| 1.1.1 REAKTIVNE KISIČNE ZVRSTI (ROS).....                                       | 2   |
| 1.1.2 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI (RNS) .....                                     | 4   |
| 1.2 URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA Z ANTIOKSIDANTI .....                      | 5   |
| 1.2.1 FENOLNI IN POLIFENOLNI ANTIOKSIDANTI .....                                | 7   |
| 1.2.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLOV <i>IN VITRO</i> .....               | 7   |
| 1.2.2.1 Polifenoli v črnem in zelenem čaju .....                                | 8   |
| 1.2.2.2 Galna kislina in galati ter inhibicija hialuronidaze in kolagenaze..... | 8   |
| 1.2.3 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLOV <i>IN VIVO</i> .....                | 9   |
| 1.2.4 TRIAZOLI .....                                                            | 9   |
| 1.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI .....                                  | 10  |
| 1.3.1 DPPH TEST IN EFEKTIVNA KONCENTRACIJA EC <sub>50</sub> .....               | 10  |
| 1.4 UV-Vis SPEKTROSKOPIJA .....                                                 | 12  |
| 2 NAMEN DELA.....                                                               | 14  |
| 3 MATERIALI IN METODE .....                                                     | 15  |
| 3.1 REAGENTI IN TOPILA .....                                                    | 15  |
| 3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI.....                                 | 15  |
| 3.3 PROGRAMSKA OPREMA .....                                                     | 16  |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4 KARAKTERIZACIJA SINTETIZIRANIH SPOJIN .....                     | 16 |
| 3.4.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC) .....                       | 16 |
| 3.4.2 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA .....                                 | 16 |
| 3.4.3 JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR) .....                        | 16 |
| 3.4.4 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS) .....                               | 17 |
| 3.4.5 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR) .....                          | 17 |
| 3.5 DOLOČANJE TALIŠČ .....                                          | 17 |
| 3.6 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....                     | 18 |
| 3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....                             | 18 |
| 4 EKSPERIMENTALNO DELO .....                                        | 20 |
| 4.1 SINTEZA SPOJIN .....                                            | 20 |
| 4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE .....                      | 32 |
| 4.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN .....                                       | 32 |
| 4.2.1.1 Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH .....            | 32 |
| 4.2.1.2 Priprava raztopine standarda in sintetiziranih spojin ..... | 32 |
| 4.2.2 DOLOČITEV VREDNOSTI EC <sub>50</sub> .....                    | 33 |
| 5 REZULTATI IN RAZPRAVA .....                                       | 34 |
| 5.1 REZULTATI MERITEV ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....             | 34 |
| 5.2. VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE KONČNIH SPOJIN .....    | 39 |
| 6 SKLEP .....                                                       | 41 |
| 7 VIRI IN LITERATURA .....                                          | 43 |
| 8 PRILOGI .....                                                     | 45 |

## Kazalo slik

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Ravnotežje med antioksidanti in reaktivnimi zvrstmi je pomaknjeno na stran slednjih .....                                     | 2  |
| Slika 2: Predstavniki ROS .....                                                                                                        | 3  |
| Slika 3: Predstavniki RNS .....                                                                                                        | 4  |
| Slika 4: Najpogostejši antioksidanti in njihova aktivnost .....                                                                        | 6  |
| Slika 5: Protirakavo, pritimikrobno in protivnetno delovanje nekaterih derivatov 1,2,4-triazola s predstavniki posameznih skupin ..... | 10 |
| Slika 6: Redukcija DPPH <sup>*</sup> z antioksidantom (H-A) in do DPPH-H in novega radikala, ki izvira iz antioksidanta.....           | 11 |
| Slika 7: Beer-Lambertov zakon.....                                                                                                     | 12 |
| Slika 8: Sintezni načrt.....                                                                                                           | 14 |
| Slika 9: Določanje tališča s Kofflerjevim mikroskopom.....                                                                             | 17 |
| Slika 10: Mikrotitrna ploščica z nanešenimi raztopinami vzorcev in DPPH.....                                                           | 33 |
| Slika 11: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij standarda etil galata.....                                     | 35 |
| Slika 12: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine <b>1</b> .....                                         | 35 |
| Slika 13: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine <b>7</b> .....                                         | 36 |
| Slika 14: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine <b>8</b> .....                                         | 36 |
| Slika 15: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine <b>9</b> .....                                         | 37 |
| Slika 16: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine <b>10</b> .....                                        | 37 |
| Slika 17: Delež nezreagiranega DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine <b>11</b> .....                                        | 38 |
| Slika 18: Prikaz vrednosti 50 % efektivne koncentracije za etil galat in spojine <b>1, 7, 8, 9, 10</b> in <b>11</b> .....              | 38 |

## Kazalo preglednice

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Odstotek nezreagiranega DPPH in rezultati meritev absorbanc pri različnih koncentracijah etil galata. .... | 34 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## POVZETEK

Številne novodobne bolezni, ki so posledica tako notranjih, kot zunanjih dejavnikov, največkrat pa skupek obeh, so povod k iskanju novih spojin, ki bi lahko pomagale odstraniti povzročeno škodo ali jo vsaj omiliti ali upočasniti. V ta namen so antioksidanti zelo obetavne spojine. Nekateri so že zelo raziskani in imajo svoja mesta v kozmetični, farmacevtski in prehrabni industriji in v izdelku preprečujejo, da bi prišlo do oksidativnih sprememb, ki bi imele za posledico neučinkovitost ali pa bi izdelek celo škodoval. Polifenolni antioksidanti so *in vitro* učinkoviti antioksidanti z zaviranjem številnih reaktivnih zvrsti, za *in vivo* uporabo pa bodo kljub posameznim obetavnim rezultatom, potrebne še mnoge raziskave. Triazoli so nepoznane spojine na področju kozmetike in topikalne aplikacije, vendar pa kažejo takšne spojine številne biološke učinke, kot so protirakavo, protivnetno in protimikrobno delovanje. V okviru diplomske naloge smo sintetizirali nekaj derivatov 1,2,4-triazola s fenolnimi skupinami in strukturo spojin ovrednotili z različnimi instrumentalnimi metodami (jedrska magnetna resonanca, masna spektrometrija, infrardeča spektroskopija...). Spojinam smo nato določili antioksidativno kapaciteto s pomočjo DPPH testa ter stopnjo antioksidativne aktivnosti okarakterizirali s standardno efektivno koncentracijo EC<sub>50</sub>. Zanimalo nas je, ali izvira antioksidativno delovanje iz fenolnih skupin ali triazolnega obroča. Kot standardni antioksidant smo uporabili etil galat, s katerimi smo dokazali ustreznost metode DPPH. Ugotovili smo, da spojine, katerim smo uvedli na aminotriazolni obroč fenolne -OH skupine, izkazujejo antioksidativno delovanje, vendar pa ena fenolna -OH skupina za delovanje ni bila dovolj. Spojina brez fenolne skupine pa tudi ni izkazovala antioksidativnega delovanja, le to pa smo uporabili kot negativno kontrolo za potrditev namena naše naloge. Ugotovili smo torej, da sam triazolski obroč ne izkazuje antioksidativnega delovanja, ampak antioksidativni učinki sintetiziranih spojin izvirajo iz fenolnih skupin.

**Ključne besede:** antioksidanti, polifenoli, derivati 1,2,4-triazola, DPPH metoda, antioksidativna kapaciteta



## ABSTRACT

The fight against modern diseases, caused by both internal and external factors, has turned into a race towards the discovery of new drugs, which would be able to cure or at least slow down their progression. As such, antioxidants are becoming ever more interesting. Some of them are already well characterised and used in cosmetics, pharmaceutical and food industry as agents for preservation of physicochemical properties of a product, in order to prevent inefficiency or even hazards of their usage. Polyphenol antioxidants are successfully preventing *in vitro* formulation of many reactive species through a donation of a hydrogen atom. They have also been shown promising *in vivo*, however, there is still a lack of research in this field. Although they are quite unknown in the field of cosmetics and topical application, triazoles have been proved numerous biological activities, such as anti-cancerous, anti-inflammatory and antimicrobial. The aim of this B. Sc. Thesis was to synthesize derivatives of the 1,2,4-triazole with phenol groups and to assess their structure using different instrumental methods (nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, infrared spectroscopy...). The antioxidant activity of the derivatives was determined using DPPH test and characterised as standard effective concentration  $EC_{50}$ . We were interested in whether the source of anti-oxidative activity from phenolic groups or triazole rings was used as ethyl gallate as the standard antioxidant to demonstrate the suitability of the DPPH method. We found that the compounds that were introduced to the aminotriazole ring of phenolic -OH groups exhibited anti-oxidative activity, but one phenolic -OH performance group was not sufficient. The compound without phenolic group did not show antioxidant activity, but we used it as a negative control to confirm the purpose of our task. It can be concluded that the triazole ring itself does not exhibit anti-oxidative activity, but the anti-oxidative effects of the synthesized compounds originate from phenolic groups.

**Key words:** antioxidant, polyphenols, 1,2,4-triazole derivates, DPPH assay, antioxidant capacity

## SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS - 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazol-6-sulfonska kislina]-diamonijeva sol

CUPRAC - z bakrom reducirajoča antioksidativna aktivnost

DNA - deoksiribonukleinska kislina

DPPH - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

DPPH-H - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin

EGCG - epigalokatehin galat

EC<sub>50</sub> - 50% efektivna koncentracija

FRAP - zmožnost plazme za zmanjšanje železa

IL-1 - interlevkin 1

LDL - lipoprotein z nizko gostoto

NADPH - dihidronikotinamid-adenin dinukleotid fosfat

ORAC - kisikova radikalna sposobnost absorpcije

ROS - reaktivne kisikove zvrsti

RNS - reaktivne dušikove zvrsti

SN – standardna napaka

TNF- $\alpha$  - tumor nekrozirajoči faktor alfa

UV - ultravijolično

VIS - vidno

# 1 UVOD

## 1.1 OKSIDATIVNI STRES IN REAKTIVNE ZVRSTI

Oksidativni stres je vzrok prekomerne tvorbe radikalov in ostalih reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin ali nezadostnega obrambnega antioksidativnega sistema, kar lahko vodi do neželenih poškodb bioloških molekul (1). Gre za stanje v celici ali v tkivu, kjer začnejo prevladovati nenadzorovani oksidativni procesi lipidov, proteinov, DNA v jedru in mitohondrijih ter drugih sestavin in posledično do porušitve z antioksidanti nadzorovanega ravnotežja med oksidacijami in redukcijami. Pojavi se brez predhodnega opozorila in je v začetnem obdobju na makroskopski ravni nezaznaven, posledice pa so lahko vidne v nekaj dneh ali šele čez nekaj let, odvisno od mesta, kjer poteka oksidativni stres in njegovega obsega (2). Oksidativni stres je odgovoren za prezgodnje staranje ter bolezni, kot so ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, sladkorna bolezen, nekatere vrste raka in druge (3).

Vzroki za oksidativni stres so naslednji:

- Pojav prekomerne količine reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) ali reaktivnih dušikovih zvrsti (RNS) in sprožitev nenadzorovanih oksidacij v primeru okoljskih dejavnikov, kot so ionizirajoče sevanje, ultravijolično sevanje, kajenje, onesnaženo okolje. Primer je poškodba encima katalaze, ki skrbi za stalno odstranjevanje vodikovega peroksida. Zmanjšano odstranjevanje vodi do oksidacije sestavin celic, kar lahko vidimo in občutimo kot sončne opekline;
- Nezadostna energetska preskrba celice je posledica zmanjšanega nastajanja NAD(P)H npr. zaradi staranja celice.
- Daljša odsotnost posameznih predstavnikov antioksidativne mreže oslabi sposobnost obnavljanja mreže, kar vodi v presežek ROS in RNS (2);
- Vnetje, transport kisika s hemoglobinom, metabolizem, puščanje elektronov iz dihalne verige v mitohondrijih;
- Zmanjšan vnos, neustrezna biološka uporabnost ali nezadostna endogena sinteza antioksidantov (4).

Zadnje čase se v literaturi omenja tudi pozitivni oksidativni stres, ki omogoča prilagajanje celici na telesne stresorje iz okolja in telesa in na ta način ščiti pred posledicami škodljivega

oksidativnega stresa in poveča odpornost celici v primeru bolezni ali ob večjih koncentracijah sproži apoptozo celice. Nekatere reaktivne zvrsti so pomembne signalne molekule (npr.  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) za razmnoževanje celic, apoptozo, izražanje genov preko aktivacije prepisovalnih dejavnikov. Lahko so signalni posredniki za nekatere citokine ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$ ). Sodelujejo v obrambi imunskega sistema pred bakterijami, glivicami in virusi z aktivacijo fagocitov, ki tvorijo superoksidni radikal, vodikov peroksid in hipoklorno kislino (2,4).

V fizioloških razmerah je ravnovesje med antioksidanti in reaktivnimi zvrstmi ves čas nagnjeno rahlo na stran oksidativnih poškodb (Slika 1). To v celici povzroča stalno prisotnost določene količine oksidiranih biomolekul, po drugi strani pa rahlo povišan nastanek reaktivnih zvrsti poveča učinkovitost obrambnih in popravilnih mehanizmov, saj se zviša raven izražanja encimov antioksidantov za popravilo DNA (4).



Slika 1: Ravnotežje med antioksidanti in reaktivnimi zvrstmi je pomaknjeno na stran slednjih

### 1.1.1 REAKTIVNE KISI KOVE ZVRSTI (ROS)

Kisik je potreben za življenje in prehaja v telo z dihanjem, pri tem pa nastajajo mnoge reaktivne kisikove zvrsti, ki lahko sprožijo oksidacijo katerekoli organske molekule v organizmu. Razdelimo jih na radikalske in ne-radikalske zvrsti (Slika 2). Večina jih je med seboj povezana preko kemičnih reakcij (2,4). V bioloških sistemih so glavni predstavniki superoksidni anion, vodikov peroksid in hidroksilni radikal. Povzročajo jih tako endogeni (mitohondriji, peroksisomi, makrofagi, eozinofilci, citokrom P450...), kot eksogeni (ksenobiotiki, kovinski ioni, ionizirajoče sevanje...) dejavniki (1).

| RADIKALI                  |                   | NERADIKALI           |                    |
|---------------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
| • Superoksidni radikal    | $O_2^{\bullet -}$ | • Singletni kisik    | $^1O_2$            |
| • Hidroksilni radikal     | $HO^{\bullet}$    | • Ozon               | $O_3$              |
| • Hidroperoksidni radikal | $HOO^{\bullet}$   | • Vodikov peroksid   | $H_2O_2$           |
| • Peroksidni radikal      | $ROO^{\bullet}$   | • Hidroperoksidi     | $ROOH$             |
| • Alkoksilni radikal      | $RO^{\bullet}$    | • Hipoklorna kislina | $HOCl$             |
|                           |                   | • Peroksinitrit      | $ONOO^{\bullet -}$ |

Slika 2: Predstavniki ROS

Tripletni kisik ( $^3O_2$ ) ima na zunanji orbitali dva nespargena elektrona z enako usmerjenim spinom in zato kot diradikal zlahka reagira z drugimi radikali, npr. C-radikalom, pri čemer pride do sprožitve lipidne peroksidacije in nastanka peroksidnega radikala ( $ROO^{\bullet}$ ). Prav tako je tripletni kisik dober akceptor elektrona, pri čemer nastaja superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet -}$ ) (2). Glavni vir superoksidnega radikala so mitohondriji, kjer določeno število elektronov uide iz verige, le ti pa tvorijo s kisikom omenjeni radikal (1). Superoksidni radikal encimi superoksid dizmutaze (SOD) hitro odstranijo in pretvorijo v vodikov peroksid in kisik. Superoksidni radikal lahko reagira s protonom iz vodne okolice in nastane hidroperoksidni radikal ( $HOO^{\bullet}$ ), ki pa prehaja lipofilne celične membrane in odvzame vodikov atom v membranah in sproži oksidacijo lipidov. Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) ni radikal in je bolj stabilen. Nastaja kot posledica odstranjevanja superoksidnega aniona s superoksid dizmutazo. Sposoben je zavreti določene encime, ob prisotnosti železa ali bakra pa se reducira do hidroksilnega radikala ( $HO^{\bullet}$ ), ki je najreaktivnejši radikal v našem telesu, ki reagira na mestu, kjer se pojavi. Nastaja tudi pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka in ozona. Hidroksilni radikal pritegne vodikov atom maščobne kisline, zato je sprožilec peroksidacije fosfolipidov in nenasičenih maščobnih kislin. Vodikov peroksid odstranjujejo katalaze in peroksidaze, tako da ga pretvarjajo v vodo in tripletni kisik. Odstranjevanje je možno tudi z neposredno oksidacijo glutationa. Povečano nastajanje vodikovega peroksida pri močnem izpostavljanju UV žarkom vodi do mutacije DNA in v tem primeru katalaze in peroksidaze niso dovolj učinkovite. Iz tripletnega kisika s pomočjo UVC žarkov nastaja tudi ozon ( $O_3$ ). Je močan oksidant in v organizmu lahko sproži nastanek radikalov preko reakcij s poli-nasičenimi maščobnimi kislinami ali avtooksidacije lipidov. V procesu oksidacije

organskih snovi z ozonom nastajajo radikali ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HOO}^\bullet$ ) in vodikov peroksid. Hidroperoksidi ( $\text{ROOH}$ ) so za razliko od radikalov bolj stabilni, vendar se v prisotnosti bakrovih in železovih ionov zlahka reducirajo do alkoksilnih ( $\text{RO}^\bullet$ ) in/ali hidroperoksilnih radikalov. Prisotnost hidroperoksidov v krvi povzroči poškodbe tkiva, nastali alkoksilni in hidroperoksilni radikali pa napadajo lipoproteine ali endotelijske celice. Peroksilni radikali nastajajo v procesu lipidne peroksidacije, kjer najprej hidroksilni radikal odtegne vodikov atom iz alkilne verige fosfolipida, nastali C-radikal pa reagira s kisikom in nastane peroksilni radikal. Ta odvzame vodikov atom novi molekuli, nastane hidroperoksid in nov C-radikal, ki ponovno povzroča oksidacijo. Hipoklorna kislina ( $\text{HOCl}$ ) je oksidant, ki nastaja v procesu odstranjevanja mikrobov z nevtrofilci in povzroči oksidacijo mikrobov ali nastanek drugih močnih oksidantov ter radikalov. Sodeluje v reakciji z vodikovim peroksidom, pri čemer nastane singletni kisik. V reakciji s superoksidnim radikalom oziroma z železom povzroči nastanek hidroksilnega radikala. Singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) ima v osnovnem stanju elektronski par z nasprotno usmerjenima spinoma in je zelo reaktivna molekula, saj na preostalo prosto orbitalo zlahka sprejme nov elektron ali elektronski par. Oksidacija steče takoj in tam, kjer se pojavi, oksidira bližnje molekule. Nastaja fotokemično v prisotnosti fotosenzibilizatorjev ali kemično iz peroksilnih radikalov (2,4).

### 1.1.2 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI (RNS)

| RADIKALI          |                       | NERADIKALI              |                                                 |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| • Dušikov oksid   | $\text{NO}^\bullet$   | • Dušikovi oksidi       | $\text{N}_2\text{O}_3$ , $\text{N}_2\text{O}_4$ |
| • Dušikov dioksid | $\text{NO}_2^\bullet$ | • Dušikova(III) kislina | $\text{HNO}_2$                                  |
|                   |                       | • Nitrozilni kation     | $\text{NO}^+$                                   |
|                   |                       | • Nitronijev kation     | $\text{NO}_2^+$                                 |
|                   |                       | • Alkilperoksinitrit    | $\text{ROONO}$                                  |
|                   |                       | • Peroksinitrit         | $\text{ONOO}^\bullet$                           |

Slika 3: Predstavniki RNS

Tudi RNS vključujejo radikalske in neradikalske predstavnike (Slika 3). Dušikov oksid ( $\text{NO}^\bullet$ ) ima en nesparjen elektron in je zato radikal, ki teži po stanju s parnim številom

elektronov, pri tem pa se bodisi oksidira ali reducira, vendar je to manj pogosto. Nastaja v celicah iz L-arginina v reakciji z družino encimov sintaz dušikovega oksida. Deluje citotoksično in sodeluje pri vnetju, pri regulacijah in v centralnem in perifernem živčevju. Kot radikal se lahko vmeša v proces lipidne peroksidacije, kjer reagira z lipidnim radikalom in prekine verižno reakcijo. Z enoelektronsko oksidacijo dušikovega oksida nastane nitrozilni kation ( $\text{NO}^+$ ), ki je elektrofil in nitrozira nekatere amine in tiole v celici. Le ta nastaja tudi iz didušikovega tetraoksida ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ). Pogostejše so reakcije dušikovega oksida s tripletnim kisikom in superoksidnim radikalom. Dušikov oksid se v prisotnosti tripletnega kisika pretvarja v dušikov dioksid ( $\text{NO}_2^\bullet$ ). Je močnejši oksidant, kot sta dušikov oksid in kisik iz katerih nastaja. Povzroča lipidno peroksidacijo s pritegnitvijo vodikovega atoma iz spojine, se adira na dvojne vezi nenasičenih lipidov, reagira s tirozilnim radikalom proteinov, C-radikalom lipida in radikalom na DNA. Ko dušikov oksid reagira s superoksidnim radikalom, nastaja peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) in s tem najmočnejši oksidant v skupini RNS. Nastaja hitreje, kot pa poteka odstranitev superoksidnega radikala s SOD. Vendar pa je takšna reakcija omejena zaradi prostorske ločitve obeh radikalov. Najpogostejša je reakcija  $\text{ONOO}^-$  kot nukleofila z ogljikovim dioksidom, ki pomeni najmanj škodljivo pot za organizem in njegovo odstranjevanje. Didušikov trioksid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) nastaja med dušikovim oksidom in dušikovim dioksidom, ki pa je nestabilen in se pretvarja v nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ). Je tudi elektrofil iz katerega, poleg didušikovega tetraoksida nastaja nevaren nitrozilni kation (2).

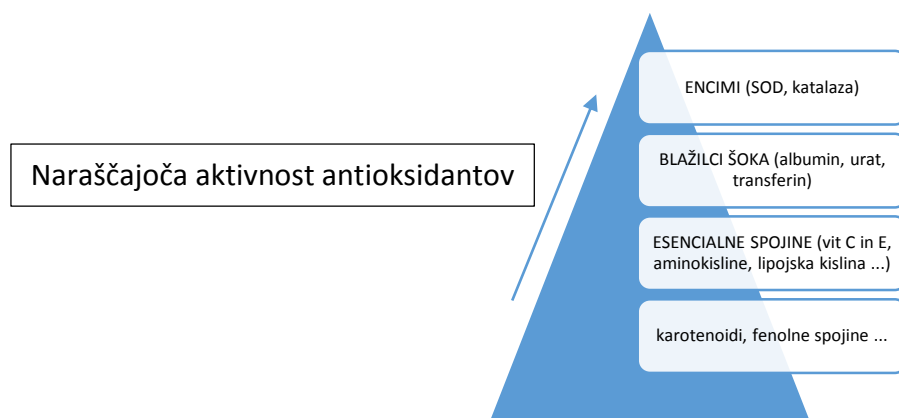
## 1.2 URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA Z ANTIOKSIDANTI

Aerobni organizmi so neprenehoma izpostavljeni oksidativnemu stresu, vendar je v organizmu neškodljiva koncentracija reaktivnih zvrsti uravnana z antioksidanti (1). To so snovi, za katere je zmotno prepričanje, da so čudežne sestavine, ki naj bi pozdravile različne bolezni, preprečile staranje organizma in delovale vedno koristno. Antioksidanti so lahko v določenih situacijah celo škodljivi (2).

V antioksidativni sistem sodijo molekule ali spojine, ki so sposobne nevtralizirati reaktivne zvrsti ter preprečiti njihov nastanek in jih odstraniti. Lastnost teh snovi je, da imajo v svoji strukturi vsaj en vodik, ki zlahka reagira z radikalom, pri čemer nastane nov, manj škodljiv radikal. Takšnim antioksidantom pravimo reducenti. Med antioksidante uvrščamo tudi kelatorje, ki vežejo ione bakra ali železa in preprečijo katalizo radikalskih reakcij (2,3).

Najbolj učinkoviti antioksidanti so endogeni oz. encimi superoksid dismutaze, katalaze in peroksidaze, sledijo antioksidanti, ki so na voljo v krvi in drugih tkivih v visokih koncentracijah, albumin, transferin in urat, nato esencialni antioksidanti vitamina C in E, aminokisline, peptidi, lipojska kislina... Najštevilčnejšo skupino pa predstavljajo spojine naravnega izvora kot so karotenoidi in polifenoli (Slika 4) (2).

Učinek je določen z vrsto antioksidanta, mehanizmom delovanja, sodelovanja z ostalimi antioksidanti in v primeru zunanjih-endogenih antioksidantov tudi z absorpcijo, odmerkom, pogostostjo vnosa, presnovo in izločanjem. Prav tako, mora biti reakcija med antioksidantom in radikalom hitrejša, kot reakcija radikala s celično sestavino, ter antioksidant mora biti prisoten povsod ob pravem času. Najbolj uspešna v boju proti reaktivnim zvrstem je mreža antioksidantov, ki omogoča, da že relativno nizke koncentracije posameznih antioksidantov delujejo učinkovito. V takšni mreži se antioksidanti ves čas obnavljajo (2).



Slika 4: Najpogostejši antioksidanti in njihova aktivnost



### 1.2.1 FENOLNI IN POLIFENOLNI ANTIOKSIDANTI

Fenoli in polifenoli predstavljajo najštevilčnejšo skupino antioksidantov, za katere velja, da niso nujno potrebni za učinkovito antioksidativno obrambo, vendar prispevajo svoj delež. Gre za sekundarne metabolite rastlin, ki jim dajejo barvo, jih varujejo pred mikrobi in poškodbami zaradi UV sevanja. Do danes je znanih več kot 10.000 takšnih spojin, nekatere pa naj bi imele pozitivne učinke pri omejevanju oksidativnih procesov in s tem številnih kardiovaskularnih, degenerativnih in rakavih boleznih. Prav tako določene aktivne spojine modulirajo aktivnost številnih encimov in celičnih receptorjev.

Fenol je vsaka spojina, ki ima hidroksilno skupino na benzenovem obroču. Monofenoli imajo eno, difenoli dve, polifenoli pa tri ali več aromatskih hidroksilnih skupin. Polifenole lahko razdelimo glede na število fenolnih obročev, ki jih vsebujejo in glede na strukturne elemente, ki jih povezujejo. Ločimo polifenolne kisline, flavonoide, stilbene in lignane (2,5).

### 1.2.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLOV *IN VITRO*

Nekateri polifenoli so *in vitro* odlični antioksidanti, saj so sposobni *in vitro* reakcije s hidroksilnim radikalom, dušikovim dioksidom, hipoklorno kislino in ostalimi reaktivnimi zvrstmi, pri čemer je najpomembnejša njihova reakcija s peroksilnim radikalom, kjer fenolna skupina ponudi vodikov atom peroksilnemu radikalju v primeru lipidne peroksidacije in jo tako zavre. Nastane ariloksilni radikal, ki je stabilen in ni dovolj reaktiven za nadaljevanje oksidacije. Fenoksilni radikali so sposobni še ene reakcije s peroksilnim radikalom, ki se veže na *para* ali *orto* mesto in nastane peroksicikloheksadienon. Vsaka molekula antioksidanta s fenolno skupino lahko odstrani dva peroksilna radikala. (2)

Flavonoidi vsebujejo dva aromatska (A in B) ter oksidiran heterociklični obroč C. Glede na razlike v heterocikličnem obroču C, jih delimo na flavone, flavanole, izoflavone, antociane, flavanole in flavanone. (5). V primeru flavonov in flavanonov je boljše reakcija s peroksilnim radikalom z naraščajočim številom hidroksilnih skupin. Aktivnost polifenolov je odvisna tudi od prisotnosti metilnih skupin in glikozilacije hidroksilnih skupin, kar pogosto zmanjša ali izniči učinek (2,5).

#### 1.2.2.1 Polifenoli v črnem in zelenem čaju

Študije kažejo, da črni in zeleni čaj izkazujeta potencialne protirakave učinke na številnih organih živalskih modelov. Številni polifenoli, predvsem epigalokatehin galat (EGCG), so se izkazali za izjemno učinkovite. Antioksidativni učinek katehinov je povezan z njihovo strukturo oz. substitucijo dveh ali treh -OH skupin na benzenovem obroču B in obroču D (galat). Takšna polifenolna struktura omogoča delokalizacijo nesparjenega elektrona po celotni molekuli in reakcijo z radikalskimi vrstami, pri čemer je EGCG najbolj učinkovit. Ugotovili so, da polifenoli v čaju delujejo kot antioksidanti z donacijo vodikovega atoma ali elektrona radikalom, kot so  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$  in peroksinitritu in tako izničijo njihovo delovanje. Polifenoli v čaju so tudi učinkoviti kelatorji kovinskih ionov ter inducirajo številne encime, kot so glutathion-s-transferaze, glutathion peroksidaze, katalaze in superoksid dismutaze. Predvsem epigalokatehin galat zmanjšuje oksidativni stres z obsegom lipidne peroksidacije, oksidacije LDL, citokinov, C-reaktivnega proteina in DNA poškodb (6).

#### 1.2.2.2 Galna kislina in galati ter inhibicija hialuronidaze in kolagenaze

Galna kislina (3,4,5-trihidroksibenzojska kislina), ki je komponenta polifenolnih taninov v številnih rastlinah ter estri galne kisline in *n*-alkohola izkazujejo številne farmakološke učinke (7). Največ zanimanja so takšne spojine požele z antioksidativnim delovanjem proti ROS in z njimi povzročenimi poškodbami DNA, lipidov in proteinov. V študiji so ugotovili, da vsi alkil galati izkazujejo pomembne antioksidativne učinke v primerjavi s standardnim antioksidantom kvercetinom, njihove vrednosti  $\text{EC}_{50}$  pa so znašale 17 – 31  $\mu\text{M}$ , pri čemer se je kot najboljši antioksidant izkazal decil galat in najslabše oktaecil galat (8).

Hialuronidaze so mukopolisaharidi, ki so sposobni hidrolizirati glikozaminoglikane, vključno s hialuronsko kislino, ki je pomembna sestavina zunajceličnega matriksa. Kadar se poveča aktivnost hialuronidaz, se vlažnost in napetost kože močno zmanjšata. Kolagenaze (matriksne-metaloproteinaze) pa so odgovorne za zmanjšanje kolagena v koži, zato se tako inhibitorji hialuronidaz kot kolagenaz dandanes intenzivno uporabljajo na področju izdelkov, ki ublažijo staranje kože. Metil, propil, butil in dodecil galati se niso izkazali kot inhibitorji hialuronidaz, v nasprotju s heksil, heptil, oktil, nonil in decil galati, ki bi lahko bili potencialni inhibitorji hialuronidaz, pri čemer je najboljše učinke izkazala spojina oktil galat. Prav tako so ugotovili, da galati s kratko alkilno verigo ( $\text{C}_1$  –  $\text{C}_4$ ) ne inhibirajo

kolagenaz. Galati z daljšo alkilno verigo ( $C_6 - C_{10}$ ) pa imajo poleg galne kisline močno sposobnost inhibicije kolagenaz, kjer je prisotnost karboksilne skupine na galni kislini nujna za inhibicijo. Tako so sklenili, da bi lahko bili zaviralni učinki odvisni od dolžine hidrofozne alkilne verige (7).

### 1.2.3 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLOV *IN VIVO*

V študijah so ugotovili, da vsakodnevno pitje več kot štirih skodelic čaja deluje preventivno protirakavo. Medtem ko so nekatere študije potrdile povezavo med polifenoli in kardioprotektivnim delovanjem, pa so jo druge ovrgle (6,9).

Ugotovili so tudi, da imajo derivati polifenolov zaradi metiliranih in konjugiranih fenolnih skupin v krvni plazmi slabši antioksidativni učinek. So pa v prebavnem traktu ugotovili višjo koncentracijo polifenolov in s tem lokalni antioksidativni učinek. Prav tako nekateri flavonoidi lahko reducirajo  $\alpha$ -tokoferilni radikal in s tem izkazujejo posredni učinek. Slabost polifenolov je njihovo hitro izločanje iz organizma, saj jih telo obravnava kot ksenobiotike, zato se po vnosu obsežno metabolizirajo. Prav tako so ugotovili, da flavonoidi (kvercetin in miricetin) posredno vplivajo na zvišanje endogenih antioksidativnih encimov – NAD(P)H kinon oksidoreduktaze, glutathion S-transferaze in glukuronizil transferaze, glutathion peroksidaze, glutathion reduktaze, dismutaze in katalaze (2, 10).

### 1.2.4 TRIAZOLI

Znano je, da obilno nastajanje reaktivnih zvrsti povzroča oksidativni stres, kar vodi v številna bolezenska stanja. V zadnjem desetletju so odkrili tako naravne kot sintetične spojine, ki bi lahko izkazovale antioksidativne lastnosti in zmanjšale obseg oksidativnega stresa. Med drugim so pozornost pritegnile tudi številne heterociklične spojine, analogi in derivati triazola s številnimi biološkimi in farmakološkimi učinki. Majhen in enostaven triazolski obroč ima molekulsko formulo  $C_2H_3N_3$  in je v obliki dveh izomerov (1,2,3-triazol in 1,2,4-triazol). Prisoten je v spojinah, ki imajo protimikrobno (flukonazol, itraconazol), protirakavo (verozol, letrozol, anastrozol) in protivnetno (celekoksib, valdeksoksib, refekoksib, etoriksib) delovanje (Slika 5). Omenja pa se tudi protituberkulozno, protiepileptično, antidepressivno, protimalarijsko in protiglivično delovanje. Triazoli izkazujejo močno biološko delovanje z majhno toksičnostjo. 1,2,4-Triazolski obroč je stabilen, se ne presnavlja

in je pomemben farmakofor pri molekularnih interakcijah kot donor ali akceptor vodikove vezi, ki zaradi polarne narave poveča topnost liganda (11, 12, 13, 14).

| nesteroidni inhibitorji aromataz pri zdravljenju raka dojke                                           | protimikrobne spojine                                                                 | protivnetne spojine                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• verozol</li> <li>• letrozol</li> <li>• anastrozol</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• flukonazol</li> <li>• itrakonazol</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• celekoksib</li> <li>• valdekoksib</li> <li>• rofekoksib</li> <li>• etorikoksib</li> </ul> |

Slika 5: Protirakavo, protimikrobno in protivnetno delovanje nekaterih derivatov 1,2,4-triazola s predstavniki posameznih skupin

### 1.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Mnoge naravne snovi so v zadnjih letih predmet raziskav zaradi domnevne varnosti in terapevtskih učinkov. Mnoge epidemiološke študije so pokazale, da številne naravne spojine, vključno z vitamini, karotenoidi in polifenolnimi spojinami ter njihovo vsakodnevno uživanje, izkazujejo številne pozitivne učinke v preventivi določenih bolezni, predvsem zaradi njihovega antioksidativnega delovanja. Da bi določili antioksidativno aktivnost spojine (zmožnost spojine da zavre oksidacijo), so v ta namen razvijali številne *in vitro* metode. Najpogosteje uporabljena metoda za merjenje antioksidativne kapacitete je DPPH test, sledijo ABTS, FRAP, CUPRAC in ORAC test. Za najboljšo in zanesljivo določitev celotnega profila antioksidativne aktivnosti je dobro kombinirati in izvesti vsaj dve ali vse metode (15).

#### 1.3.1 DPPH TEST IN EFEKTIVNA KONCENTRACIJA EC<sub>50</sub>

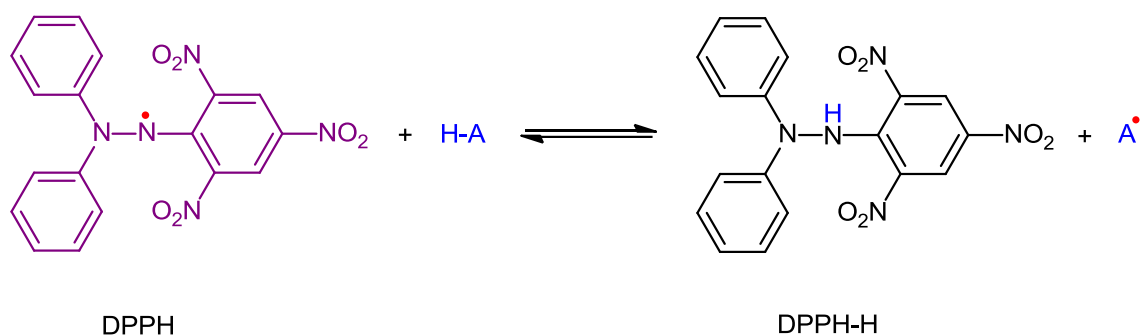
Vključno z razvojem spojin - antioksidantov so se začele razvijati tudi metode za kvantifikacijo le teh. Leta 1958 je znanstvenik Blois Marsden razvil metodo vrednotenja antioksidativne aktivnosti, ki je še danes ena izmed najpogostejših *in vitro* metod, ki temelji na reakciji stabilnega, vijolično obarvanega radikala DPPH<sup>•</sup> s ponudnikom vodikovega atoma – antioksidantom. DPPH<sup>•</sup> je stabilen, dostopen, poceni in pogosto uporabljen radikal, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 517 nm. Zmožen je delokalizacije prostega elektrona po celotni molekuli in ne dimerizira. Zmožnost delokalizacije je vzrok za intenzivnost vijolične barve, ki se ob dodatku antioksidanta obarva rahlo rumeno, pri čemer

DPPH<sup>•</sup> radikal postane stabilna, diamagnetna molekula (DPPH-H) (Slika 6). Rezultate vrednotimo spektrofotometrično, izmerjene absorbance pa so odvisne od izvajanja testa, pri čemer je potrebno upoštevati:

- Raztopina DPPH je občutljiva na nekatere Lewisove baze;
- Priprava vzorcev je potrebna pri sobni temperaturi ter inkubacija v temi;
- Prisotnost kisika lahko prispeva k napačni interpretaciji rezultatov;
- Kot medij za spojine in radikal se uporabljajo organska topila;
- pH sistema mora biti 5 – 5,6;
- Valovna dolžina, pri kateri se meritev izvaja, je v različnih virih od 515 – 520 nm.

Metoda je primerna za določanje antioksidativne aktivnosti tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (16).

Brand-Williams in Bondet sta leta 1995 in 1997 prva uporabila besedo efektivna koncentracija (EC<sub>50</sub>), ki sta jo definirala kot koncentracijo spojine antioksidanta, ki je potrebna za 50 % redukcijo radikala DPPH<sup>•</sup> oz. padec absorbance DPPH za 50%. Uporabljamo jo za interpretacijo rezultatov DPPH metode in primerjavo antioksidativne aktivnosti različnih antioksidantov. Večja, kot je vrednost EC<sub>50</sub>, slabši antioksidant je spojina (16).



Slika 6: Redukcija DPPH<sup>•</sup> z antioksidantom (H-A) in do DPPH-H in novega radikala, ki izvira iz antioksidanta

## 1.4 UV-Vis SPEKTROSKOPIJA

UV-Vis spektroskopija je ena od osnovnih metod za kvantitativno analizo spojin, ki vsebujejo kromoforne skupine za absorpcijo UV ali vidne svetlobe v UV območju od 200 do 380 nm in/ali v vidnem območju od 380 do 780 nm. Kromofori so snovi z dvojnimi ali trojnimi vezmi (alkeni, alkini) ali vsebujejo funkcionalne skupine, kot so karbonilna, karboksilna, amido, azo, nitro... skupine in so odgovorne za obarvanost molekule v vidnem spektru. Absorpcija je rezultat spremembe na nivoju valenčnih elektronov, katere vzbudimo z elektromagnetnim valovanjem; le ti preidejo iz osnovnega stanja v vzbujeno stanje, energija pa ustreza valovni dolžini absorbiranega elektromagnetnega valovanja. Za doseganje najboljšega odziva opravljamo meritve pri absorpcijskem maksimumu ( $\lambda_{\max}$ ), ki ga določimo sami ali poiščemo njegovo vrednost v literaturi. UV/VIS-spekter je grafična predstavitev, ki prikazuje absorbanco (absorbirani del vpadne svetlobe) v odvisnosti od valovne dolžine svetlobe in posreduje kvalitativno in predvsem kvantitativno informacijo o spojini. Velja premo sorazmerje med absorbanco in koncentracijo snovi, kar opisuje Beer-Lambertov zakon (Slika 7) (17, 18, 19).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b$$

A = absorbanca,

$\varepsilon$  = molarni absorpcijski koeficient ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

c = molarna koncentracija snovi ( $\text{molL}^{-1}$ )

b = dolžina poti žarka oz. dolžina kivete (cm)

*Slika 7: Beer-Lambertov zakon*

Glede na Beer-Lambertov zakon naj bi bila absorbanca v linearnem razmerju s potjo, ki jo prepotuje žarek skozi vzorec in koncentracijo, vendar v realnosti nekontrolirani pogoji povzročijo pri meritvi netočen položaj absorpcijskega maksimuma ( $\lambda_{\max}$ ). Zato je treba upoštevati:

- Za meritev so primerni tekoči vzorci ali vzorci raztopljeni v določenem topilu. Trdni so manj primerni, saj se svetloba na njih razprši, ne pa odbije, kar daje popačene rezultate;

- Analit lahko asociira, disociira ali reagira s topilom ali drugimi komponentami v vzorcu, kar daje nekonstanten molarni absorpcijski koeficient. ( $\epsilon_{\max}$ );
- V praksi se uporabljajo preveč koncentrirane spojine ( $c > 0,10 \text{ mol/L}$ ), ki dajejo nelinearnost, prav tako se takšen pojav izrazi pri visokih koncentracijah elektrolitov (pufer);
- Izbira topila vpliva na položaj absorpcijskega maksimuma. Etanolne raztopine povzročijo nastanek absorpcijskega maksimuma pri daljši valovni dolžini, raztopine v heksanu pa pri krajši;
- Absorbanco vedno pomerimo pri valovni dolžini, ki ustreza maksimumu absorpcije. Na ta način se izognemo polikromatskemu sevanju in prepuščanju širokega območja valovnih dolžin (17, 19).

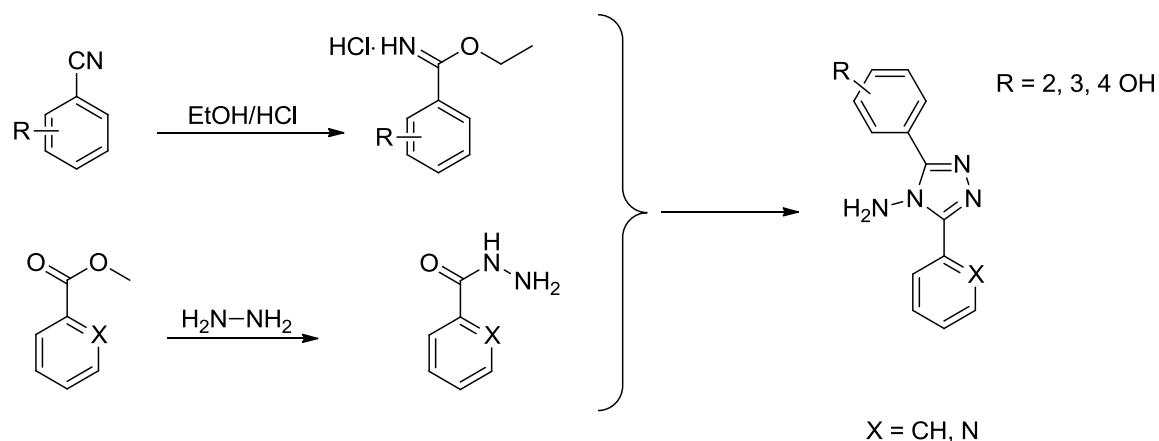
Pri enostavnih vzorcih metodo lahko uporabljamo neposredno, večinoma pa v kombinaciji s separacijskimi metodami. Primer je HPLC, kjer je najpogostejši detektor UV-VIS detektor (19).

## 2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali nekaj derivatov 3,5-difenil-1,2,4-triazola s fenolnimi –OH skupinami na enem ali obeh fenilnih obročih (Slika 8).

Spojine bomo ustrezno ovrednotili z instrumentalnimi metodami (NMR, MS, IR) in jim potrdili strukturo. Predpostavljamo, da imajo fenolni derivati antioksidativne lastnosti, zato jim bomo določili antioksidativno kapaciteto s pomočjo redukcije radikala difenilpikrilhidrazila (DPPH) in izračunali vrednost srednjih efektivnih koncentracij  $EC_{50}$  ter rezultate primerjali med posameznimi spojinami in z vrednostjo standarda etil galata.

Nekateri triazoli že izkazujejo številne ugodne terapevtske učinke. Znana pa je tudi povezava med antioksidativnim delovanjem in strukturo takšnih spojin, zato bomo v okviru diplomske naloge s sintezo novih spojin in določanjem antioksidativne kapacitete pripomogli k razširitvi znanja o fenolnih triazolih.



Slika 8: Sintezni načrt



## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 REAGENTI IN TOPILA

Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo uporabljali topila in reagente naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Emsure, TCI in Merck.

### 3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIPOMOČKI

Pri delu smo uporabili naslednje aparature

- Analitski tehtnici AE240 in AG245 (METTLER Toledo)
- Precizno tehtnico (METTLER – Toledo PB403)
- Rotavaporja BüchiRotavapor R-124 in BüchiRotavapor RE111
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 3 (ISKRA Pio d.o.o)
- Sušilnik
- Magnetno mešalo IKA
- Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek® Instruments), s programsko opremo Gen5 (BioTek)

Pri delu smo uporabili naslednje laboratorijske pripomočke:

- Polavtomatske pipete 100 - 1000  $\mu$ L (Thermo scientific) in 5 - 50 mL (BRAND)
- Nastavke za pipete (BRAND)
- Plastične semi-mikro kivete 1,5 mL, dimenzije 12,5  $\times$  12,5  $\times$  45 mm (BRAND)
- Steklene penicilinke 10 mL (neoLAB)
- Mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami (Techno Plastic Products)
- Parafilm M (BEMIS)
- Steklovino: 25,mL, 50,mL, 100,mL merilno bučko, stekleno palčko, čaše, steklene kapalke, kapalnik z obodom, epruvete, kolone
- Kovinsko žličko (različni proizvajalci)
- Nučo, presesalno erlenmajerico 100 mL
- Mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf)
- Osebna zaščitna sredstva

### **3.3 PROGRAMSKA OPREMA**

Program ChemDraw ultra 11.0 ter ChemBioDraw ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft smo uporabili za risanje strukturnih formul sintetiziranih spojin, reakcij, poimenovanje po IUPAC nomenklaturi in za določevanje njihovih molekulskih mas.

V programu Gen 5 (BioTek) smo pripravili protokol za meritve absorbanc na mikrotitrskih ploščicah.

MS Excel 2010 smo uporabili za analizo meritev absorbanc, risanje grafov in izračun vrednosti  $EC_{50}$  parametrov.

### **3.4 KARAKTERIZACIJA SINTETIZIRANIH SPOJIN**

#### **3.4.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)**

S TLC kromatografijo smo spremljali potek kemijskih reakcij, analizirali ali je vzorec homogen ali heterogen in določali prisotnost sintetizirane spojine. Na podlagi TLC analize smo določili ustrezne frakcije pri čiščenju spojine s kolonsko kromatografijo. Plošče TLC Silica gel 60 F253 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu so predstavljale stacionarno fazo, mobilne faze so bile različne in so navedene pri sintezi posamezne spojine. Spojine na TLC ploščicah smo detektirali pod UV svetlobo (valovne dolžine 254 nm) in nekatere orosili z orositvenimi reagenti (ninhidrin, fosfomolibdenova kislina), pripravljenimi po standardnem postopku.

#### **3.4.2 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA**

Kolonsko kromatografijo smo uporabili v stopnjah ločevanja in čiščenja spojine od nastalih stranskih produktov. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04-0,063 nm proizvajalca Merck, mobilne faze pa so bile različne in so navedene pri sintezi spojine.

#### **3.4.3 JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR)**

Z NMR spektroskopijo smo določili oz. potrdili strukturo sintetizirane spojine. Uporabili smo NMR spektrofotometer Bruker Avance DPX 400 (Fakulteta za farmacijo, UL).

Pripravljen vzorec smo raztopili v devteriranem topilu DMSO- $d_6$  in snemali pri 400 MHz.  $^1\text{H}$  NMR spektre smo procesirali v računalniškem programu NMR notebook Version 2.70 build 0.9, proizvajalca NMRtec.

#### 3.4.4 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)

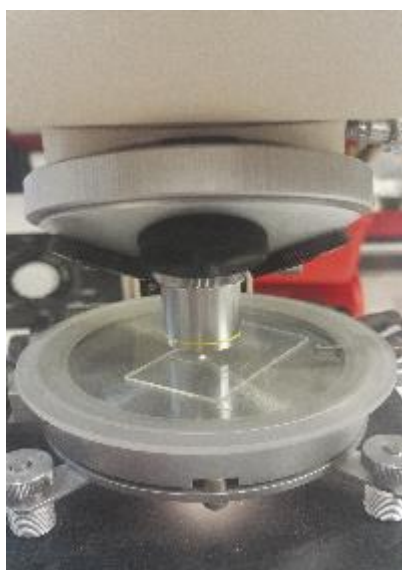
Masni spektri za identifikacijo spojine so bili posneti na masnem spektrometru Advion expression<sup>L</sup> na FFA.

#### 3.4.5 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR)

Za merjenje IR spektrov smo uporabili spektrofotometer Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo. Pri merjenju smo uporabili tehniko oslABLJENE popolne odbojnosti (ATR) in dobljene spektre analizirali s programom Omnic E.S.P.5.2

### 3.5 DOLOČANJE TALIŠČ

Tališča sintetiziranih spojin smo določili s Kofflerjevim mikroskopom proizvajalca Leica, z ogrevalno mizico, ki služi določanju temperature tališča trdnih kristaliničnih spojin (Slika 9).



*Slika 9: Določanje tališča s Kofflerjevim mikroskopom.*

### 3.6 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Za določitev antioksidativnega delovanja spojin smo uporabili test DPPH. Za merjenje absorbanc preiskovanih raztopin smo uporabljali mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinami in mikrotitrski čitalec Synergy H4 Hybrid Reader s programsko opremo Gen5 (BioTek).

### 3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2010. Za vsako preiskovano spojino smo izračunali:

- Odstotek preostalega DPPH po 90 minutah:

$$\% DPPH = \frac{A_f}{A_0} * 100 \quad (\text{Enačba 1})$$

Kjer je:

$A_f$  (absorbanca ob koncu meritve)

$A_0$  (absorbanca ob času 0)

- Vrednost  $EC_{50}$  smo izračunali iz grafov, s pomočjo enačbe linearne premice:

$$y = k * x + n \quad (\text{Enačba 2})$$

Kjer je:

y (polovica maksimalne vrednosti za absorbanco)

k (naklon premice)

x (vrednost  $EC_{50}$ )

n (odsek premice na ordinati)

- Za izračun standardne napake (SN), ki je mera za obseg napake v napovedi y-a za posamezni x, smo uporabili funkcijo STEYX v programu MS Excel 2010:

$$SN = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left[ \sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right]} \quad (\text{Enačba 3})$$

Kjer je:

n (velikost vzorca)

$\bar{y}$  (srednja velikost  $y$ )

$\bar{x}$  (srednja vrednost  $x$ )

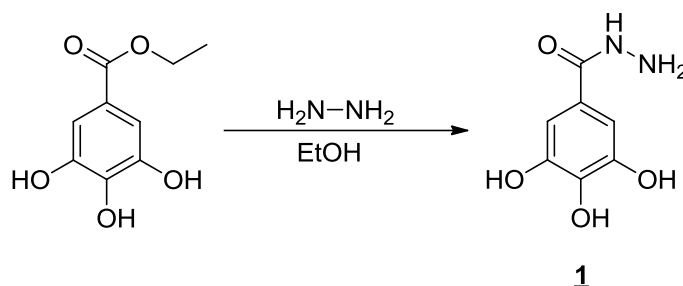
$y$  (matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk)

$x$  (matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk)

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 SINTEZA SPOJIN

#### Sinteza 3,4,5-trihidroksibenzohidrazida (**1**)



V 50 mL bučko smo natehtali etil 3,4,5-trihidroksibenzoat (5,0 g; 25,3 mmol) in ga raztopili v brezvodnem etanolu (19 mL). Reakcijsko zmes smo segrevali in mešali na oljni kopeli do temperature 60 °C, dokler se ni popolnoma raztopila vsa izhodna spojina. V zmes smo nato odmerili 55 % hidrazin hidrat (1,47 mL; 30,4 mmol) in pustili refluktirati na oljni kopeli 24 ur pri temperaturi 95 °C. Naslednji dan smo zmes prenesli na ledeno kopel, kjer so izpadli beli kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem in pri tem spirali s prečiščeno vodo. Oborino smo do suhega posušili na rotavaporju in membranski črpalki (5,52 g). Produkt glede na NMR analizo ni nastal, zato smo v bučko z izhodno spojino dodali še nekaj etanola (28 mL) in 55% hidrazin hidrata (2 mL) ter zmes segrevali in mešali na oljni kopeli še 24 ur pri 95 °C. Naslednji dan smo pri sobni temperaturi v zmes odmerili še nekaj etanola, da se je zmes bolje raztapljala in bučko z zmesjo ponovno dali refluktirati na oljno kopel za nekaj minut pri 95 °C. Reakcijsko zmes smo ohladili, oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in spirali s prečiščeno vodo. Oborino smo prenesli v novo bučko in produkt do suhega posušili. Dobili smo bele kristale (**1**; 5,89 g).

#### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: bela trdna snov

Molekulska masa: 184,15 g/mol

Izkoristek reakcije: 126%

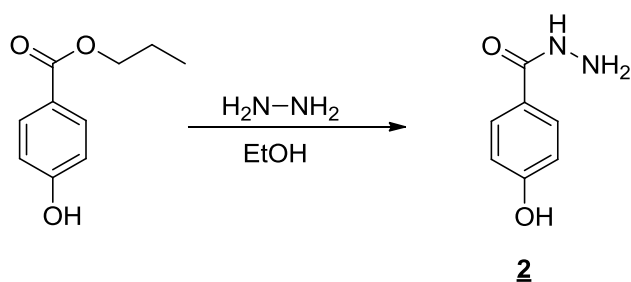
R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 4/1): 0,63

T tališča: 260 °C (dekompozicija)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 2,00 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 5,30 (s, 3H, 3 × -OH), 6,80 (s, 2H, 2 × H-Ar), 8,00 (s, 1H, -NH-CO-).

IR (ATR): 3422, 3390, 3296, 3145, 1596, 1545, 1499, 1466, 1414, 1365, 1338, 1285, 1201, 1165, 1105, 1052, 1029, 966, 908

## Sinteza 4-hidroksibenzohidrazida (**2**)



V 50 mL bučko smo natehtali propil 4-hidroksibenzoat (3,60 g; 20 mmol) ter dodali etanol kot topilo (15 mL). Reakcijsko zmes smo segrevali in mešali na oljni kopeli, da se je izhodna spojina povsem raztopila. Ko je temperatura oljne kopeli dosegla 60 °C, smo v zmes odmerili 64-65% hidrazin hidrat (1,16 mL) in zmes 24 ur mešali na oljni kopeli pri 95 °C. Naslednji dan smo zmes ohladili na sobno temperaturo in glede na TLC analizo ugotovili, da produkt nastaja, zato smo dodali še nekaj hidrazina (1 mL) in ponovno mešali na oljni kopeli 24 ur pri 95 °C. Nastala je rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in kristale prenesli v novo bučko, ter jih do suhega posušili na rotavaporju in membranski črpalki. Produkt smo prekristalizirali iz metanola, da so izpadli rjavi kristali. Matičnico smo previdno odlili in kristale do suhega posušili (**2**; 3,04 g).

## REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: rjava trdna snov

Molekulska masa: 152,15 g/mol

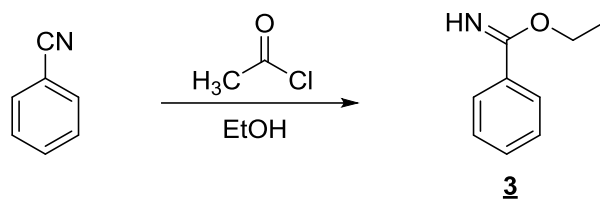
Izkoristek reakcije: 99%

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9/1): 0,15

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm): 5,32 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 6,88 – 7,18 (m, 2H, 2 × H-Ar); 7,76– 7,91 (m, 2H, 2 × H-Ar), 9,5 (s, 1H, CONH).



### Sinteza etil benzimidata (**3**)



V 50 mL bučko smo odmerili benzonitril (0,93 mL; 9 mmol) in brezvodni etanol (5,25 mL; 90 mmol). Bučko smo vpeli v stojalo nad magnetnim mešalom in v zmes počasi, približno 20 min po kapljicah dodajali acetil klorid (6,4 mL; 90 mmol), pri tem pa je bila bučka z zmesjo postavljena v ledeno kopel. Nato smo odstranili ledeno kopel in pustili mešati 4 ure pri sobni temperaturi. Iz zmesi smo nato odparili topilo na rotavaporju in nastali bel prah do suhega posušili na membranski črpalki. Nato smo ga spirali z dietil etrom, da smo odstranili nezreagirane izhodne spojine. Eter smo previdno odlili in za uravnavo pH v bučko s produktom dodali nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (20 mL). Pričeli so izhajati mehurčki ogljikovega dioksida. Raztopino smo prenesli v lij-ločnik in jo trikrat ekstrahirali z etilacetatom (30 mL, 20 mL, 10 mL), pri čemer sta se ločili zgornja organska in spodnja vodno fazo. Fazi smo ločeno zbirali v čašah. Vodno fazo smo zavrgli, organsko fazo pa sušili z dodatkom natrijevega sulfata, ki smo ga nato odfiltrirali in sprali z etilacetatom. Organsko fazo s produktom smo prenesli v bučko, odparili topilo in do suhega posušili na membranski črpalki. Nastalo je brezbarvno olje (**3**; 1,54 g).

### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

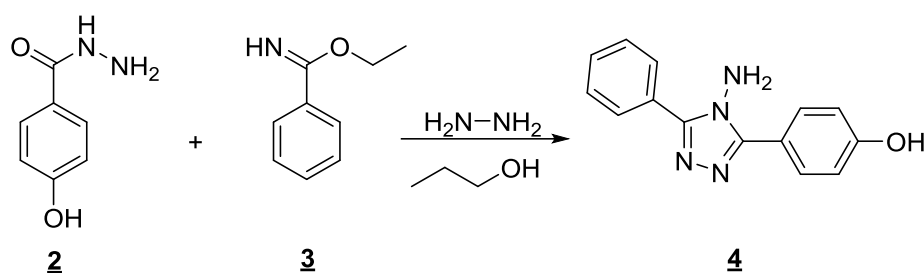
Izgled: brezbarvno olje

Molekulska masa: 185,65 g/mol

Izkoristek reakcije: 90,8%

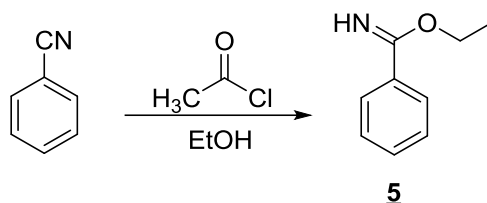
R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9/1): 0,8

#### Sinteza 4-(4-amino-5-fenil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenola (**4**)



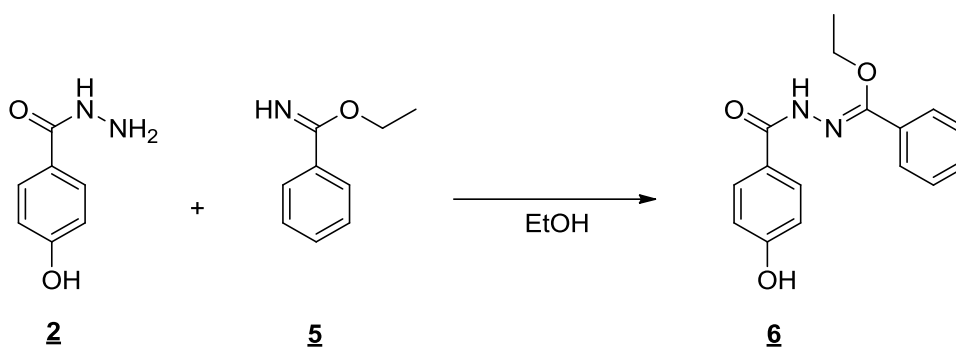
V 50 mL bučko smo natehtali 1,35 g spojine **2** (9 mmol) in dodali 1,50 g spojine **3** (8,3 mmol) ter jima odmerili 50% hidrazin hidrat (1,4 mL; 22,5 mmol) in nato še 1-propanol kot topilo (90 mL). Reakcijsko zmes smo mešali na oljni kopeli 24 ur pri 97 °C. Naslednji dan smo bučko odstavili in na sobni temperaturi so izpadli rožnati kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem in posušili do suhega. Glede na TLC analizo je bilo produkta v obliki kristalov zelo malo, zato smo sklepali, da bi ga lahko bilo v matičnici več, vendar pa je nezreagiran hidrazin motil nastanek produkta. Zato smo s pomočjo vakumske črpalke posušili spojino **2** oz, odstranili hidrazin (1,76 g; 11,56 mmol). Produkt ni nastal.

### Sinteza etil benzimidata (5)



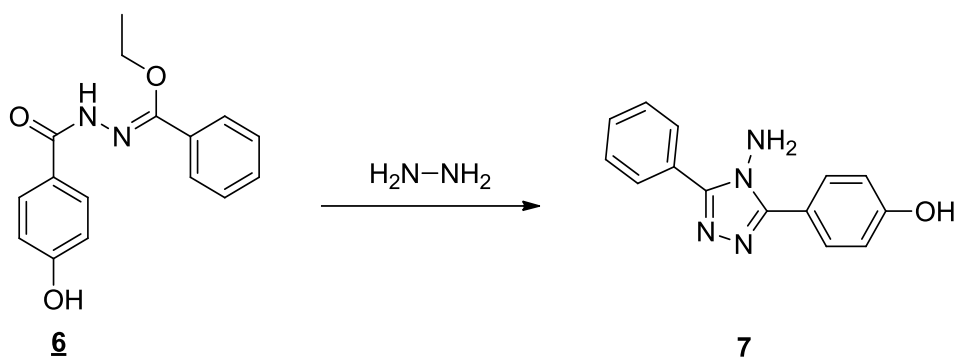
V 50 mL bučko smo odmerili benzonitril (1,27 mL; 12,3 mmol) in dodali etanol (7,16 mL; 122 mmol). Bučko z reakcijsko zmesjo smo vpeli v stojalo nad ledeno kopeljo in nato 20 min v bučko počasi dokapavali acetil klorid (8,73 mL; 122 mmol). Zatem smo odstranili ledeno kopel in pustili mešati 4 ure pri sobni temperaturi s pomočjo magnetnega mešala. Na rotavaporju smo odparili topilo, nastali bel prah pa smo posušili do suhega na membranski črpalki (5; 2,28 g). Spojine nismo analizirali, ker smo takoj nadaljevali s sintezo.

### Sinteza (Z)-etil-*N'*-(4-hidroksibenzil)benzohidrazonata (6)



V bučko s spojino 5 (2,278 g, 12,270 mmol) smo dodali spojino 2 (1,76 g, 11,56 mmol). Dodali smo etanol (17 mL) nato pa bučko prestavili na oljno kopel in zmes pustili mešati 72 ur pri 95 °C. Nastal je amonijev klorid kot bela oborina, ki smo jo odfiltrirali in sprali z brezvodnim etanolom, naš produkt pa je bil v raztopini. Produkta nismo izolirali, ampak smo takoj nadaljevali s sintezo.

#### Sinteza 4-(4-amino-5-fenil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)fenola (**7**)



Raztopini spojine **6** (3 mL) iz prejšnje stopnje smo dodali 55% hidrazin hidrat (1,47 mL, 30,4 mmol) ter reakcijsko zmes segrevali in mešali na oljni kopeli 24 ur pri 85 °C. Zmes smo nato ohladili na sobno temperaturo. Izpadli so rožnati kristali, ki smo jih skupaj z matičnico raztopili v etanolu in diklorometanu. Nato smo odparili topila in hidrazin ter produkt do suhega posušili na membranski črpalki. Dobili smo rožnat prah (1,571 g). Produkt smo čistili na koloni silikagela (80 g) z gradientno elucijo diklorometan/metanol od 20:1 do 10:1. Frakcije smo analizirali s tankoplastno kromatografijo in ustrezne zbrali v bučko, ter odparili topila. Produkt je v obliki olja (0,07 g). Produkt smo še enkrat čistili na koloni silikagela (20 g) z mobilno fazo diklorometan/metanol 9:1 in 5 % metanolom v diklorometanu. Ustrezne frakcije smo združili in odparili topila na rotavaporju. Olje (**7**; 0,087 g) je v hladilniku po nekaj dneh kristaliziralo. Nastali so beli kristali.

#### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: bela trdna snov

Molekulska masa: 252,10 g/mol

Izkoristek reakcije: 28,8%

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9/1): 0,35

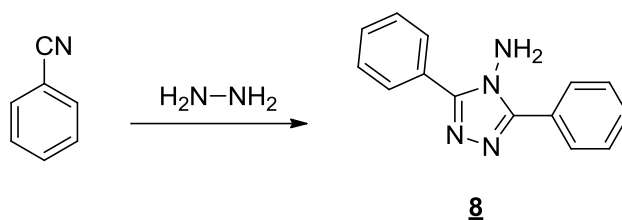
T tališča: 104 – 110 °C

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 6,77 – 6,81 (m, 2H, 2 × H-Ar); 7,53, – 7,59 (m, 3H, 3 × H-Ar); 7,63 – 7,67 (m, 2H, 2 × H-Ar); 8,04– 8,06 (m, 2H, 2 × H-Ar); 8,77 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 9,88 (s, 2H, 2 × HO-Ar).

IR (ATR): 3054, 1603, 1550, 1506, 1478, 1440, 1370, 1282, 1242, 1169, 1104, 1072, 1024, 976, 961

MS (ESI):  $m/z = 253,1 (M + H)^+$ ;  $251,1 (M - H)^-$

### Sinteza 3,5-difenil-4*H*-1,2,4-triazol-4-amina (**8**)



V 50 mL bučko smo odmerili benzonitril (0,98 mL, 9,6 mmol) in hidrazin hidrat 55% (5,14 mL; 100 mmol) in bučko prenesli na oljno kopel ter pustili mešati 48 ur pri 105 °C. Zmes smo nato ohladili na sobno temperaturo in oborino odfiltrirali s presesavanjem ter spirali s prečiščeno vodo. Matičnico s hidrazinom smo zavrgli, nastalo oborino pa prenesli v novo bučko in jo raztopili v metanolu in diklorometanu. Topili smo odparili na rotavaporju. Produkt (0,548 g) smo čistili na koloni silikagela (25 g) in uporabili mobilno fazo: diklorometan/metanol: 9:1 do 5% metanol v diklorometanu. Ustrezne frakcije glede na TLC analizo smo združili v bučko in odparili topila ter posušili na membranski črpalki. Pridobili smo bel prah (**8**; 0,166 g).

### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: bela trdna snov

Molekulska masa: 252,10 g/mol

Izkoristek reakcije: 6,85%

R<sub>f</sub> (5% MeOH v DKM): 0,2

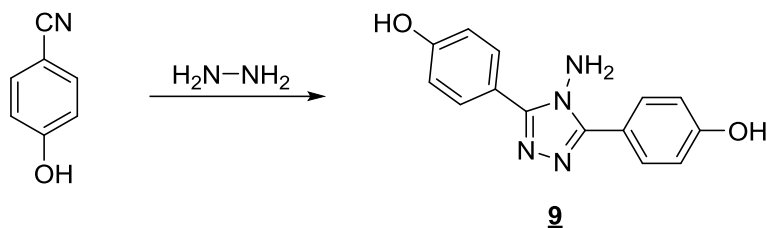
T tališča: 170 – 178 °C

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 6.30 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 7.53, – 7.59 (m, 6H, 6 × H-Ar); 8.04– 8.06 (m, 4H, 4 × H-Ar).

IR (ATR): 3072, 1599, 1456, 1455, 1387, 1309, 1189, 1173, 1103, 1076, 1052, 1023, 999, 931, 918

MS (ESI): m/z = 236.9 (M + H)<sup>+</sup>; 234.7 (M - H)<sup>-</sup>

### Sinteza 4,4'-(4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3,5-diil)difenola (**9**)



V 50 mL bučko smo natehtali 4-cianofenol (1,14 g; 9,6 mmol) in vanjo odmerili 55% hidrazin hidrat (5,135 mL; 100 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali in mešali na oljni kopeli 48 ur pri 105 °C. Ohladili smo jo na sobno temperature in vsebino odfiltrirali s presesavanjem ter spirali s prečiščeno vodo. Matičnico s hidrazinom smo zavrgli, izpadle oranžno bele kristale (0,986 g) pa smo čistili na koloni silikagela (60 g). Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol 9:1 do 5:1. Glede na TLC analizo smo ustrezne frakcije zbrali v bučko in na rotavaporju odparili topila ter produkt na membranski črpalki posušili do suhega. Pridobili smo oranžno bel prah (**9**; 0,053 g).

### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: oranžno bela trdna snov

Molekulska masa: 268,27 g/mol

Izkoristek reakcije: 2%

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 9/1): 0,4

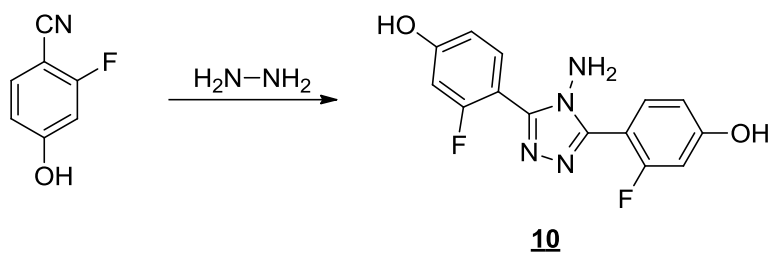
T tališča: 240 °C (dekompozicija)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 6,77 – 6,81 (m, 4H, 4 × H-Ar); 7,63 – 7,67 (m, 4H, 4 × H-Ar); 8,77 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 9,88 (s, 2H, 2 × HO-Ar).

IR (ATR): 3274, 1605, 1586, 1486, 1452, 1394, 1370, 1287, 1240, 1221, 1167, 1182, 1102, 1051, 986, 959, 925

MS (ESI): m/z = 268.9 (M + H)<sup>+</sup>; 267.0 (M - H)<sup>-</sup>

### Sinteza 4,4'-(4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3,5-diil)bis(3-fluorofenola) (**10**)



V 50 mL bučko smo natehtali 2-fluoro-4-hidroksibenzonitril, (1,0 g; 9,6 mmol) ter odmerili 55% hidrazin hidrat (5,14 mL, 100 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali 48 ur pri 105 °C na oljni kopeli ter po dveh dneh oborino odfiltrirali s presesavanjem. Pridobili smo rumeno bele kristale, ki so bili po TLC analizi videti čisti in jih zato nismo nadalje čistili s kolonsko kromatografijo (**10**; 0,34 g).

### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: rumeno bela trdna snov

Molekulska masa: 304,08 g/mol

Izkoristek reakcije: 11,6%

T tališča: 188 – 191 °C

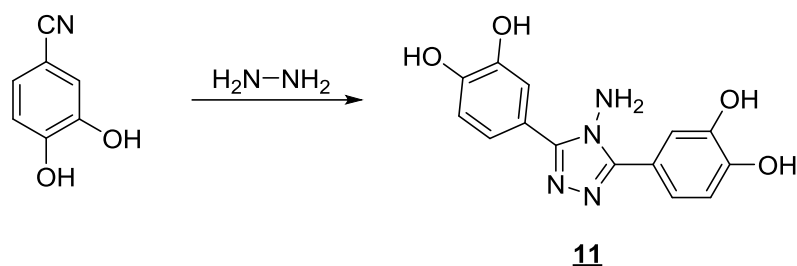
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 5,03 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6,35 (dd, 2H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 8,4 Hz, 2 × H-Ar); 6,52 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, 2 × H-Ar); 7,32 (d, 2H, *J* = 2,4 Hz, 2 × H-Ar); 10,83 (s, 2H, 2 × HO-Ar).

IR (ATR): 3381, 3270, 1606, 1586, 1541, 1487, 1448, 1394, 1348, 1287, 1241, 1217, 1166, 1102, 1051, 989, 927

MS (ESI): *m/z* = 300.7 (M + H)<sup>+</sup>; 298.8 (M - H)<sup>-</sup>



### Sinteza 4,4'-(4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3,5-diil)bis(benzen-1,2-diola) (**11**)



V 50 mL bučko smo natehtali 3,4-dihidroksibenzonitril, 97% (1 g, 9,7 mmol) in odmerili 55% hidrazin hidrat (5,14 mL; 100 mmol). Vsebino smo prenesli na oljno kopel in pustili segrevati in mešati 48 ur pri 105 °C. Po dveh dneh smo bučko odstavili in ohladili na sobno temperaturo ter vsebino odfiltrirali s presesavanjem. Oborino smo prenesli v novo bučko in jo raztopili v diklorometanu in metanolu. Obe topili smo izparili na rotavaporju do suhega in vsebino posušili na membranski črpalki. Pridobili smo sivo rjave kristale, ki so bili po TLC analizi videti čisti in jih zato nismo nadalje čistili (**11**; 0,40 g).

### REZULTATI IN LASTNOSTI ANALIZE:

Izgled: sivo rjava trdna snov

Molekulska masa: 300,09 g/mol

Izkoristek reakcije: 12,8%

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 4/1): 0,3

T tališča: 300 °C (dekompozicija)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) = 6,04 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6,83 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, 2 × H-Ar); 6,20 (bs, 4H, 4 × HO-Ar); 7,33 (dd, 2H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 8,4 Hz, 2 × H-Ar); 7,43 (d, 2H, *J* = 2,4 Hz, 2 × H-Ar).

IR (ATR): 3413, 3339, 3161, 3029, 2708, 1607, 1550, 1473, 1410, 1356, 1274, 1224, 1214, 1116, 1086, 1063, 1001, 940, 903

MS (ESI): *m/z* = 300,7 (M + H)<sup>+</sup>; 298,8 (M - H)<sup>-</sup>

## 4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE

### 4.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

Za določanje antioksidativnega delovanja smo pripravili osnovno in delovno raztopino DPPH, raztopino standarda etil galata in raztopine šestih pripravljenih spojin (1, 7, 8, 9, 10, 11), za katere smo predvidevali, da imajo antioksidativno delovanje. Za raztapljanje smo uporabili metanol, popolno razbitje kristalov pa smo dosegli s pomočjo ultrazvočne kopeli.

#### 4.2.1.1 Priprava osnovne in delovne raztopine DPPH

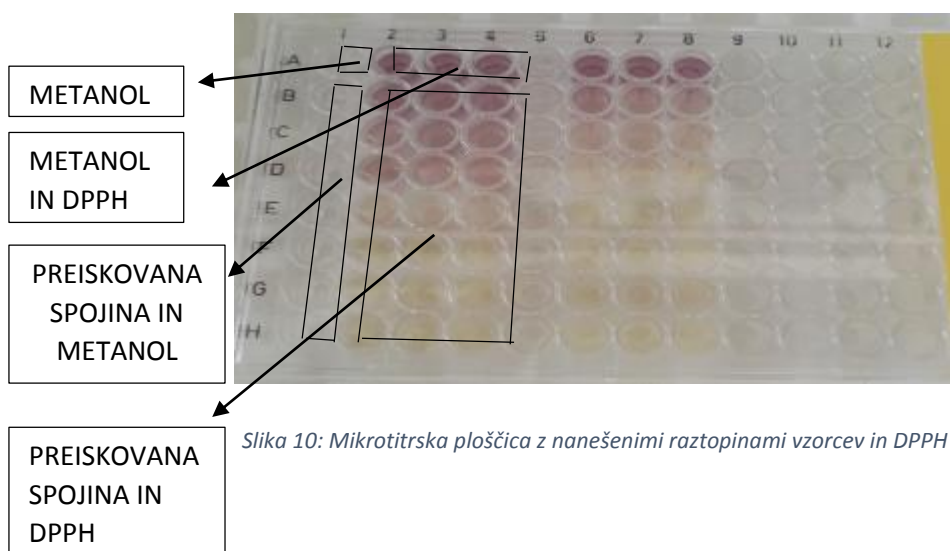
V 25 mL merilno bučko smo natehtali 6,90 mg DPPH, ter mu dodali metanol in dobro premešali. Do oznake smo dokapali topilo in tako pripravili 700  $\mu\text{M}$  osnovno raztopino DPPH. Bučko smo ovili v aluminijasto folijo in raztopino na ta način zaščitili pred svetlobo ter jo pred uporabo shranili v hladilniku. Za testiranja smo pripravili delovno raztopino DPPH s koncentracijo 140  $\mu\text{M}$ , tako da smo v penicilinko odmerili 1 mL osnovne raztopine DPPH in dodali 4 mL metanola (5 - kratna redčitev osnovne raztopine). Za testiranja smo tako pripravljeno raztopino DPPH mešali v razmerju 1:1 z vzorci pripravljenih spojin. Tako je znašala končna koncentracija DPPH za testiranje 70  $\mu\text{M}$ . Pripravljeni raztopini DPPH smo z UV/VIS spektrofotometrom izmerili absorbanco in določili absorpcijski maksimum 517 nm, pri katerem smo z mikrotitrskim čitalcem testirali standardni antioksidant etil galat in spojine 1, 7, 8, 9, 10, 11.

#### 4.2.1.2 Priprava raztopine standarda in sintetiziranih spojin

Raztopine etil galata in šestih končnih spojin (1, 7, 8, 9, 10, 11) smo pripravili tako, da smo približno natančno zatehtali ustrezno količino vzorca v penicilinko in izračunali potreben volumen topila. Začetno raztopino s koncentracijo 1400  $\mu\text{M}$  smo nadalje redčili in pripravili vzorce različnih koncentracij, ki smo jih uporabili za testiranje (1,7 – 700  $\mu\text{M}$ ). Končne koncentracije vzorcev za testiranje so bile za polovico nižje, zaradi mešanja z metanolom ali z raztopino DPPH v razmerju 1:1.

#### 4.2.2 DOLOČITEV VREDNOSTI EC<sub>50</sub>

Reakcijske raztopine smo pripravljali na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami. Najprej smo v vdolbinice A1-A4 nanesti 150  $\mu$ L metanola, nato pod temi vdolbinicami v vrstice B do H odmerili štirikrat po 150  $\mu$ L vzorcev preiskovane spojine z naraščajočimi koncentracijami, dodali po 150  $\mu$ L metanola v prvi stolpec in v vse ostale vdolbinice po 150  $\mu$ L raztopine DPPH. Slika 10 prikazuje pripravo raztopin slepega vzorca (preiskovana spojina + metanol), preiskovanega vzorca (preiskovana spojina + DPPH) in slepega vzorca DPPH (DPPH + metanol). Ploščico smo pokrili in zaščitili pred svetlobo ter inkubirali 90 min na sobni temperaturi. Sledila je meritev absorbanc s čitalcem za mikrotitrne plošče pri  $\lambda = 517$  nm. Pridobljene podatke smo obdelali v Excelu in narisali graf odvisnosti deleža DPPH od koncentracije testirane spojine. Določili smo enačbo premice in izračunali vrednost EC<sub>50</sub>.



## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

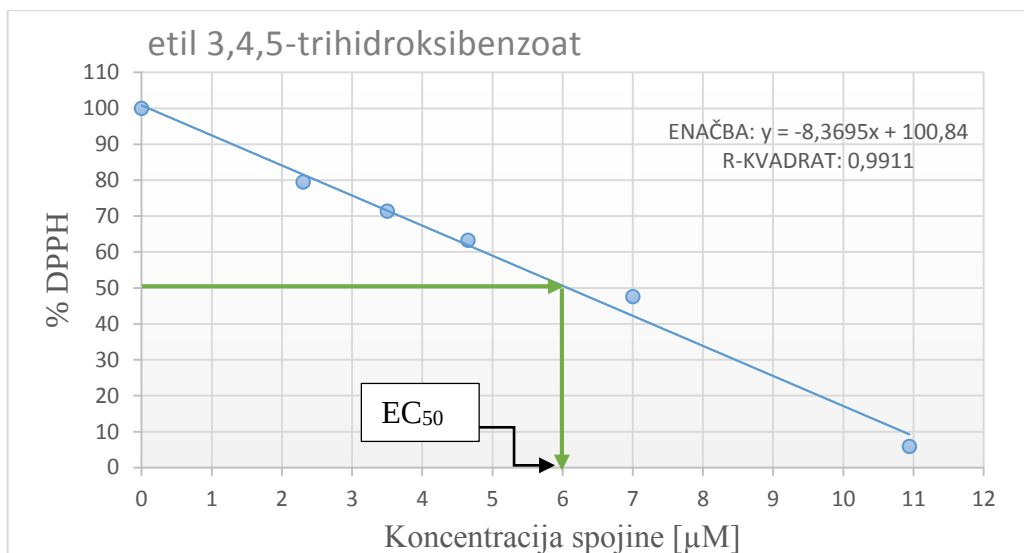
### 5.1 REZULTATI MERITEV ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Antioksidativno delovanje šestih končnih spojin smo pomerili s pomočjo DPPH testa, ki temelji na redukciji radikala DPPH s končnimi spojinami. Meritve smo večkrat ponavljali, saj smo po potrebi prilagajali koncentracije vzorcev tako, da smo dobili eksperimentalne točke, ki so bile na grafu razporejene pod in nad vrednostjo  $EC_{50}$ . Eksperimentalnim točkam smo tako prilegali premico in določili njeno enačbo ter R-kvadrat in podatke uporabili za izračun vrednosti  $EC_{50}$  s standardnim odklonom. Določanje vrednosti srednjih efektivnih koncentracij ni vedno najboljša izbira zaradi načrtnega prileganja točk premici oz. določanja vrednosti  $EC_{50}$ , ki mora potekati v linearnem območju, s čimer dobimo rezultate, ki dajejo manjše napake. Temu bi se lahko izognili z določanjem  $EC_{20}$ , saj omogoča rezultate v nelinearnem območju, prav tako pa so ti bolj natančni (20). Rezultate standardnih efektivnih koncentracij vzorcev smo primerjali s standardnim antioksidantom etil galatom. Testirane koncentracije etil galata in spojin **1**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, njihove izmerjene absorbance in izračunan odstotek nezreagirane DPPH smo prikazali v preglednici 1 ter v prilogi I. Priloga II prikazuje vrednosti  $EC_{50}$ , Excelove funkcije STEYX in  $EC_{50}$  skupaj s standardnim odklonom za etil galat in spojine **1**, **7**, **8**, **9**, **10** in **11**. % DPPH v odvisnosti od koncentracije posamezne spojine smo prikazali v obliki grafov (Slike 11-17).

#### **ETIL GALAT**

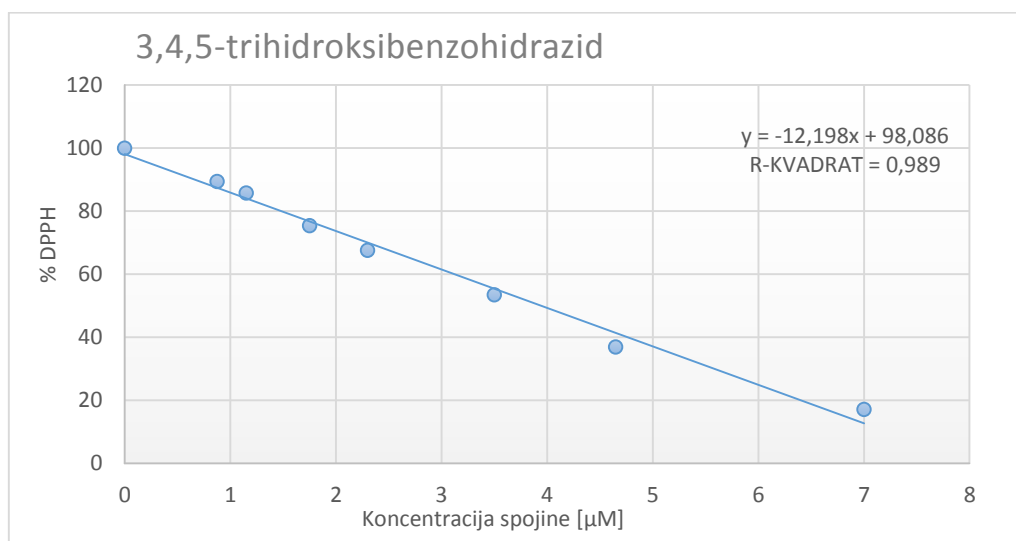
*Preglednica 1: Odstotek nezreagirane DPPH in rezultati meritev absorbanc pri različnih koncentracijah etil galata.*

| KONCENTRACIJA etil galata [ $\mu$ M] | % DPPH | Absorbanca |
|--------------------------------------|--------|------------|
| 0                                    | 100    | 0,63       |
| 2,30                                 | 79,5   | 0,50       |
| 3,50                                 | 71,4   | 0,45       |
| 4,65                                 | 63,2   | 0,40       |
| 7,00                                 | 47,5   | 0,30       |
| 10,9                                 | 5,86   | 0,02       |



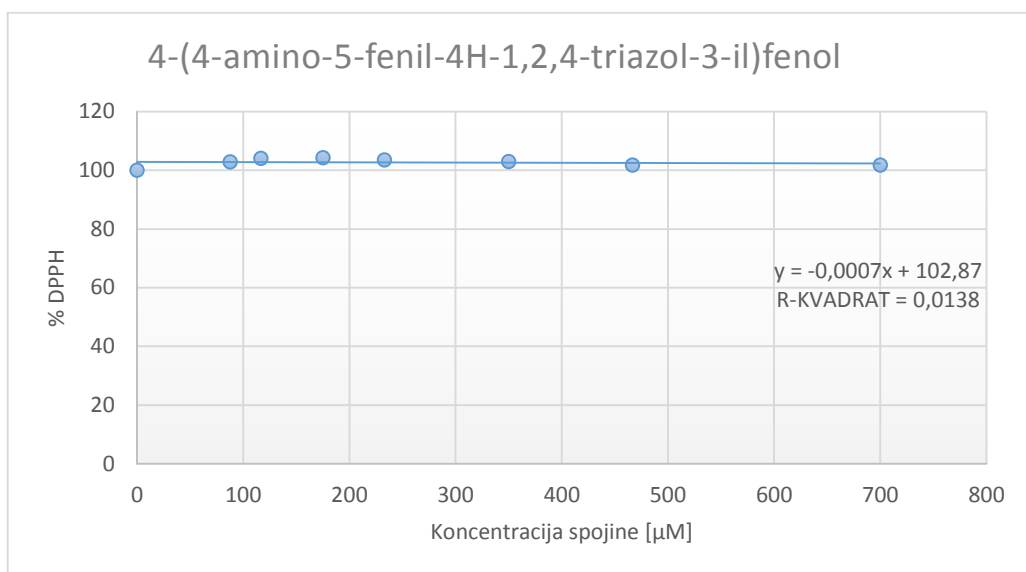
Slika 11: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij standarda etil galata

## **SPOJINA 1**



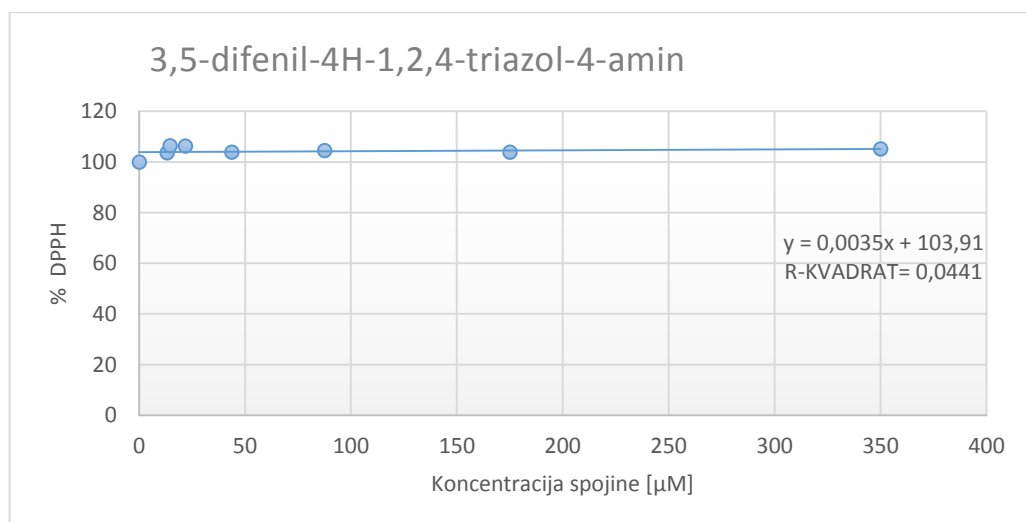
Slika 12: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine 1

## **SPOJINA 7**



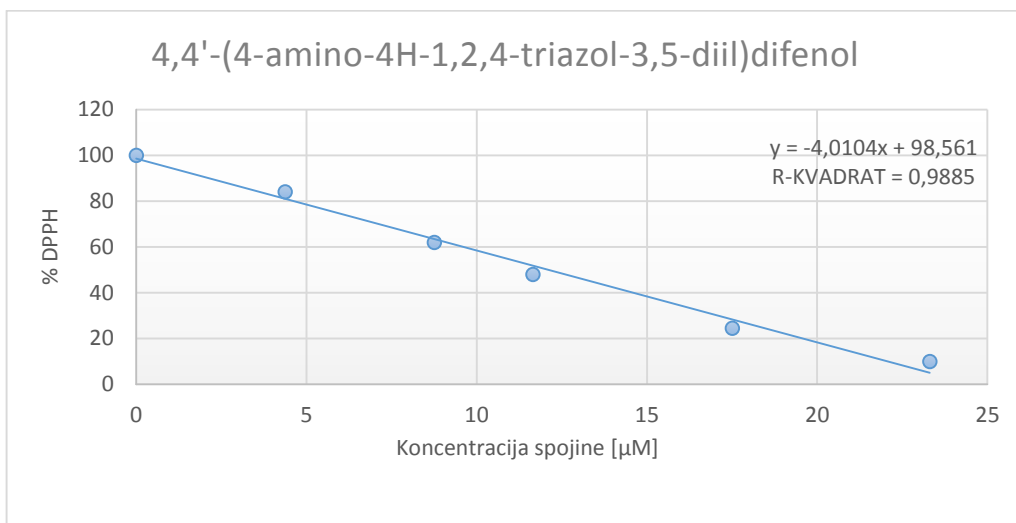
Slika 13: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine **7**

## **SPOJINA 8**



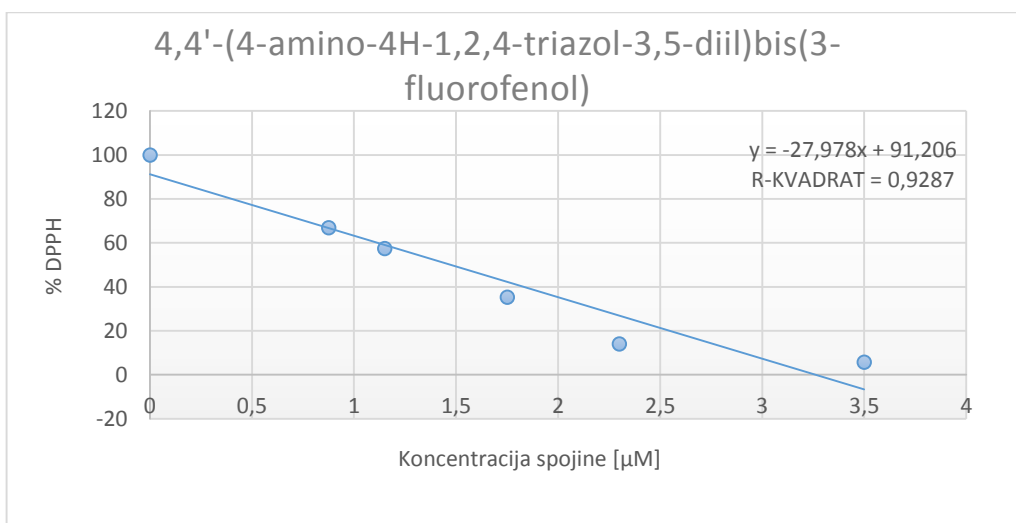
Slika 14: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine **8**

## **SPOJINA 9**



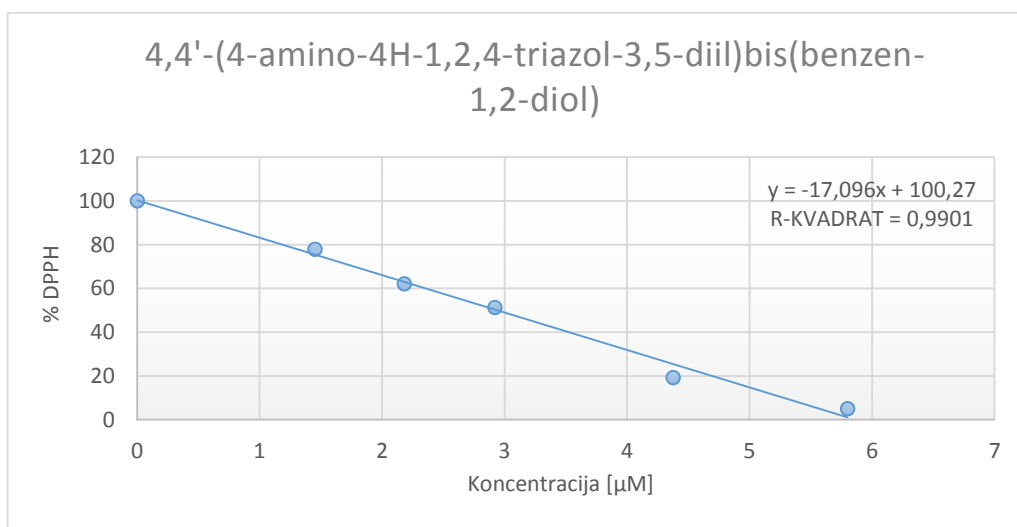
Slika 15: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine **9**

## **SPOJINA 10**

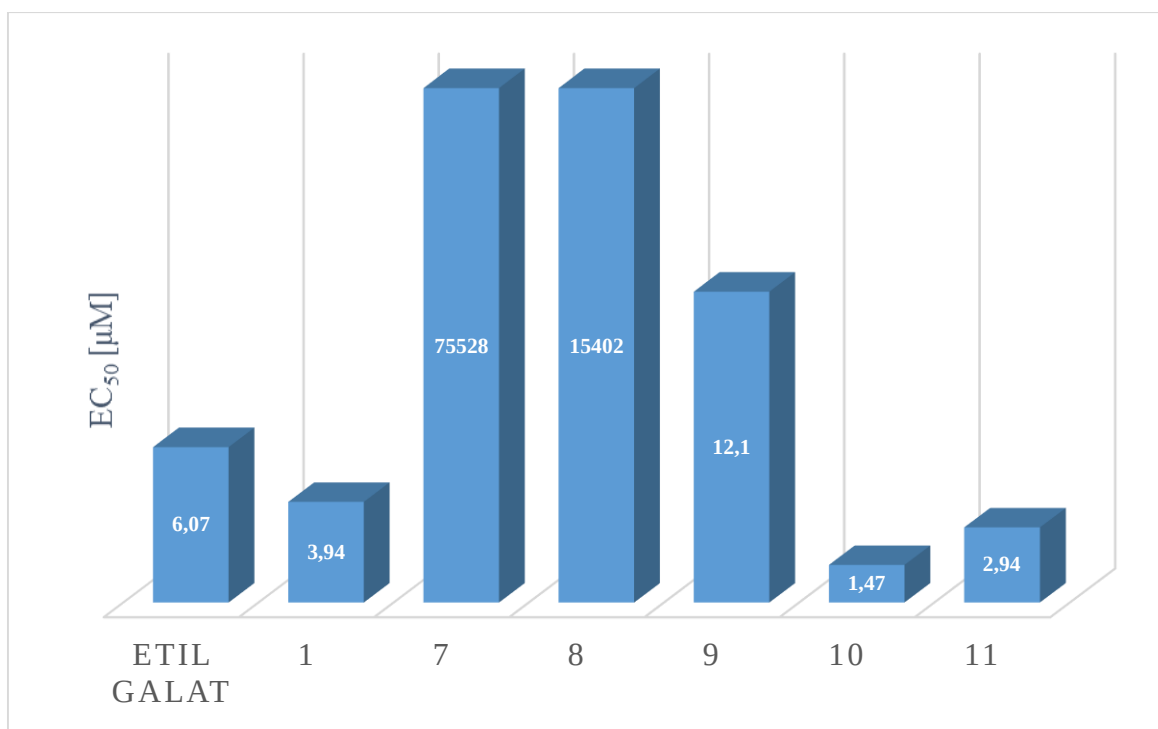


Slika 16: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine **10**

## SPOJINA 11



Slika 17: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti različnih koncentracij spojine 11



Slika 18: Prikaz vrednosti 50 % efektivne koncentracije za etil galat in spojine 1, 7, 8, 9, 10 in 11



## 5.2. VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE KONČNIH SPOJIN

V okviru diplomske naloge nas je zanimalo ali bodo sintetizirane spojine delovale kot antioksidanti, kar smo ugotovili z metodo merjenja antioksidativne kapacitete z DPPH testom. Cilj je bil izračun vrednosti standardnih efektivnih koncentracij za vsako spojino, le te pa smo med spojinami primerjali in razmišljali o vzrokih za dobljene rezultate. Oksidativni procesi so vzrok za oksidativne poškodbe tkiv in številna bolezenska stanja. V ta namen so antioksidanti pomembna iztočnica za raziskovanje njihove antioksidativne kapacitete za zaščito organizmov in celic pred oksidativnim stresom. Nekateri derivati 1,2,4-triazola so se že izkazali kot potencialne spojine, ki bi lahko igrale pomembno vlogo pri staranju kože, saj so ugotovili, da inhibirajo elastaze, ki uničujejo elastin, kolagen, proteoglikane, fibronektin in ostale komponente zunajceličnega matriksa (21). Prav tako smo tudi za naše spojine sklepali o njihovem antioksidativnem delovanju in nekatere spojine bi lahko bile v prihodnosti predmet nadaljnjih raziskav. Kot standardni antioksidant smo uporabili etil galat, fenolni antioksidant, ki inhibira rakave celice in vitro, učinkovito reagira s hidroksilnim radikalom, ki nastaja v Fentonovi reakciji in tako zavira njegovo reakcijo s proteini in DNA (22). S standardnim antioksidantom smo preverili ustreznost metode za določanje antioksidativnega potenciala in potrdili skladnost literaturne vrednosti  $EC_{50}$  – vrednosti se gibljejo okrog 20  $\mu M$  in manj, z našo izmerjeno vrednostjo  $6,07 \pm 0,41 \mu M$ . Glede na standard imajo spojine **1**, **10** in **11** boljše antioksidativno delovanje, medtem ko ima spojina **9** slabše delovanje, spojin **7** in **8** pa ne izkazuje antioksidativnega potenciala. Najprej smo pripravili vzorce spojin s koncentracijo od 1400  $\mu M$  navzdol (2-kratno redčenje vzorcev) in pomerili absorbance, vendar smo ugotovili, da nekatere spojine ne izkazujejo linearno odvisnost antioksidativnega delovanja od koncentracije. Pri teh spojinah smo zato prilagajali koncentracije in jih ustrezno redčili. Vseeno pa pri spojinah **7** in **8** pri vseh uporabljenih koncentracijah nismo mogli določiti antioksidativnega delovanja. Najboljše antioksidativno delovanje je izkazala spojina **10** ( $EC_{50} = 1,47 \pm 0,38 \mu M$ ), sledili pa sta ji spojina **11** ( $EC_{50} = 2,94 \pm 0,23 \mu M$ ) in **1** ( $EC_{50} = 3,94 \pm 0,26 \mu M$ ). Kot dober antioksidant se je izkazala tudi spojina **9** ( $EC_{50} = 12,1 \pm 1,03 \mu M$ ), pri spojinah **7** ( $EC_{50} = 75,5 \cdot 10^3 \pm 2,20 \cdot 10^3 \mu M$ ) in **8** ( $EC_{50} = 15,4 \cdot 10^3 \pm 0,60 \cdot 10^3 \mu M$ ) pa smo ovrgli antioksidativno delovanje. Test DPPH je enostavna metoda, ki zahteva veliko mero natančnosti, potrpežljivosti in zbranosti, saj smo morali tekom izvedbe najprej pravilno izračunati

količine spojin, jih točno ter natančno odmerjati volumne na mikrotitrsko ploščico. Za pripravo vzorčnih raztopin spojin, DPPH in standarda smo uporabili topilo metanol, saj so bile spojine v njem dobro topne, za pospešitev raztapljanja pa smo uporabili ultrazvočno kopel. Rezultate smo prikazali skupaj s standardnim odklonom. Rezultati so pričakovani, saj so vse spojine s fenolnimi -OH skupinami, kot donorji vodika za DPPH<sup>•</sup> izkazale antioksidativni potencial, spojina **8** brez fenolne -OH skupine pa ni izkazala antioksidativnega potenciala. Pri spojini **7** smo pričakovali antioksidativno delovanje, saj vsebuje eno fenolno -OH skupino, vendar le ta ni bila dovolj. Za bolj objektivne rezultate, zlasti za potrditev izkoristkov pri sintezah, bi morali sinteze spojin in testiranje ponoviti, prav tako samo DPPH test ni dovolj za posplošitev rezultatov. Morali bi uporabiti še kakšno metodo za ugotavljanje antioksidativne kapacitete in rezultate primerjati. Prav tako je metoda določanja parametra EC<sub>50</sub> manj natančna, saj morajo biti vrednosti meritev v linearnem območju.

## 6 SKLEP

V številnih študijah so se derivati 1,2,4-triazola izkazali kot zelo uspešne spojine na področju številnih zdravil, v novejših raziskavah pa se ugotavljajo tudi antioksidativne lastnosti takšnih spojin. Njihova uporaba na področju kozmetologije zaenkrat še ni razširjena, mogoče pa se bo na tem področju začelo kaj več dogajati v prihodnosti in naša raziskava bi bila lahko uvod v raziskovanje takšnih spojin kot antioksidantov. V okviru laboratorijskega dela smo sintetizirali 6 spojin ter jim potrdili strukturo z različnimi instrumentalnimi metodami. Nekaterim spojinam, ki smo jih tudi načrtovali, a niso opisane v sintezi spojin, pa nismo mogli potrditi strukture in jih zato nismo uporabili za nadaljnja testiranja za določitev antioksidativne kapacitete s pomočjo najpogostejše uporabljene *in vitro* DPPH metode. Izkoristki reakcij sintez so bil pri naših spojinah nizki, nekatere pa smo morali tudi čistiti z uporabo kolonske kromatografije, saj so številne nečistote motile nastanek produkta. To je končni izkoristek še zmanjšalo. S pomočjo standardnega antioksidanta etil galata smo dokazali, da je DPPH metoda ustrezna za določevanje antioksidativnega delovanja spojin. Tekom testiranja antioksidantov je bilo treba kar nekaj časa vložiti v pripravo raztopin za testiranje oz. je bilo potrebnih kar nekaj ponovitev testiranja, saj smo sproti določevali koncentracije vzorcev, ki so dajale rezultate v linearnem območju metode za izračun standardne efektivne koncentracije. Načeloma pa so bile pri nekaterih spojinah, ki so si bile strukturno bolj podobne, končne koncentracije približno enake. Že tekom priprave različnih redčitev smo opazili, da pri nekaterih koncentracijah testiranih spojin prehaja vijolična barva radikala DPPH v rumeno barvo. To je bil prvi dokaz za redukcijo takšnega radikala in antioksidativno delovanje spojine, ki smo ga le še potrdili z izmerjenimi absorbancami in nadalje z izračunanimi efektivnimi koncentracijami. Nižja, kot je efektivna koncentracija, boljša je antioksidativna kapaciteta spojine. Pet spojin, vključno s standardnim antioksidantom, se je izkazalo kot dobri antioksidanti, najbolj pa spojina **10** ( $EC_{50} = 1,47 \pm 0,38 \mu M$ ). Odlično antioksidativno delovanje so izkazale tudi spojine **11**, **1** in **9**. Le spojinama **7** in **8** nismo dokazali antioksidativno delovanje. Glede na pripravljene strukture spojin, ki z izjemo spojine **8** vsebujejo fenolne skupine, so rezultati pričakovani, saj vse takšne spojine delujejo antioksidativno, le spojina **7** z eno fenolno skupino ne izkazuje takšnega delovanja. Pri spojin **8** pa nismo pričakovali antioksidativnih lastnosti, ker ni derivat fenola. Uporabili smo jo kot negativno kontrolo za potrditev naše hipoteze. Zaključimo lahko, da antioksidativni učinki testiranih spojin izvirajo iz fenolnih skupin, ne

pa iz aminotriazolnega obroča. Za optimalne rezultate bi morali vse spojine ponovno sintetizirati in jim ponovno določiti antioksidativno kapaciteto, tokrat z ostalimi *in vitro* metodami za določanje antioksidativne kapacitete ter dobljene rezultate primerjati z rezultati pridobljenimi z DPPH metodo. Prav tako pa bi celotno raziskovanje morali podkrepiti še z ustreznimi *in vivo* študijami za uporabo na področju kozmetologije in farmacije.

## 7 VIRI IN LITERATURA

1. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 153-160
2. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. *Slovensko farmacevtsko društvo* 2015; 184-193
3. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdravniški vestnik* 2012; 81: 393-406
4. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres: *Farmacevtski vestnik* 2015; 66: 127-132
5. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition* 2004; 79: 727-747
6. Yang S. C, Wang X, Lu G, Picinich C. S: Cencer prevention by tea: animal studies, molecular mechanism and human relevance. *Nature Reviews Cancer* 2009; 9: 429-439
7. Barla F, Higashijima H, Funai S, Sugimoto K, Harada N, Yamaji R, Fujita T, Nakano Y, Inui K: Inhibitive Effects of Alkyl Gallates on Hyaluronidase and Collagenase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2009; 73: 2335-2337
8. Savia A. L, Leal C. P, Vieiraa O. T, Rossoa R, Nunesb J. R, Yunesb A. R, Creczynski-Pasaa B.T, Barardic R. M. C, Simõesa M. O. C: Evaluation of Anti-herpetic and Antioxidant Activities, and Cytotoxic and Genotoxic Effects of Synthetic Alkyl-Esters of Gallic Acid. *PubMed* 2005; 55: 66-75
9. Croft D. K: Dietary polyphenols: antioxidant or not. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2016; 595: 120-124
10. Wilhelmsova N, Boušova I, Prochazkova D: Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Science direct* 2011; 82: 513-523
11. Kaushik A, Ganguly S, Sahu JK: Triazoles: a valuable insight into recent developments and biological activities. *PubMed* 2013; 11: 456-465
12. Shneine K. J, Alaraji H. Y: Chemistry of 1,2,4-Triazole. *International Journal of Science and Research* 2016; 5: 1411-1423
13. Kaur R, Dwivedi AR, Kumar B, Kumar V: Recent developments on 1,2,4-Triazole Nucleus in Anticancer compounds. *PubMed* 2016; 16(4): 465-489
14. Serdar M, Gumrukcuoglu N, Alpay Karaoglu S, Demirbas N: Synthesis of Some Novel 3,5-Diaryl-1,2,4-Triazole Derivates and Investigation of Their Antimicrobial Activities. *Turk J Chem* 2007; 31: 315-326

15. Buyuktuncel E, Porgali E, Colak C: Comparison of Total Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Local Red Wines Determined by Spectrophotometric Methods. Food and Nutrition Sciences 2014; 5: 1660-1667
16. Kedare B. S, Singh R. P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology 2011; 48: 412-422
17. <http://simulab.ltt.com.au/5/PMLTEST506/section3Intro.htm> [avgust 2017]
18. <http://cnx.org/contents/Auez1s9H@1/Basics-of-UV-Visible-Spectrosc> [avgust 2017]
19. Predavanje instrumentalna analiza v kozmetologiji, študijsko leto 2014/15
20. Carmona-Jimenez Y, Garcia-Moreno M V, Igartuburu J M, Barosso C G; Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-product. Food Chem 2014; 165: 198-204
21. Gumrukcuogulu N, Sokmen B. B, Ugras S, Ugras I. Halil, Yanardag R: Synthesis, antibacterial, antielastase, antiurease, and antioxidant activities of new 1,4-butylene bridged bis-1,2,4-triazole derivatives. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2013; 28: 89-94
22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223376/> [avgust 2017]

## 8 PRILOGI

Priloga I: Preglednice uporabljenih koncentracij vzorcev testiranih spojin 1, 7, 8, 9, 10, 11, njihove izmerjene absorbance in odstotek nezreagiranega DPPH

Priloga II: Prikaz vrednosti  $EC_{50}$ , Excelove funkcije STEYX in  $EC_{50}$  skupaj s standardnim odklonom za spojine 1, 7, 8, 9, 10, 11

Priloga I: Preglednice uporabljenih koncentracij vzorcev testiranih spojin **1**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, njihove izmerjene absorbance in odstotek nezreagiraneja DPPH

| <b>KONCENTRACIJA<br/>spojine 1 [μM]</b> | <b>% DPPH</b> | <b>Absorbanca</b> |
|-----------------------------------------|---------------|-------------------|
| 0                                       | 100           | 0,27              |
| 0,88                                    | 89,4          | 0,25              |
| 1,15                                    | 85,7          | 0,234             |
| 1,75                                    | 75,4          | 0,21              |
| 2,30                                    | 67,6          | 0,19              |
| 3,50                                    | 53,5          | 0,15              |
| 4,65                                    | 37,0          | 0,10              |
| 7,00                                    | 17,2          | 0,05              |

| <b>KONCENTRACIJA<br/>spojine 7 [μM]</b> | <b>% DPPH</b> | <b>Absorbanca</b> |
|-----------------------------------------|---------------|-------------------|
| 0                                       | 100           | 0,56              |
| 87,5                                    | 102           | 0,57              |
| 116                                     | 104           | 0,58              |
| 175                                     | 104           | 0,58              |
| 233                                     | 103           | 0,57              |
| 350                                     | 103           | 0,57              |
| 466                                     | 101           | 0,57              |
| 700                                     | 101           | 0,57              |

| <b>KONCENTRACIJA<br/>spojine 8 [μM]</b> | <b>% DPPH</b> | <b>Absorbanca</b> |
|-----------------------------------------|---------------|-------------------|
| 0                                       | 100           | 0,53              |
| 13,1                                    | 103           | 0,55              |
| 14,6                                    | 106           | 0,56              |
| 21,9                                    | 106           | 0,56              |



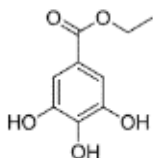
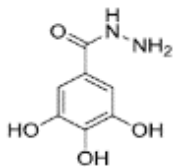
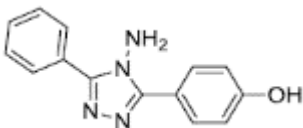
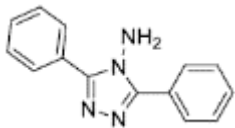
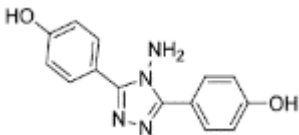
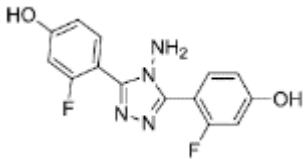
|      |     |      |
|------|-----|------|
| 43,8 | 103 | 0,55 |
| 87,5 | 104 | 0,55 |
| 175  | 103 | 0,55 |
| 350  | 105 | 0,56 |

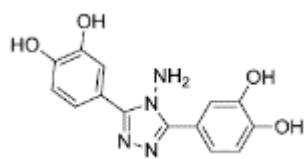
| <b>KONCENTRACIJA<br/>spojine <u>9</u> [μM]</b> | <b>% DPPH</b> | <b>Absorbanca</b> |
|------------------------------------------------|---------------|-------------------|
| 0                                              | 100           | 0,50              |
| 4,38                                           | 84,0          | 0,42              |
| 8,80                                           | 61,9          | 0,31              |
| 11,7                                           | 47,9          | 0,24              |
| 17,5                                           | 24,5          | 0,12              |
| 23,3                                           | 10,0          | 0,05              |

| <b>KONCENTRACIJA<br/>spojine <u>10</u> [μM]</b> | <b>% DPPH</b> | <b>Absorbanca</b> |
|-------------------------------------------------|---------------|-------------------|
| 0                                               | 100           | 0,53              |
| 0,88                                            | 66,9          | 0,36              |
| 1,15                                            | 57,4          | 0,31              |
| 1,75                                            | 35,3          | 0,19              |
| 2,30                                            | 14,1          | 0,07              |
| 3,50                                            | 5,60          | 0,03              |

| <b>koncentracija spojine <u>11</u><br/>[μM]</b> | <b>% DPPH</b> | <b>Absorbanca</b> |
|-------------------------------------------------|---------------|-------------------|
| 0                                               | 100           | 0,53              |
| 1,45                                            | 77,9          | 0,42              |
| 2,18                                            | 62,1          | 0,33              |
| 2,92                                            | 51,3          | 0,27              |
| 4,38                                            | 19,2          | 0,10              |
| 5,80                                            | 5,10          | 0,03              |

Priloga II: Prikaz vrednosti EC<sub>50</sub>, excelove funkcije STEYX in EC<sub>50</sub> skupaj s standardnim odklonom za spojine 1, 7, 8, 9, 10, 11

|                                                                                                                 | EC <sub>50</sub>     | STEYX | SD                   | EC <sub>50</sub> ± SD                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------|----------------------|---------------------------------------------|
| <b>Etil galat</b><br>          | 6,07                 | 3,40  | 0,41                 | 6,07 ± 0,41                                 |
| <b>Spojina <u>1</u></b><br>    | 3,94                 | 3,19  | 0,26                 | 3,94 ± 0,26                                 |
| <b>Spojina <u>7</u></b><br>  | 75,5*10 <sup>3</sup> | 1,54  | 2,20*10 <sup>3</sup> | 75,5*10 <sup>3</sup> ± 2,20*10 <sup>3</sup> |
| <b>Spojina <u>8</u></b><br>  | 15,4*10 <sup>3</sup> | 2,12  | 0,60*10 <sup>3</sup> | 15,4*10 <sup>3</sup> ± 0,60*10 <sup>3</sup> |
| <b>Spojina <u>9</u></b><br>  | 12,1                 | 4,12  | 1,03                 | 12,1 ± 1,03                                 |
| <b>Spojina <u>10</u></b><br> | 1,47                 | 10,0  | 0,38                 | 1,47 ± 0,38                                 |

**Spojina 11**

|      |      |      |             |
|------|------|------|-------------|
| 2,94 | 3,96 | 0,23 | 2,94 ± 0,23 |
|------|------|------|-------------|