

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA PETROVIČ
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA PETROVIČ

**VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI PRI IZBRANIH
RODANINIH Z METODO REDUKCIJE 2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZILA IN
DEOKSIRIBOZNIM TESTOM**

**EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE SELECTED
RHODANINES WITH A REDUCTION METHOD OF 2,2-DIPHENYL-1-
PICRYLHYDRAZYL AND DEOXYRIBOSE ASSAY**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2017

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

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorjuizr. prof. dr. Janezu Mravljaku za pomoč, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi najbližjim za vso podporo na moji študijski poti.

Izjava

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

Kristina Petrovič

Predsednica komisije:izr. prof. dr. Petra Kocbek

Članica komisije: doc. dr. Tanja Gmeiner

Mentor:izr. prof. dr. Janez Mravljak

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	II
POVZETEK	III
1. UVOD.....	1
1.1 RADIKALI IN REAKTIVNE ZVRSTI.....	1
1.2 OKSIDATIVNI STRES.....	4
1.3 ANTIOKSIDANTI.....	5
1.4 RODANINI.....	10
1.5 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI.....	10
2. NAMEN IN NAČRT DELA.....	14
2.1 Test redukcije DPPH.....	14
2.2 Deoksiribozni test.....	14
3. MATERIALI, METODE IN EKSPERIMENTALNO DELO.....	15
3.1 Topila in reagenti	15
3.2 Aparature, laboratorijska oprema in pribor	17
3.3 Programska oprema.....	17
3.4 Analizne metode	18
3.5 EKSPERIMENTALNO DELO.....	19
3.5.1 Vrednotenje antioksidativnih lastnosti z DPPH testom.....	19
3.5.2 Preverjanje nastanka novih aduktov s TLC	21
3.5.3 Določanje novonastalih aduktov z masno spektrometrijo	21
3.5.4 Deoksiribozni test	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1 Rezultati testa DPPH in določitev vrednosti EC ₅₀ proučevanih rodaninov.....	25
4.2 Rezultati TLC in MS	27
4.3 Rezultati deoksiriboznega testa.....	30
4.4 RAZPRAVA.....	32
4.4.1 Komentar rezultatov testa DPPH in vrednosti EC ₅₀ za testirane rodanine	32
4.4.2 Komentar razvitih TLC ploščic in MS	34
4.4.3 Komentar deoksiriboznega testa.....	35
5. SKLEP.....	37
6. LITERATURA.....	38
7. PRILOGE.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz ravnotežja reaktivnih zvrsti in antioksidantov, ter nastanka oksidativnega in antioksidativnega stresa.	6
Slika 2: Struktura rodaninskega 5-členskega obroča s tiazolidinonskim jedrom.	10
Slika 3: Radikal DPPH• sprejme H-atom in se reducira v obliko DPPH-H.	12
Slika 4: Mikrotitrsko ploščica z različnimi koncentracijami vzorca UL-AGP-99 po inkubaciji 90 min. Koncentracija narašča navzdol; od vrste vdolbinic B do H.	20
Slika 5: Primer mikrotitrsko ploščice v končni točki za vzorce AM-260, AM-261 in AM-262.	24
Slika 6: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 1.	25
Slika 7: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 12.	26
Slika 8: TLC ploščici z nanešenim DPPH, reakcijsko zmesjo in spojino 1, ter struktura novonastale spojine.	27
Slika 9: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino 7, ter struktura novonastale spojine.	28
Slika 10: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino 8, ter struktura novonastalih dveh spojin.	28
Slika 11: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino 9, ter struktura novonastale spojine.	29
Slika 12: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino 10, ter struktura novonastale spojine.	29
Slika 13: Primerjava absorbanca spojine 2 v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.	30
Slika 14: Primerjava absorbanca spojine 6 v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.	30
Slika 15: Primerjava absorbanca spojine 8 v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.	31
Slika 16: Primerjava absorbanca spojine 12 v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.	31
Slika 17: Prikaz vrednosti EC_{50} za spojine 1-11.	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz imen, kemijskih struktur in razdelitev ROS na radikalske in neradikalske zvrsti.	3
Preglednica II: Prikaz oznak, strukture, formule in molekulske mase preizkušanih rodaninov in standarda α -tokoferola.	15
Preglednica III: Volumni vzorcev, raztopine DPPH in metanola na mikrotitrski ploščici.	20
Preglednica IV: Količine soli, ki smo jih potrebovali za pripravo PBS.	21
Preglednica V: Prikaz uporabljenih koncentracij preizkušanih vzorcev.	22
Preglednica VI: Prikaz vrednosti EC_{50} in standardnega odklona SD za vsako spojino posebej.	26

POVZETEK

V naravi in v vsakem živem organizmu vlada približno ravnovesje med reaktivnimi zvrstmi in antioksidanti. V primeru porušenega ravnovesja pride do oksidativnega stresa ter poškodb celičnih lipidov, proteinov in nukleinskih kislin. Poškodbe lahko vodijo v celično smrt in razvoj življenjsko ogrožajočih bolezenskih stanj, kot so rak, avtoimunske bolezni, revmatoidni artritis, pospešeno staranje, katarakta, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni.

Zato je bistvenega pomena odkrivanje novih antioksidantov, proučevanje in razumevanje njihovega delovanja. V kozmetičnih izdelkih se antioksidanti uporabljajo kot učinkovine za zaščito izdelkov pred oksidativnimi razpadnimi procesi ter kot kozmetično aktivne sestavine proti staranju kože. Rodanini imajo širok spekter farmakološkega delovanja, med drugim pa izkazujejo tudi dobro antioksidativno delovanje.

Namen našega diplomskega dela je bil ovrednotiti antioksidativno kapaciteto izbranih derivatov rodaninov s pomočjo DPPH in deoksiriboznega testa. Poleg tega smo izvedli tudi tankoplastno kromatografijo in s pomočjo masne spektrometrije preučili nastanek morebitnih novonastalih produktov. S tem smo dokazali, da se rodanini zaradi svoje strukture obnašajo kot donorji atomov/elektronov, oddajo vodikov atom in se pretvorijo v resonančno stabilizirane radikale. Kolorimetrični test DPPH *in vitro* temelji na redukciji radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila, ki se v prisotnosti antioksidanta reducira in spremeni barvo, kar merimo spektrofotometrično. Antioksidativno delovanje smo določili z izračunom srednjih efektivnih koncentracij EC_{50} . Nižja je vrednost EC_{50} , boljša je antioksidativna kapaciteta spojine, ki je sorazmerna koncentraciji dodanega antioksidanta. Vse preizkušane spojine so se po pričakovanju izkazale za slabše antioksidante kot standard α -tokoferol. Ugotovili smo, da je antioksidativno delovanje odvisno od strukture in funkcionalnih skupin pripetih na derivate rodaninov. Pri deoksiriboznem testu smo dobili nepričakovane rezultate, ter ugotovili, da pri tem testu nekateri derivati rodaninov delujejo prooksidativno ter pospešujejo oksidacijo in razgradnjo deoksiriboze.

Pomembno je zavedanje, da so antioksidanti spojine, ki imajo sposobnost antioksidativnega zaščitnega in prav tako prooksidativnega škodljivega delovanja, odvisno od okoliščin.

Ključne besede: antioksidant, rodanini, test DPPH, deoksiribozni test

ABSTRACT

In nature and in every living organism there is a balance between reactive species and antioxidants. In case of imbalance oxidative stress and damage of cell lipids, proteins and nucleic acids occur. This irregularities can lead to cell death and development of life threatening conditions like cancer, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, accelerated aging, cataracta, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

Therefore it is of vital importance to discover new antioxidants and to study and understand their activity. In cosmetology we use antioxidants as protective substances against oxidative degradation processes and as active anti-aging substances. Rhodanines show wide spectrum of pharmacological activity, among others also antioxidant activity.

The aim of our work was to evaluate total antioxidant capacity of selected rhodanines with two methods: reduction method of DPPH and deoxyribose assay. In addition we used thin-layer chromatography and mass spectrometry to determine potential emergence of new compounds. We confirmed that the rhodanines act as the donors of hydrogens/electrons; they emit hydrogen atom and convert themselves in resonant stable radicals. Colorimetric DPPH method *in vitro* is based on the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, which is in the present of antioxidant reduced and changes colour. We measure the change of colour spectrophotometrically. Antioxidative activity was determined with the calculation of half maximal effective concentration EC_{50} . Lower was the EC_{50} , better was the total antioxidant capacity, which was directly proportional to the concentration of added antioxidant. All of the tested rhodanines were inferior antioxidants to standard α -tocopherol. Our findings point out that the antioxidative activity depends on the chemical structure and functional groups. With deoxyribose assay we made quite unexpected results. We found out that with this method rhodanines act as prooxidants and promote oxidation and deoxyribose degradation.

It is very important to be aware of the antioxidants dual nature. They have the ability of protective antioxidative activity and also negative prooxidative effects.

Key words: antioxidant, rhodanines, DPPH assay, deoxyribose degradation assasy

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
AO	antioksidant
ATP	adenozin trifosfat
cAMP	ciklični adenozinmono fosfat
DCM	diklorometan
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH-H	2,2-difenil-1-pikrilhidrazin
EC ₅₀	50-odstotna efektivna koncentracija
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
GSH	glutation
IR	infrardeče
KI	kozmetični izdelek
LDL	lipoproteini z nizko gostoto
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RS	reaktivne zvrsti
SOD	superoksid dismutaza
TAC	antioksidativna kapaciteta (ang. total antioxidant capacity)
TBA	tiobarbiturna kislina
TCA	trikloroocetna kislina
TLC	tankoplastna kromatografija
UV	ultravijolično
λ	valovna dolžina
2-DR	2-deoksiriboza

1. UVOD

1.1 RADIKALI IN REAKTIVNE ZVRSTI

Po definiciji je radikal atom, ion ali nevtralna spojina z vsaj enim nesparjenim elektronom v zunanji orbitali. Glavna lastnost radikala, ki izvira iz njegove težnje po pridobitvi manjkajočega elektrona, je velika kemična reaktivnost in posledično kratka življenjska doba (μs – ms). Zaradi kratkoživosti so koncentracije radikalov v telesu zelo nizke (območje nmol/L). Radikali nastajajo neprestano v okolici kot tudi v naših lastnih telesih. Nastajajo s homolitsko ali simetrično cepitvijo kovalentne vezi, pri čemer nastane radikalski par. Reakcija homolitske cepitve kovalentne vezi poteka po naslednjem mehanizmu (1):

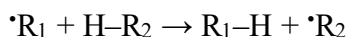


Radikali so nujno potrebni za normalno delovanje organizmov. So pomemben operativni del imunskega sistema, intermediati pri presnovnih procesih, aktivatorji nekaterih encimov, sodelujejo pri prenosu signalov itd. Hkrati pa sodelujejo pri procesu staranja in nastanku mnogih degenerativnih bolezni. Lahko bi rekli, da so za organizem hkrati koristni in škodljivi, zato je bistvenega pomena, da so v ravnovesju z antioksidanti (2).

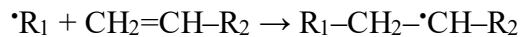
V naših telesih nastajajo zaradi številnih vzrokov. Notranji vzroki za nastanek so avtooksidacije, spontane redoks reakcije, encimske reakcije, radikalske reakcije pri vnetjih in uhajanje elektronov iz dihalne verige. Zunanji vzroki za nastanek radikalov so elektromagnetna sevanja, kamor spadajo UV sevanje, vidna svetloba, IR sevanje ter ionizacijska sevanja. Nastajajo tudi pod vplivom ultrazvoka, kot posledica kajenja in iz ozona (1).

Radikali reagirajo na več različnih načinov. Poznamo pet tipov radikalskih reakcij, ki so zelo hitre in za razliko od encimskih nekontrolirane (1):

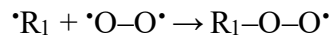
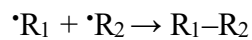
1. Odvzem vodikovega atoma: primarni radikal R_1^{\bullet} odvzame vodikov atom sosednji spojini H-R_2 pri čemer nastane nov stabilnejši radikal R_2^{\bullet} . Na ta način reagirajo le bolj reaktivni in posledično nevarnejši radikali ter se na tak način pretvorijo v manj reaktivne.



2. Adicija radikala na dvojno vez: radikal se adira na dvojno vez alkena tako da nastane nov radikal.



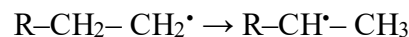
3. Reakcija med dvema radikaloma: iz dveh radikalov nastane nova neradikalska spojina. Nov radikal nastane le v primeru reakcije monoradikala z biradikalom (npr. s kisikom).



4. Reakcija dismutacije: iz dveh molekul radikala nastaneta dva neradikalska produkta.



5. Reakcija izomeracije: nesparjen elektron se premesti znotraj molekule radikala in povzroči nastanek novega stabilnejšega radikala, ki je izomer prvemu.



1.1.1 REAKTIVNE KISI KOVE ZVRSTI

Življenja brez kisika si ne predstavljamo; le-ta prehaja v telo in omogoča dihanje. Hkrati pa pri presnovi kisika nastajajo mnoge reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki imajo sposobnost oksidacije organskih molekul. Reaktivnost kisika je posledica njegove elektronske strukture, kjer sta na zunanji orbitali dva nesparjena elektrona. Kisik v naravi najdemo v tripletnem stanju, kjer sta nesparjena elektrona vsak v svoji molekularni orbitali in imata enako usmerjena spina, zato kisik imenujemo tudi biradikal. Tako stanje je energetsko najnižje, najugodnejše in tudi razlog za življenje na našem planetu kot ga poznamo (3, 4).

ROS delimo na radikalske in neradikalske zvrsti, ki so predstavljene v preglednici I. Tripletni kisik (3O_2) je molekularni kisik v našem ozračju in je sam slabo reaktiven. To pa se spremeni v prisotnosti radikala, ko postane reaktiven oksidant in povzroča oksidativne poškodbe. Singletni kisik (1O_2) je vzbujeno stanje kisikove molekule, ki nastane iz tripletne oblike. Nesparjenemu elektronu se obrne spin, tvori se elektronski par z nasprotnima spinoma, kar povzroči zelo veliko reaktivnost, saj prosta orbitala z lahkoto sprejme nov elektron ali elektronski par. Ozon (O_3), alotrop kisika, nastaja s fotodisociacijo molekularnega kisika in je triatomska molekula. Je močan oksidant in lahko sproži nastanek radikalov. Hidroperoksidi (ROOH) so bolj stabilni od radikalov in hkrati dobri oksidanti. Ob prisotnosti bakrovih in/ali železovih ionov se pretvarjajo

v hidroperoksilne in alkoksilne radikale. Nastali radikali pa nato povzročajo oksidativne poškodbe. Vodikov peroksid (H_2O_2) nastaja kot posledica odstranjevanja superoksidnega aniona ($O_2^{\cdot-}$) in je toksičen. Inaktivira določene encime in se sam preko Fentonove reakcije pretvori v hidroksilni radikal ($\cdot OH$).

Fentonova reakcija:



$\cdot OH$ je eden izmed najreaktivnejših radikalov in nastaja pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka, ozona ali pri reakcijah, kataliziranih s kovinami. Je izjemno reaktiven in deluje neselektivno ter lokalno na mestu nastanka. Pogosto predstavlja začetek lipidne peroksidacije. $O_2^{\cdot-}$ nastaja z redukcijo kisika pri celičnih procesih kot so poraba kisika v dihalni verigi, fagocitoza, avtooksidacije, encimske oksidacije in redukcije... Je slabo reaktiven radikal in ga celica s pomočjo superoksid dismutaze (SOD) hitro pretvori v H_2O_2 in kisik (3).

Preglednica I: Prikaz imen, kemijskih struktur in razdelitev ROS na radikalske in neradikalske zvrsti.

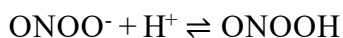
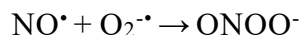
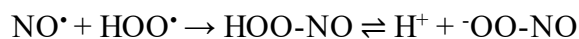
Radikalske zvrsti		Neradikalske zvrsti	
Superoksidni anion	$O_2^{\cdot-}$	Singletni kisik	1O_2
Hidroksilni radikal	$\cdot OH$	*Ozon	O_3
Peroksilni radikal	ROO^{\cdot}	Vodikov peroksid	H_2O_2
Hidroperoksilni radikal	HOO^{\cdot}	Hidroperoksid	$ROOH$
Alkoksilni radikal	RO^{\cdot}	Peroksidi	$ROOR'$
Tripletni kisik	3O_2	Hipoklorna kislina	$HClO$

*Ozon ima delno radikalsko in delno neradikalsko naravo, zato ga lahko uvrščamo tudi med radikale.

1.1.2 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI

Poleg kisika je v zraku, ki nas obdaja in ga dihamo, prisoten tudi dušik. Med reaktivne dušikove zvrsti (RNS) sodita le dva radikala: dušikov oksid ali dušikov monoksid (NO^{\cdot}) in dušikov dioksid (NO_2^{\cdot}). NO^{\cdot} nastaja v celicah kot produkt pri oksidaciji aminokislina L-arginina. Sodeluje pri uravnavanju krvnega tlaka, prenosu signala med nevroni, imunskem, srčno-žilnem in prebavnem sistemu. Dušikov oksid reagira s superoksidnim anionom, tako da nastane peroksinitrit ($ONOO^-$), ki je najmočnejši med oksidanti in zelo nevaren za celice organizma (4). Peroksinitrit v telesu nastaja v zelo majhnih koncentracijah, saj so njegove uničujoče posledice za celice usodne. Nastaja pa v aktiviranih makrofagih in nevtrofilcih in je posledično odgovoren za njihovo citotoksično delovanje (1).

Nastajanje peroksinitrita:



Neradikalske RNS predstavljajo še: alkil-peroksinitriti (ROONO), didušikov trioksid (N₂O₃), didušikov tetraoksid (N₂O₄), dušikova(III) kislina (HNO₂), nitronijev kation (NO₂⁺), nitroksilni anion (NO⁻), nitrozilni kation (NO⁺) (7).

1.2 OKSIDATIVNI STRES

V vsakem zdravem organizmu vlada približno ravnovesje med reaktivnimi zvrstmi (RS) in antioksidanti (AO), ki pa ni popolnoma stabilno. AO ves čas nadzorujejo raven RS in vzdržujejo njihovo nizko vsebnost, s čimer je omogočeno redoks signaliziranje. Kadar je to ravnotežje porušeno, govorimo o oksidativnem stresu. Izraz je prvi uporabil Sies leta 1985 in ga definiral kot motnjo v prooksidativnem-antioksidativnem ravnovesju v korist prooksidantov, kar vodi do morebitnih poškodb. Do presežka RS in posledično oksidativnega stresa pride zaradi zmanjšane antioksidativne zaščite in/ali povečane tvorbe RS (5,6). Do znižanega nivoja AO pride zaradi pomanjkanja vitaminov, mineralov ter esencialnih aminokislin v prehrani ali zaradi mutacij v genih za encime -AO. Do povečane tvorbe RS pride zaradi povečane izpostavitve O₂, toksinom in prekomerne aktivacije sistemov, ki tvorijo RS; na primer pri kroničnem vnetju (11).

Poznamo vrsto dejavnikov oziroma stresorjev, ki povzročajo nastanek oksidativnega stresa. Med zunanje dejavnike spadajo ionizirajoča sevanja, UV območje sončne svetlobe, vdihavanje ozona, kajenje in izpostavljenost cigaretne dimu ter nekatere kemikalije kot so določena zdravila in pesticidi. Notranji dejavniki so kronična vnetja, prekomerne in dolgotrajne fizične obremenitve in vsa druga stanja, ki povzročijo povečano koncentracijo ROS in RNS v telesu. Zavedati se moramo, da se oksidativnemu stresu ne moremo izogniti, vplivamo pa lahko na izpostavljanje stresorjem, ki ga povzročajo (1, 3).

Posledice oksidativnega stresa so odvisne od hitrosti in obsega oksidativnih poškodb. Odražajo se kot povečana proliferacija, adaptacija celic s povečanjem obrambnih mehanizmov, poškodbe celičnih lipidov, DNA, proteinov ter ogljikovih hidratov, celično staranje in celična smrt (5).

Poškodbe lipidov se odražajo kot lipidna peroksidacija, ki je verižna reakcija oksidacije fosfolipidov. Poškodbe proteinov vodijo v strukturne spremembe in izgubo funkcije encimov. Oksidativne poškodbe DNA pa vodijo v mutacije, ki lahko povzročajo različne bolezni. Oksidativni stres lahko pripomore ali vodi v razvoj kroničnih in degenerativnih bolezni kot so rak, avtoimunske bolezni, revmatoidni artritis, pospešeno staranje, katarakta, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni (8). Velik problem oksidativnega stresa v človeškem telesu je, da ga ne zaznamo in da so njegove posledice vidne šele po pojavu poškodb in bolezenskih stanj. Stopnjo in dejansko stanje oksidativnega stresa je zelo težko meriti in določiti. (3).

V nizkih do zmernih koncentracijah RS povzročajo blag in kratkotrajen oksidativni stres, ki ima pozitivne učinke za organizem. Poveča se učinkovitost obrambnih ter popravljalnih mehanizmov in preko redoks signaliziranja se zviša raven encimov za popravilo DNA. Blag oksidativni stres vodi v porast koncentracije endogenih AO (11).

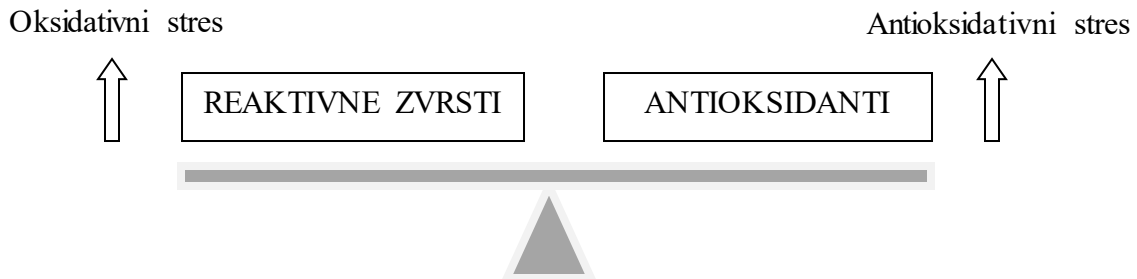
1.3 ANTIOKSIDANTI

Po definiciji je AO vsaka snov, ki prepreči ali upočasni oksidacijo tarčnih molekul. S tem zaščiti proteine, lipide in molekule DNA pred oksidativnimi poškodbami. Glavne naloge AO so torej zmanjševanje oksidativnega stresa, DNA mutacij, malignih transformacij in drugih poškodb celic (9).

S pojavljanjem kisika na Zemlji, ki je nujno potreben za življenje, je prišlo do pojava oksidacij. Te so bile za organizme sprva usodne, kasneje pa so ti razvili obrambni sistem AO, ki vzdržujejo nizek nivo spontanih oksidacij. Delujejo tako, da reducirajo oksidante, preprečujejo širjenje verižnih oksidacij ali vežejo ione kovin, ki lahko sodelujejo v Fentonovi reakciji. Kemijsko so AO reducenti, ki nudijo elektron ali vodikov atom. Reagirajo z radikali in se s tem sami pretvorijo v stabilen radikal, ki se lahko regenerira v AO (1).

V telesu velja ravnotežje med RS in AO, ki omogoča redoks signaliziranje. Ko se ravnotežje premakne na stran RS, pride do oksidativnega stresa (slika 1). Do tega pride zaradi zmanjšane antioksidativne zaščite in/ali zvečane tvorbe reaktivnih zvrsti. Ravnotežje se lahko poruši tudi zaradi prekomernega vnosa AO, pri čemer pride do antioksidativnega stresa in prooksidativnega delovanja AO (11). V študiji iz leta 1996 izvajani na 18.000 udeležencih se

je izkazalo, da se je smrtnost skupine, ki je 18 mesecev prejela AO retinol in β -karoten v višjih odmerkih, povečala za 17% v primerjavi s kontrolno skupino. Porast raka na pljučih pri omenjeni skupini pa je bila kar 28% višja. Zato je potrebno AO v obliki prehranskih dopolnil jemati z veliko premissljenostjo (12).



Slika 1: Prikaz ravnotežja RS in AO, ter nastanka oksidativnega in antioksidativnega stresa.

AO v telesu so pogosto obnovljivi in delujejo v obliki zelo učinkovitega, kompleksnega mrežnega sistema. Povezani so v mrežo medsebojno odvisnih redoks spojin, ki delujejo sinergistično in se med seboj regenerirajo. Vitamin C in ubikinol reducirata tokoferilni radikal, nastale radikale pa nato reducira lipojska kislina ali glutation (GSH), medtem ko NAD(P)H reducira disulfide. Velika prednost takšnega sistema je, da so potrebne nizke koncentracije AO za vzdrževanje ravnovesja in da obramba pred reaktivnimi zvrstmi sloni na številnih različnih molekulah. Slabost je lahko pomanjkanje glavnega vira energije NAD(P)H, ki vzdržuje mrežo AO (1).

Najnovejše raziskave ugotavljajo pozitivne učinke AO pri zdravljenju sladkorne bolezni, raka, nevrodegenerativnih in kardiovaskularnih bolezni, infekcij in vnetij. Predstavljajo zelo pomemben del človeške prehrane in ohranjajo splošno zdravje telesa. Pomembni so v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji med drugim kot podaljševalci roka uporabnosti izdelkov (13).

1.3.1 Delitev antioksidantov

AO so izjemno obsežna in heterogena skupina spojin, zato jih delimo na mnogo različnih načinov.

- Glede na topnost jih delimo na hidrofilne, lipofilne in amfifilne. Hidrofilni AO delujejo v vodnih okoljih celice in se raztapljajo v hidrofilnih topilih. Askorbinska kislina ali vitamin C je najpomembnejši vodotopni AO in sodeluje v Krebsovem ciklu, ki poteka v mitohondrijih. Je kofaktor vsaj 8 encimov in sodeluje pri sintezi kolagena, metabolizmu tirozina itd. Lipofilni AO se nahajajo predvsem v celičnih membranah ter lipoproteinih in zavirajo lipidno peroksidacijo. Najpomembnejši AO med lipofilnimi je vitamin E, v to skupino pa spadajo še koencim Q₁₀, flavonoidi in karotenoidi. Amfifilni AO kot sta GSH in lipojska kislina, sta topna tako v vodi kot tudi v maščobah (14).

- Glede na izvor jih delimo na endogene in eksogene. Endogeni AO nastajajo v telesu, njihova sinteza se s starostjo zmanjšuje. Delimo jih na encimske in neencimske. Najpomembnejši encimski AO so superoskid dismutaze (SOD), katalaze in peroksidaze. Te so najučinkovitejši, saj se njihova koncentracija prilagaja potrebam antioksidativne zaščite telesa. SOD je pomembna, ker je edini poznan encim, ki reagira s O₂^{•-} (14). Neencimski endogeni AO so GSH, koencim Q₁₀, lipojska kislina, sečna kislina, melatonin, bilirubin... Eksogenih AO telo ne zmore sintetizirati, nujno potrebni pa so za delovanje, zato jih moramo vnašati s hrano ali prehranskimi dopolnili. Najpomembnejši predstavniki so vitamin E, vitamin C, karotenoidi, polifenoli in flavonoidi (1).

- Glede na učinkovitost delovanja AO delimo po naslednjem vrstnem redu. Najučinkovitejši so encimi (SOD, katalaza), sledijo jim blažilci šoka (albumin, transferin, urat), esencialne spojine (vitamin C in E, aminokisliline, peptidi, koencim Q₁₀, lipojska kislina, skvalen) in ostali (karotenoidi in flavonoidi) (1).

- Glede na različno kemijsko strukturo AO delimo na aminokisliline, kot sta cistein in citrulin, fenole in kinone katerih glavni predstavniki so klorogenska kislina pridobljena iz kave, resveratrol iz grozdja ter ubikinon in ubikinol, flavonoide, ki jih najdemo v sadju in zelenjavi, karotenoide, ki se nahajajo v oranžno-rdečem sadju in zelenjavi, organske kisliline kot so citronska kislina v limoni, fitinska kislina v sezamu in lipojska kislina, peptide in encime kamor spadajo GSH, karnozin, SOD in peroksidaze (10).

- Glede na uporabo v kozmetiki jih delimo na tehnične AO in kozmetično aktivne sestavine (KAS).

1.3.2 Antioksidanti v kozmetiki

V preteklih 25 letih so AO postali izjemno popularni v prehrabni kot tudi v kozmetični industriji. AO ščitijo celice pred poškodbami z radikali in s tem sodelujejo pri preprečevanju nastanka različnih bolezni, med drugim tudi raka in upočasnjujejo proces staranja, ki je delno povzročen s strani oksidativnih procesov (15).

V kozmetičnih izdelkih (KI) jih uporabljamo z dvema različnima namenoma: za zaščito oksidativno občutljivih sestavin v izdelkih in zaščito kože pred oksidacijskimi procesi.

i). Tehnični antioksidanti

Tehnične AO, kot jih imenujemo, uporabljamo kot pomožne snovi v farmacevtski, prehrabni in kozmetični industriji. Delujejo kot stabilizatorji in inhibitorji oksidacije. Oksidacija je naraven proces, ki poteka ves čas v prisotnosti kisika. Oksidativni razpad v KI povzroči razpad sestavin izdelka, spremembe v barvi in vonju ter tvorbo novih potencialno nevarnih in toksičnih produktov. Oksidacijo pospeši izpostavljanje svetlobi, toploti, vlagi in vsebnost kovinskih ionov, žarkih maščob in prostih maščobnih kislin. Posebno pozornost moramo nameniti izdelkom z vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin. Saj te sčasoma postanejo žarke, imajo neprijeten vonj in proizvajajo koži škodljive produkte (14, 20).

V KI najpogosteje dodajamo kombinacije AO, ki skupaj delujejo sinergistično. S tem povečamo učinkovitost in zmanjšamo koncentracije posameznih AO (20). V KI uporabljamo prave AO, ki inaktivirajo radikale tako, da se sami spremenijo v stabilnejši radikal, stabilizatorje vodikovega peroksida, ki preprečujejo nastanek radikalov iz H_2O_2 , sinergiste, ki povečujejo učinkovitost AO kot sta citronska in askorbinska kislina in kelatorje kot je EDTA. Med tehnične AO spadajo tokoferoli, butilhidroksianizol (BHA), dibutilhidroksitoluen (BHT), butilhidrokinon (TBHQ), alkil galati, itd. (16).

ii). Antioksidanti kot kozmetično aktivne sestavine

AO so v kozmetiki najbolj znani kot "anti-aging" učinkovine oziroma sestavine KI proti staranju kože. Staranje je posledica intrinzičnih ali notranjih dejavnikov in ekstrinzičnih ali zunanjih dejavnikov. Radikali nastajajo pod vplivom obeh vrst dejavnikov. Produkcija radikalov se z leti

veča, medtem ko vsebnost naravno prisotnih AO v koži upada. Zato je smiselno topikalno nanašanje AO, ki ponovno vzpostavijo ravnovesje (17). AO upočasnjujejo staranje kože in izboljšujejo že vidne posledice staranja na koži kot so gube, povešena koža, zmanjšana elastičnost, hiper- in hipo-pigmentacije itd. Zavedati pa se moramo, da AO niso čudežne učinkovine, ki bi zdravile in v celoti odpravile že nastale poškodbe (18).

Pri vgrajevanju AO v KI moramo zagotoviti, da le-ti delujejo na želenih mestih v koži. Zagotoviti moramo, da se absorbirajo v kožo, dosežejo ciljno tkivo v aktivni obliki in tam delujejo do želenega učinka. Upoštevati moramo velikost molekule AO, ki ne sme biti večja od 500 Da in topnost AO. Lipofilni delujejo v membranah in lipidnih predelih celic, hidrofilni v vodnem okolju celic (15).

Trenutno je na trgu že kar nekaj spojin, ki jih v kozmetičnih formulacijah uporabljamo kot spojine z antioksidativnim delovanjem:

- **α -tokoferol** je eden izmed osmih izomernih oblik vitamina E in velja za najpomembnejši lipofilni vitamin, saj uspešno zavira lipidno peroksidacijo. Topikalno nanešen izkazuje fotoprotektivno delovanje, s tem da zmanjša UVB inducirane poškodbe in inhibira fotokarcinogenezo (17). Uporabljata se estra sukcinat in acetat, ki imata izboljšano stabilnost, a je za antioksidativno delovanje najprej potrebna hidroliza estra (19). Znan je sinergizem med vitaminom E in C, saj se α -tokoferol v reakciji z radikalom oksidira do tokoferilnega radikala, ki ga vitamin C nato regenerira (20).

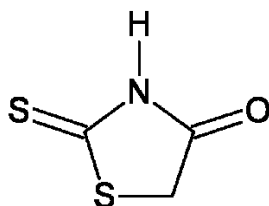
- **askorbinska kislina oz. vitamin C** je najpomembnejši vodotopen AO. Zaradi izboljšane stabilnosti ga uporabljamo v obliki derivatov kot so askorbil palmitat (ester), askorbil fosfat (sol) in askorbil glukozid, ki se metabolizirajo do askorbinske kisline. Vitamin C deluje kot kofaktor encimov pri sintezi kolagena, ščiti pred UV induciranimi radikali, ima posvetlitveni učinek, saj inhibira tirozinazo in deluje kot protivnetno sredstvo (18, 19).

- **ubikinon oz. koencim Q₁₀** je endogen AO, ki nastaja v telesu, v mitohondrijih in je pri dihalni verigi nujno potreben za nastanek ATP. Sodeluje pri antioksidativni obrambi kože, njegova prisotnost v koži pa z leti upada, zato je smiselno, da ga v starosti nadomeščamo. Topikalno nanešen dokazano penetrira v plast živih celic v koži, zmanjša globino gub in ščiti pred oksidativnimi poškodbami DNA induciranimi z ultravijolično svetlobo. Upočasni izgubo hialuronske kisline in tako zmanjša znake staranja (18).

- Med drugim za antioksidativno delovanje v KI uporabljamo karotenoid **likopen**, **resveratrol**, ki ga najdemo v rdečem grozdju, **niacinamid oz. vitamin B₃** najden v zelenolistnati zelenjavi, **polifenolne katehine** iz zelenega čaja, **fenole** iz granatnega jabolka in še mnoge druge.

1.4 RODANINI

Rodanini so derivati heterocikla tiazolidinona (slika 2). Izkazujejo širok spekter farmakoloških učinkovin. Nekateri derivati (npr. epalrestat) se uporabljajo kot antidiabetiki, za zdravljenje sladkorne bolezni tipa II. Njihova uporaba v farmaciji je omejena zaradi slabe topnosti. Izkazujejo protibakterijsko, protiglivično, protivnetno, pesticidno, protihipertenzijsko in protineoplastično aktivnost. Spodbujajo tvorbo paratiroidnega hormona cAMP in bi tako lahko bili uporabni za zdravljenje revmatoidnega artritisa, osteoartritisa in degenerativnega artritisa. Najnovejše študije so pokazale, da so arilalkiliden rodanini učinkoviti inhibitorji serinskih proteaz in bi lahko bili učinkoviti v boju proti virusu hepatitisa C. Derivati so zanimivi kot potencialne učinkovine v zdravljenju Afriške spalne bolezni. Nekateri derivati delujejo kot zaviralci encima tirozinaze in onkolitične proteaze (21). Kljub vedno večji rezistenci bakterij na antibiotike, derivati rodaninov izkazujejo dobre protibakterijske učinke proti gram pozitivnim bakterijam (22). Derivati rodaninov so tudi potencialne učinkovine pri zgodnji diagnozi Alzheimerjeve bolezni, saj se vežejo s tau proteini v možganih, ki so pokazatelji stopnje demence (23).



Slika 2: Struktura rodaninskega 5-členskega obroča s tiazolidinonskim jedrom.

1.5 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

Odkrivanje pozitivnih učinkov AO na zdravje se večja in s tem se večja tudi potreba po testih ocenjevanja učinkovitosti. AO vrednotimo s parametrom antioksidativne kapacitete (TAC = ang. *total antioxidant capacity*), ki nam pove v kakšni meri AO ščiti organizem pred poškodbami oksidativnega stresa. Za merjenje TAC obstaja mnogo uveljavljenih spektrometričnih, elektro-analitičnih metod in kromatografskih tehnik.

- Med spektrometrične metode spadajo ABTS metoda (ang. *radical cation decolorization assay*), zmožnost AO za redukcijo železa ali FRAP (ang. *ferric reducing antioxidant power*), merjenje kapacitete absorpcije kisikovih radikalov ali ORAC (ang. *oxygen radical absorption capacity*), TRAP metoda (ang. *total peroxy radical trapping antioxidant parameter*), CUPRAC metoda oziroma antioksidativna kapaciteta za

redukcijo bakra (ang. *cupric reducing antioxidant capacity*), vrednotenje inhibicije lipidne peroksidacije, fluorometrija in DPPH metoda, ki jo bomo izvajali v eksperimentalnem delu.

- Med elektrokemičnimi metodami sta najbolj razširjeni voltometrija in bi-amperometrija.
- Plinska kromatografija (GC) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) sta kromatografski tehniki, ki se uporabljata za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vsebnosti AO (24).

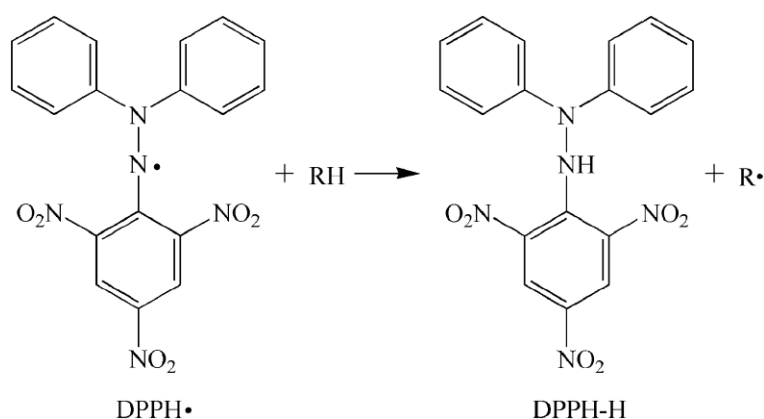
Vse omenjene metode spadajo pod testiranja *in vitro*, pri čemer eksperimente izvajamo v nadzorovanem okolju zunaj živih organizmov. Ker pa AO v telesu mnogokrat delujejo sinergistično, jih je smiselno testirati tudi z metodami *in vivo*. Slednje se izvajajo na živalih (miših, podganah...) z aplikacijo preizkušanih vzorcev in merjenjem AO v krvi in tkivih.

- Med metode *in vivo* spadajo sposobnost plazme za redukcijo železa, določitev reduciranega GSH, aktivnost katalaze, analiza LDL, test glutation reduktaze in lipoproteinski test, ki je med testi *in vivo* najbolj razširjen in uporabljan (25).

1.5.1 Test redukcije DPPH

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil oziroma DPPH je radikal z nesparjenim valenčnim elektronom na dušikovem atomu. Njegovi glavni prednosti sta, da je stabilen in komercialno dostopen. Reagira s spojinami, ki se obnašajo kot donor vodika/elektrona in ima UV-Vis maksimum absorbance v območju 515-520 nm (27). DPPH je stabilen zaradi delokalizacije valenčnega elektrona, saj molekula posledično ne dimerizira, za razliko od večine ostalih radikalov. Delokalizacija je tudi razlog za intenzivno vijolično obarvanje (28).

Metodo DPPH je razvil Blois (1958), ko je dokazal, da radikal DPPH sprejme H-atom, ki ga donira aminokislina cistein (28, 29). Test DPPH je najbolj razširjena kolorimetrična metoda za določanje antioksidativne kapacitete. Prednosti testa so zanesljivost, stabilnost, občutljivost, preprostost, ekonomičnost in hitrost. S testom merimo sposobnost AO za redukcijo radikala DPPH[•]. Redukcijo merimo spektrofotometrično z merjenjem upada absorbance. Reakcijo pa lahko spremljamo tudi z lastnim vidom, saj je DPPH raztopina močno vijolično obarvana, ko pa pride do redukcije, se reakcijska zmes razbarva v rumeno. Boljši AO je tisti, ki donira več H-atomov in s tem reducira več molekul DPPH, to pa se vidi kot manjša vijolična obarvanost. Do spremembe barve pride zaradi redukcije DPPH[•] do neradikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH-H) (29). Omenjena reakcija je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Radikal DPPH• sprejme H-atom in se reducira v obliko DPPH-H.

Iz izmerjenih absorbanc izračunamo efektivno koncentracijo EC_{50} , ki je po definiciji koncentracija AO potrebna za redukcijo 50 % primarnega DPPH v reakcijski zmesi. Nižja kot je vrednost EC_{50} , boljši AO je spojina (27).

Obstaja mnogo protokolov in variacij DPPH testa, ki se razlikujejo v koncentraciji DPPH (22,5-250 μ M), inkubacijskem času (5 min – 1 h), topilu in pH reakcijske zmesi. Vsi ti parametri vplivajo na rezultate, zato so ti med različnimi študijami in laboratoriji mnogokrat različni in neprimerljivi. Prisotnost svetlobe in kisika prav tako vplivata na rezultate. Pozorni moramo biti na previsoko koncentracijo DPPH, saj v tem primeru dobimo absorbanco, ki je izven linearne ga območja spektrofotometričnih meritev. Absorbanca (A) mora biti nižja od 1,0 (23).

Izvajali smo DPPH test prilagojen po Brand-Williamsovi metodi (1995), nekoliko modificiran po Sharma & Bhat (2009) in optimiziran za naše pogoje, laboratorij in opremo (26, 30).

1.5.2 Deoksiribozni test

Metoda razpada 2-deoksiriboze (2-DR) je bila razvita v letu 1980 in je popularna predvsem zaradi preprostosti in ekonomičnosti. Pri testu razpada deoksiriboze ocenjujemo sposobnost AO za zaščito deoksiriboze pred \cdot OH tako, da spektrofotometrično merimo absorbanco razgradnih produktov riboze.

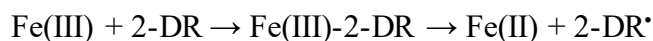
Iz H_2O_2 s Fentonovo reakcijo nastajajo hidroksilni radikali (reakcija 3), ki poškodujejo 2-DR, tako da nastane malondialdehid in podobne spojine. Po dodatku tiobarbiturne kisline (TBA) v reakcijsko zmes nastane obarvan produkt med malondialdehidom in TBA, ki je rumeno-

oranžno do rožnato obarvan. UV-Vis spekter produkta ima vrh pri 532 nm, zato pri tej valovni dolžini merimo absorbanco. Dodan AO reagira s $\cdot\text{OH}$ in s tem zmanjša razgradnjo deoksiriboze. Šibkejša, kot je obarvanje, nižja je A, manj malondialdehida je v končni reakcijski zmesi in boljše antioksidativne lastnosti ima potencialni AO (31).

Glavne reakcije pri deoksiriboznem testu:

1. $\text{Fe(II)} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{O}_2^{\cdot-}$
2. $2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
3. $\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ *Fentonova reakcija*
4. $\cdot\text{OH} + 2\text{-DR} \rightarrow \text{razgradnja } 2\text{-DR} \rightarrow \text{malondialdehid}$

Interferenca Fe(III):



Pomanjkljivost testa je, da ne vemo, ali je reakcija potekla po mehanizmu nastanka $\cdot\text{OH}$ ali pa je razgradnjo deoksiriboze povzročila interferenca železa Fe (III), kot je nakazano v zgornjih reakcijah. Interferenco preprečimo z dodatkom kelatorja EDTA, ki kompleksira železo. Tako zagotovimo, da je razgradnja deoksiriboze posledica $\cdot\text{OH}$ (32).

2. NAMEN IN NAČRT DELA

Vrednotenje antioksidativnih lastnosti potencialnih antioksidantov

Namen diplomskega dela je ovrednotiti antioksidativne lastnosti izbranih rodaninov, ki so potencialni tehnični AO. Moč in učinkovitost njihovega antioksidativnega delovanja bomo preverjali z naslednjima dvema testoma.

2.1 Test redukcije DPPH

Pripravili bomo vzorce izbranih rodaninov ter raztopino DPPH v metanolu in izvedli test redukcije DPPH radikala po Brand-Williamsovi metodi. Redukcijo DPPH radikala bomo spremljali z UV-Vis spektrometrijo z merjenjem absorbance pri $\lambda = 517$ nm. Iz dobljenih rezultatov bomo narisali grafe absorbanc v odvisnosti od naraščajočih koncentracij rodaninov. S pomočjo programa Excel bomo za vsak vzorec izračunali vrednosti EC_{50} in standardno napako SD. Dobljene vrednosti EC_{50} rodaninov bomo primerjali z EC_{50} standarda α -tokoferola in ocenili moč njihovega antioksidativnega delovanja. Glede na to, da so si naši izbrani rodanini strukturno med seboj podobni, bomo poskušali ugotoviti kako struktura molekule in posamezne funkcionalne skupine vplivajo na boljše ali slabše antioksidativno delovanje.

2.2 Deoksiribozni test

Z deoksiriboznim testom bomo preverili, kako izbrane spojine reagirajo s hidroksilnim radikalom. Pri oksidativni razgradnji deoksiriboze s hidroksilnim radikalom nastaja malondialdehid, ki ga lahko spektrofotometrično pomerimo po reakciji s tiobarbiturno kislino. S tem ko bodo naše spojine reagirale s hidroksilnim radikalom, bodo zaščitile in preprečile poškodbe deoksiriboze. Pri manjši poškodbi deoksiriboze bo nastalo manj malondialdehida in obarvanje s tiobarbiturno kislino bo manj intenzivno. Iz izmerjenih absorbanc bomo narisali graf absorbanc v odvisnosti od koncentracije Fe^{2+} ionov in primerjali obseg poškodb, ki so nastale v reakcijski zmesi brez vzorca in z vzorcem.

3. MATERIALI, METODE IN EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 Topila in reagenti

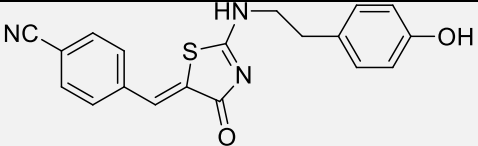
Uporabljali smo topila in reagente naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Merck in Kemika.

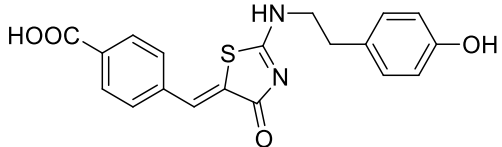
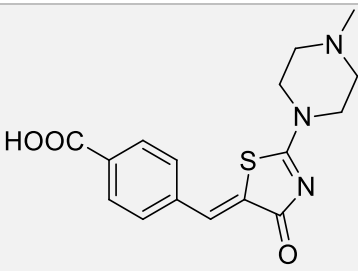
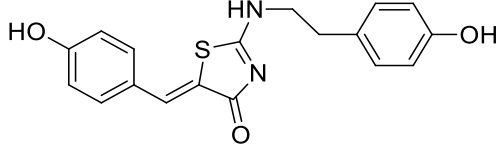
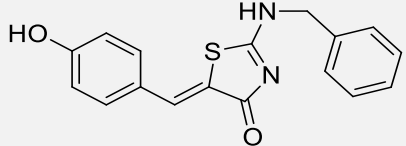
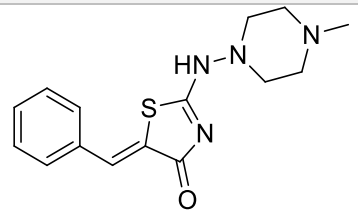
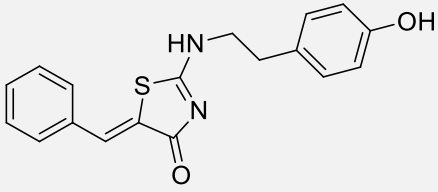
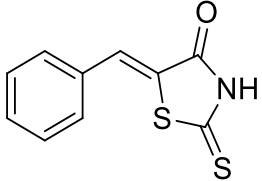
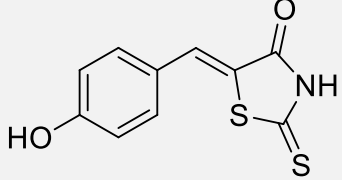
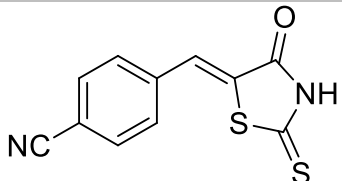
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,32 \text{ g/mol}$), Merck KgaA, Nemčija
- Metanol (MeOH), >99,9% (CH_4O , $MM = 32,04 \text{ g/mol}$), Merck KgaA, Nemčija
- Diklorometan (DCM), >99,8% (CH_2Cl_2 , $MM = 84,93 \text{ g/mol}$), Merck KgaA, Nemčija
- α -tokoferol, sintetičen ($C_{29}H_{50}O_2$, $MM = 430,71 \text{ g/mol}$), Acros Organics
- NaOH, natrijev hidroksid, $MM: 39,997 \text{ g/mol}$, Merck KgaA, Nemčija
- Železov (II) klorid tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $MM = 198,81 \text{ g/mol}$), Sigma-Aldrich, ZDA
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), $MM: 372,24 \text{ g/mol}$, Acros Organics
- 2-deoksi-D-riboza, $MM: 134,13 \text{ g/mol}$, Sigma-Aldrich
- Askorbinska kislina, $MM: 176,12 \text{ g/mol}$, TCI
- 30 % H_2O_2 , vodikov peroksid, $MM: 34,01 \text{ g/mol}$, Merck KgaA, Nemčija
- Tiobarbiturna kislina (TBA), $MM: 144,15 \text{ g/mol}$, Acros Organics
- Trikloroocetna kislina (TCA), $MM: 163,40 \text{ g/mol}$, Kemika

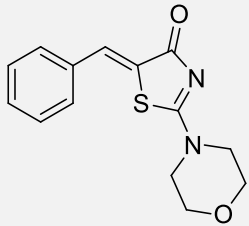
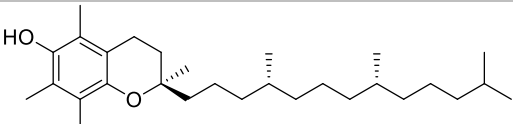
Pri deoksiriboznem testu smo uporabljali Mili-Q deionizirano vodo, ki smo jo pripravili na Fakulteti za farmacijo.

Spojine, ki smo jim izmerili antioksidativno kapaciteto, so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo in so navedene v preglednici II.

Preglednica II: Prikaz oznak, strukture, formule in molekulske mase preizkušanih rodaninov in standarda α -tokoferola.

Številka spojine	Oznaka spojine	Kemijska formula	Molska masa [g/mol]	Kemijska struktura
<u>1</u>	UL-AGP-99	$C_{19}H_{15}N_3O_2S$	349,41	

<u>2</u>	UL-AGP-100	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ S	368,41	
<u>3</u>	UL-AGP-109	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	331,39	
<u>4</u>	UL-AGP-116	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	340,40	
<u>5</u>	UL-AGP-117	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	310,37	
<u>6</u>	UL-AGP-126	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ OS	302,39	
<u>7</u>	UL-AGP-127	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	324,40	
<u>8</u>	AM-260	C ₁₀ H ₇ NOS ₂	221,30	
<u>9</u>	AM-261	C ₁₀ H ₇ NO ₂ S ₂	237,30	
<u>10</u>	AM-262	C ₁₁ H ₆ N ₂ OS ₂	246,31	

<u>11</u>	AM-121	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	274,34	
<u>12</u>	α-tokoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430,71	

3.2 Aparature, laboratorijska oprema in pribor

- Analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245
- Precizna tehtnica: Mettler Toledo PB403
- Polavtomatske pipete: Brand (0,5 – 5 mL), Thermo scientific (100 – 1000 µL)
- Avtomatska pipeta: Biohit
- Mikrotitrna plošča s 96 vdolbinami: Techno Plastic Products
- Ultrazvočna kopel: Sonis 4, Iskra pio d.o.o.
- Vodna kopel Büchi Heating Bath B-490, Büchi
- Magnetno mešalo: IKA
- Rotavapor: Büchi 461 WaterBath
- UV-svetilka: Camag
- Steklovina: čaše, bučke, epruvete, merilni valji, penicilinke

3.3 Programska oprema

Za risanje kemijskih struktur in kemijskih reakcij ter določanje molekularnih mas spojin smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 14.0.

Za obdelavo rezultatov meritev in risanje grafov smo uporabljali program MS Excel 2010. V omenjenem programu smo uredili rezultate v tabele, izračunali vrednosti EC₅₀ ter enačbe umeritvenih krivulj.

3.4 Analizne metode

3.4.1 DPPH test

Antioksidativne lastnosti preiskovanih spojin smo proučevali s testom sposobnosti redukcije DPPH radikala po prilagojeni Brand-Williamsovi metodi (27, 30). Metodo smo optimizirali za naše pogoje, da so bile meritve ponovljive in rezultati primerljivi z literaturo. Za spektrofotometrične meritve absorbanč vzorcev smo uporabljali čitalec Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek). Protokol za meritve smo pripravili v programu GEN5 (BioTek).

3.4.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabili smo kromatografske ploščice z 0,22 mm plastjo silikagela na aluminijastem nosilcu (TLC Silica gel 60 F254, Merck). Ploščice smo obsevali z UV svetilko pri valovni dolžini $\lambda = 254$ nm in detektirali novo nastale produkte. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan in metanol v razmerju 9,5:0,5.

3.4.3 Masna sprektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo, na masnem spektrometru Advion expression^L s pomočjo strokovne sodelavke ga. Damijane Zalar.

3.4.4 Deoksiribozni test

S pomočjo deoksiriboznega testa smo še na drug način vrednotili antioksidativne lastnosti preiskovanih spojin. Metodo smo izvajali po Lopesu (33) in jo prilagodili ter optimizirali za naše pogoje (38, 39). Vzorce smo za meritve pripravili na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinami. Za merjenje absorbanč vzorcev smo uporabljali čitalec Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek). Protokol za meritve smo pripravili v programu GEN5 (BioTek).

3.5 EKSPERIMENTALNO DELO

3.5.1 Vrednotenje antioksidativnih lastnosti z DPPH testom

- Priprava vzorcev in raztopin

Kot topilo za pripravo osnovne raztopine DPPH, vzorcev in standarda α -tokoferola smo izbrali metanol. Pri raztapljanju smo bili pozorni, da smo dobili bistre raztopine. Občasno smo si pomagali s soniciranjem, da smo raztopili celoten topljenec.

Najprej smo pripravili osnovno raztopino DPPH s koncentracijo $700 \mu\text{M}$, tako da smo natančno natehtali $6,90 \text{ mg}$ DPPH in ga raztopili v 25 mL metanola. Z redčenjem smo pripravili raztopino za meritve s koncentracijo $140 \mu\text{M}$. Končna koncentracija raztopine DPPH po mešanju z vzorcem je bila $70 \mu\text{M}$. Osnovno raztopino smo pripravljali vsak dan znova, saj je DPPH v raztopini stabilen le nekaj ur. Ker je DPPH občutljiv na svetlobo in kisik, smo bučko z raztopino hranili zavito v aluminijasto folijo in shranjeno v hladilniku.

Osnovne raztopine vzorcev smo pripravili z natančnim tehtanjem praškastih spojin in raztapljanjem le teh v metanolu. Koncentracije osnovnih raztopin so bile prilagojene pričakovanim antioksidativnim lastnostim. Za spojine, pri katerih smo pričakovali boljšo antioksidativno kapaciteto, smo uporabili nižje koncentracije, za spojine s slabšo kapaciteto pa višje koncentracije. Z redčenjem osnovnih raztopin smo za vsako spojino pripravili najmanj šest vzorcev različnih koncentracij, ki smo jih nato uporabili za meritve.

- Določanje vrednosti EC_{50} proučevanih rodaninov

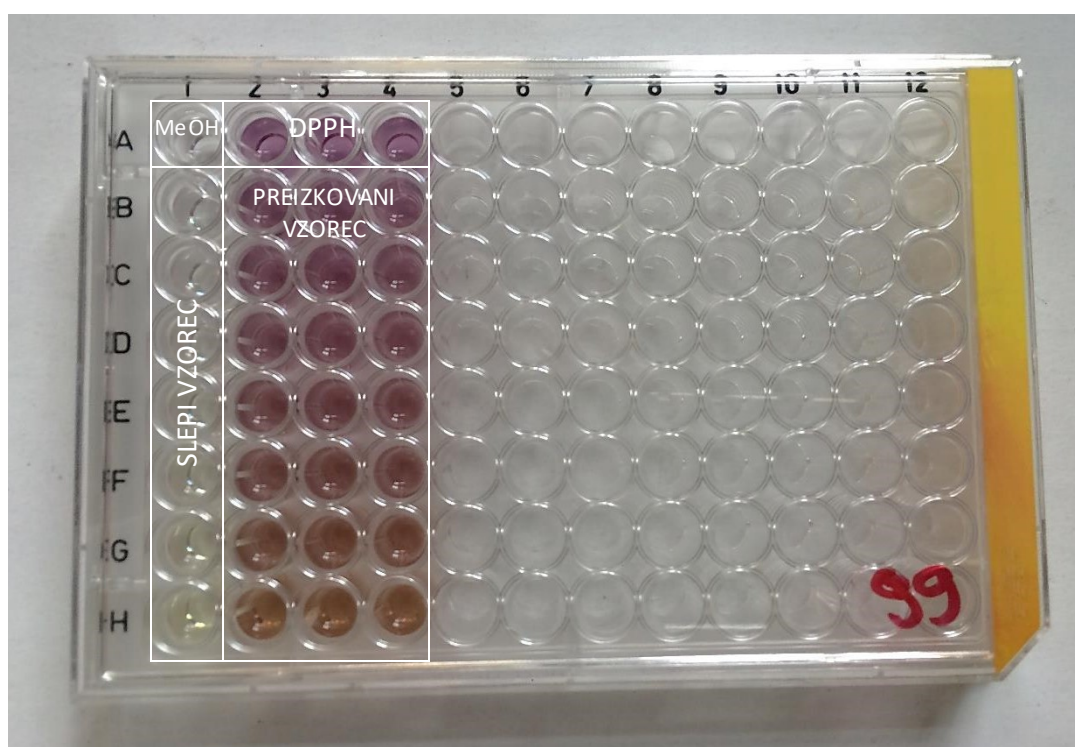
Spojinaam smo določali vrednost EC_{50} , ki je definirana kot koncentracija AO, ki reducira 50% DPPH radikala (27).

Raztopine vzorcev oziroma standarda različnih koncentracij in raztopino reagenta DPPH smo nanegli na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami kot prikazuje slika 4 in preglednica III. Mikrotitrsko ploščica nam omogoča testiranje 3 spojin hkrati v treh paralelkah pri sedmih različnih koncentracijah. Rezultate absorbanc testiranih vzorcev smo podali kot povprečne vrednosti absorbanc treh paralelk. Koncentracije vzorcev smo izbrali tako, da so bile znotraj linearnega območja, kar nam je kasneje olajšalo določanje vrednosti EC_{50} . V kolikor so koncentracije previsoke/prenizke lahko dobimo nelinearno razmerje med koncentracijo AO in

deležem redukcije radikala DPPH. Nanesli smo tudi slepe vzorce brez reagenta DPPH, ki smo jih uporabili za ozadje, saj ga mikrotitrski čitalec ne odšteje samodejno.

Ploščico smo nato inkubirali 90 min v temi pri sobni temperaturi. Z mikrotitrskim čitalcem smo nato izmerili absorbance preiskovanih raztopin pri 517 nm.

Z uporabo programa Excel smo podatke uredili v tabelo, narisali graf absorbance v odvisnosti od koncentracije antioksidana v zmesi. Iz grafa smo dobili enačbo premice, iz katere smo izračunali vrednost EC_{50} . Iz eksperimentalnih točk smo s pomočjo Excelove funkcije STEYX izračunali standardno napako predvidenih y vrednosti za vsak x v regresiji.



Slika 4: Mikrotitrna ploščica z različnimi koncentracijami vzorca UL-AGP-99 po inkubaciji 90 min. Koncentracija vzorca narašča navzdol; od vrste vdolbinic B do H.

Preglednica III: Volumni vzorcev, raztopine DPPH in metanola v posamezni vdolbinici mikrotitrne ploščice.

Oznake na sliki	Sestavine
MeOH (ozadje)	300 μ L metanola
DPPH	150 μ L DPPH + 150 μ L metanola
SLEPI VZOREC	150 μ L vzorca + 150 μ L metanola
PREISKOVANI VZOREC	150 μ L vzorca + 150 μ L DPPH

3.5.2 Preverjanje nastanka novih aduktov s TLC

Reakcijsko zmes smo koncentrirali z rotavaporjem, tako da smo uparili večino topila. Na spodnji del TLC ploščic smo s kapilaro v ravni liniji nanесли raztopino DPPH, koncentrirano reakcijsko zmes in preizkušani vzorec raztopljen v MeOH. Ploščice smo dobro posušili in se prepričali, da je izhlapel ves MeOH. Kromatograme smo razvili v kromatografskih kadičkah z različnimi mobilnimi fazami. Pri vseh vzorcih UL-AGP (1-7) smo uporabili mobilno fazo (MF) DCM : MeOH v razmerju 19 : 1. Pri vseh AM (8-11) vzorcih smo uporabili MF DCM : MeOH v razmerju 50 : 1.

3.5.3 Določanje novonastalih aduktov z masno spektrometrijo

Na razvitih TLC ploščicah smo analizirali novonastale produkte med AO in DPPH. TLC ploščice smo vstavili v vzorčevalnik TLC ploščic in z masnim spektrometrom Advion expression^L analizirali spojine iz izbranih lis na ploščicah. Kot rezultat smo dobili masne spektre spojin na TLC ploščicah.

3.5.4 Deoksiribozni test

- Priprava vzorcev in raztopin

Za meritve smo med drugim potrebovali mili-Q deionizirano vodo in 20 mM fosfatni pufer (PBS) s pH 7,2.

- Mili-Q deionizirano vodo smo pripravili na Fakulteti za farmacijo z aparaturo za pripravo bidestilirane vode Mili-Q Advantage A10, Millipore.
- 20 mM PBS smo pripravili po standardnem postopku z raztapljanjem soli v deionizirani vodi. Potrebne količine soli so prikazane v preglednici IV. pH smo uravnali z raztopino HCl (34).

Preglednica IV: Količine soli, ki smo jih potrebovali za pripravo PBS.

Sol	Koncentracija [mmol/L]	Koncentracija [g/L]
NaCl	274	16
KCl	5,4	0,4
Na ₂ HPO ₄	20	2,84
KH ₂ PO ₄	3,6	0,48

1. REAGENTI, KI SMO JIH PRIPRAVILI VNAPREJ:

- 2-deoksi-D-riboza: $c = 50 \text{ mM}$ raztopljena v PBS. Raztopino smo hranili v hladilniku. Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo potrebovali $V = 640 \mu\text{L}$.
- NaOH: $c = 40 \text{ mM}$ raztopljen v vodi.
- EDTA: $c = 125 \mu\text{M}$ raztopljena v PBS. Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo potrebovali $V = 640 \mu\text{L}$.
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ smo uporabili kot vir Fe^{2+} ionov v PBS. Pripravili smo raztopine različnih koncentracij: 0, 30, 60, 90, 150, 225, 300, 450 μM . Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo potrebovali $V = 640 \mu\text{L}$.

2. REAGENTI, KI SMO JIH PRIPRAVILI VSAK DAN SVEŽE:

- Askorbinska kislina: $c = 1000 \mu\text{M}$ raztopljena v PBS. Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo potrebovali $V = 320 \mu\text{L}$.
- H_2O_2 : $c = 2 \text{ mM}$ raztopljen v vodi. Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo potrebovali $V = 320 \mu\text{L}$.
- Trikloroocetna kislina (TCA): pripravili smo 10 % (m/V) raztopino TCA v vodi. Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo pripravili $V = 5 \text{ mL}$.
- Tiobarbiturna kislina (TBA): pripravili smo 1 % (m/V) raztopino TBA v 40 mM NaOH. Za en vzorec (4 paralelke, 7 različnih koncentracij) smo pripravili $V = 5 \text{ mL}$.

3. VZORCI:

V preglednici V so opisane koncentracije za posamezen vzorec. Ker vzorci pri tako velikih vrednostih, kot je njihov EC_{50} , v vodi niso bili topni, smo koncentracije postopno zmanjševali do te mere, da se je topnjenc popolnoma raztopil.

Preglednica V: Prikaz uporabljenih koncentracij preizkušanih vzorcev.

Spojina	EC_{50} [μM] pri testu DPPH	Koncentracija [μM]	Koncentracija v RZ [μM]*
UL-AGP-99	5507,2 \pm 202,2	14000 (spojina pri taki koncentraciji ni topna)	/
UL-AGP-100	5231,6 \pm 69,0	375	75
UL-AGP-109	7036 \pm 234,5	2500	500
UL-AGP-116	519,0 \pm 13,8	404	80,8
UL-AGP-117	1359 \pm 181	375 (spojina pri taki koncentraciji ni topna)	/

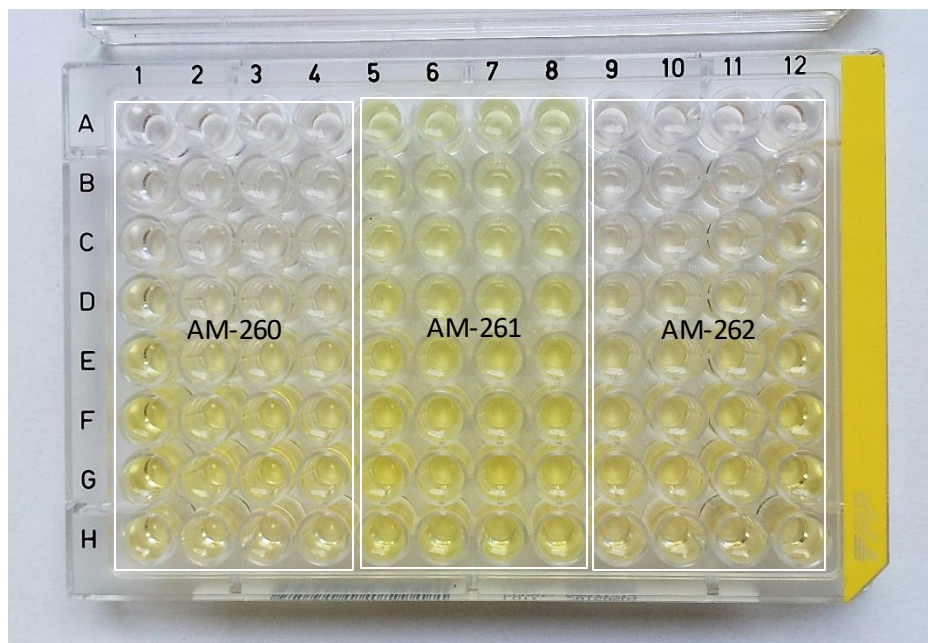
UL-AGP-126	171,4 ± 4,5	800	160
UL-AGP-127	8127,0 ± 105,6	15000 (spojina pri taki koncentraciji ni topna)	/
AM-260	297,9 ± 37,3	750	150
AM-261	288,13 ± 40,14	375	75
AM-262	412,2 ± 109,8	375	75
AM-121	/	/	/
α-tokoferol	11,9 ± 4,6	375	75

*V končni reakcijskih zmesih (RZ) so bile koncentracije AO 5× manjše kot v prvotnih reakcijskih zmesih.

- Izvedba deoksiriboznega testa

Deoksiribozni test smo izvedli na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami v štirih paralelkah, kot prikazuje slika 5, pri sedmih različnih koncentracijah $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Test smo izvedli po naslednjem postopku (39):

1. V vsako vrstico smo odmerili po 20 μL raztopine Fe^{2+} ionov (prva vrstica je bila slepa, torej le PBS, druga s $c = 30 \mu\text{M}$, tretja s $c = 60 \mu\text{M}$, četrta s $c = 90 \mu\text{M}$, peta s $c = 150 \mu\text{M}$, šesta s $c = 225 \mu\text{M}$, sedma s $c = 300 \mu\text{M}$ in osma s $c = 450 \mu\text{M}$).
2. Dodali smo 20 μL raztopine EDTA.
3. Nato smo ploščico inkubirali 45 min v temi pri sobni temperaturi.
4. Dodali smo 20 μL raztopine preiskovanega vzorca – AO.
5. Ploščico smo inkubirali še 30 min v temi pri sobni temperaturi.
6. Dodali smo 20 μL raztopine deoksiriboze, 10 μL raztopine ASC in 10 μL raztopine H_2O_2 v navedenem vrstem redu.
7. Ploščico smo inkubirali 10 min v orbitalnem stresalniku za mikrotitrške ploščice na 37 °C pri 30 obratih na minuto.
8. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 100 μL raztopine TCA in 100 μL raztopine TBA.
9. Ploščico smo inkubirali 15 min na 80 °C.



Slika 5: Primer mikrotitrskje ploščice v končni točki deoksiriboznega testa za vzorce AM-260, AM-261 in AM-262.

- **Spektrofotometrično merjenje razpadnih produktov 2-deoksiriboze**

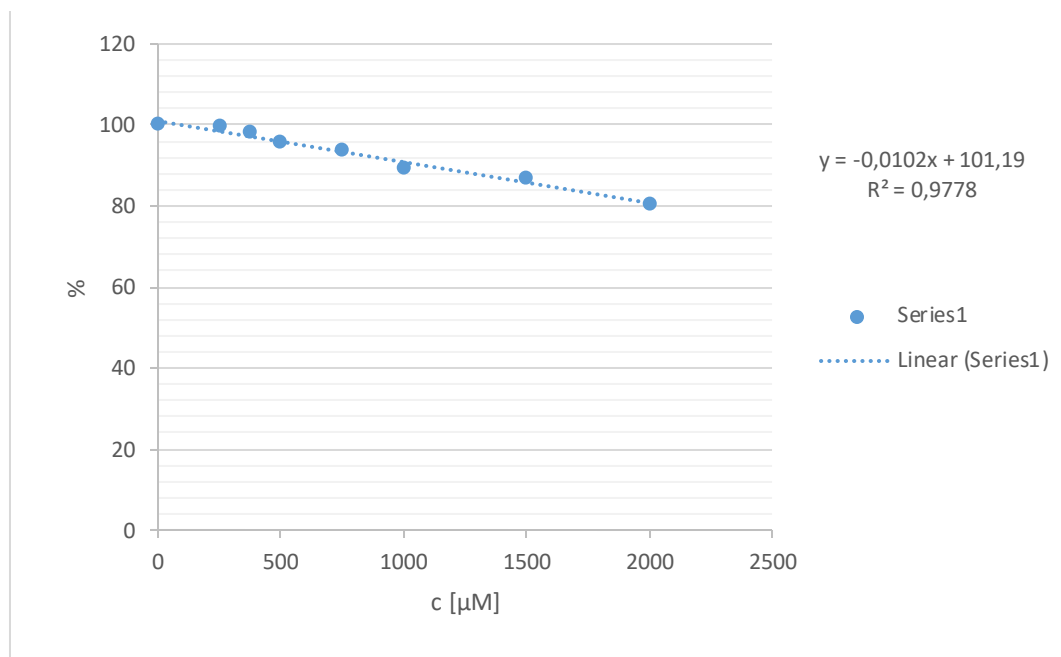
Z mikrotitrskim čitalcem smo izmerili absorbance pri valovnih dolžinah 532 nm in 453 nm, saj ima produkt v UV-Vis spektru dva vrha pri omenjenih valovnih dolžinah. Za vsak vzorec smo v programu Excel narisali graf absorbanc v odvisnosti od koncentracije železa v reakcijski zmesi. S pomočjo grafičnega prikaza smo primerjali vrednosti absorbanc vzorcev, standarda in reakcije referenčnega vzorca brez dodanega AO.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Rezultati testa DPPH in določitev vrednosti EC_{50} proučevanih rodaninov

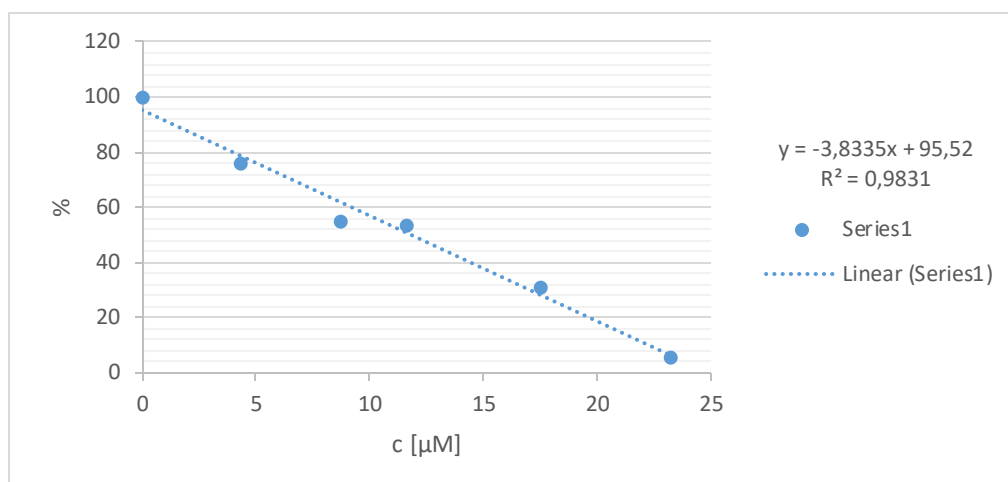
Proučevali in vrednotili smo 10 derivatov rodanina, ki so bili sintetizirani na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Spremljali smo redukcijo radikala DPPH v prisotnosti izbranih rodaninov pri različnih koncentracijah. Pri vseh spojinah smo uporabili 70 μM končno koncentracijo DPPH. Za spojine, za katere smo predvidevali, da bodo dobri AO, smo uporabili nižje koncentracije, saj je potrebno manj AO, za redukcijo polovice molekul DPPH. Spojine, ki naj bi bile slabši AO, smo uporabili v višjih koncentracijah, saj je potrebno več AO za dosego EC_{50} . Za vsako spojino posebej smo narisali graf (sliki 6, 7), ki prikazuje delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojin. Pri izračunu EC_{50} je pomembno, da dobljene točke ležijo linearno čim bolj na premici. Vrednost R^2 , ki se pri vseh grafih giblje blizu 1, nam pove, da je razpršenost rezultatov okoli premice majhna.

- Spojina UL-AGP-99 (1)



Slika 6: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **1**.

- **α-tokoferol (12)**



Slika 7: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **12**.

Vrednost EC_{50} in standardno napako smo izračunali za vsako spojino posebej, rezultati izračunov pa so predstavljeni v preglednici VI.

- Enačba umeritvene premice, ki jo dobimo iz grafa: $y = k \cdot x + n$
- EC_{50} smo izračunali kot: $EC_{50} = (n - 50) / k$
- Standardno napako smo izračunali v Excelu s pomočjo standardne napake predvidene vrednosti y za vsak x v regresiji (funkcija STEYX).
- Nato smo izračunali $EC_{50} - SD$: $EC_{50} - SD = (n - 50 - STEYX) / k$
- Standardni odklon smo izračunali kot: $SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD)$

Preglednica VI: Prikaz vrednosti EC_{50} in standardnega odklona SD za vsako spojino posebej.

Številka spojine	Oznaka spojine	EC_{50} [μM] ± SD
<u>1</u>	UL-AGP-99	5507,2 ± 202,2
<u>2</u>	UL-AGP 100	5231,6 ± 69,0
<u>3</u>	UL-AGP-109	7036 ± 234,5
<u>4</u>	UL-AGP-116	519 ± 13,8
<u>5</u>	UL-AGP-117	1359 ± 181
<u>6</u>	UL-AGP-126	171,4 ± 4,5
<u>7</u>	UL-AGP-127	8127,0 ± 105,6
<u>8</u>	AM-260	297,9 ± 37,3
<u>9</u>	AM-261	288,13 ± 40,14
<u>10</u>	AM-262	412,2 ± 109,8
<u>12</u>	α-tokoferol	11,9 ± 4,6

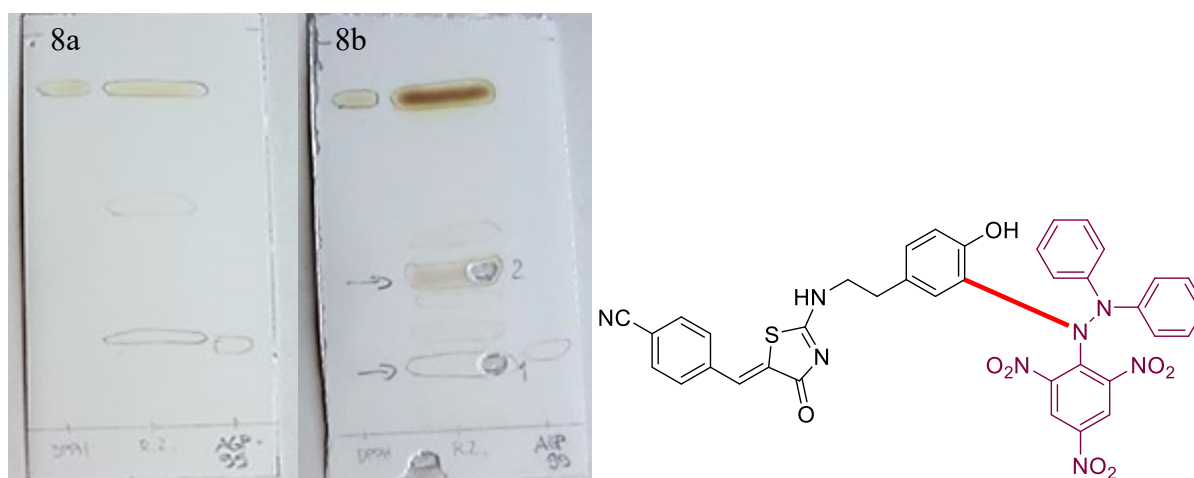
4.2 Rezultati TLC in MS

S TLC smo dosegli ločbo DPPH, izbranega rodanina in morebitnih novonastalih produktov. Nove produkte smo opazili v reakcijskih zmesih DPPH s spojinami **1**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **10**. V ostalih reakcijskih zmesih novih produktov ni bilo opaziti. Ker smo dobili zelo šibko obarvane TLC ploščice in komaj razvidno ločbo komponent, smo reakcijske zmesi koncentrirali z rotavaporjem in dobili rezultate, ki so prikazani na spodnjih slikah 8-12.

Na razvitih TLC ploščicah smo z masno spektrometrijo določili novonastale produkte. Iz masnih spektrov smo razbrali, ali so neznane lise na TLC ploščicah predvideni novi adukti med AO in DPPH. Za vsako spojino posebej smo predhodno narisali predvidene produkte, izračunali predvidene molekulske mase in nato z masno spektrometrijo potrdili ali zanikali njihov obstoj v reakcijski zmesi.

- UL-AGP-99 (**1**)

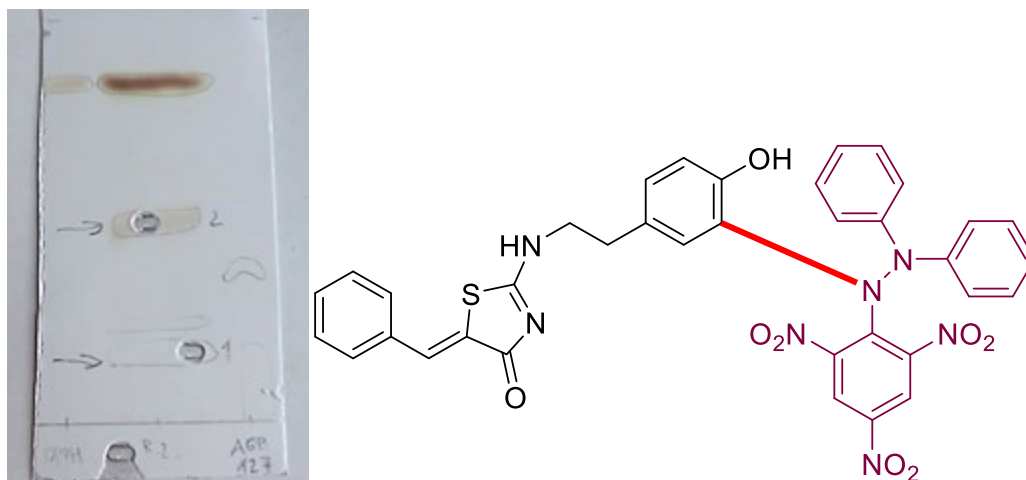
Fotografija 8a prikazuje kromatogram nekoncentrirane reakcijske zmesi, fotografija 8b pa kromatogram koncentrirane. Na fotografiji 8b liso 1 predstavlja spojina **1**, liso 2 pa novonastali adukt, ki je prikazan na sliki desno. Nastala je nova spojina s kemijsko formulo $C_{37}H_{26}N_8O_8S$.



Slika 8: TLC ploščici z nanešenim DPPH, reakcijsko zmesjo in spojino **1**, ter struktura novonastale spojine.

- **UL-AGP-127 (7)**

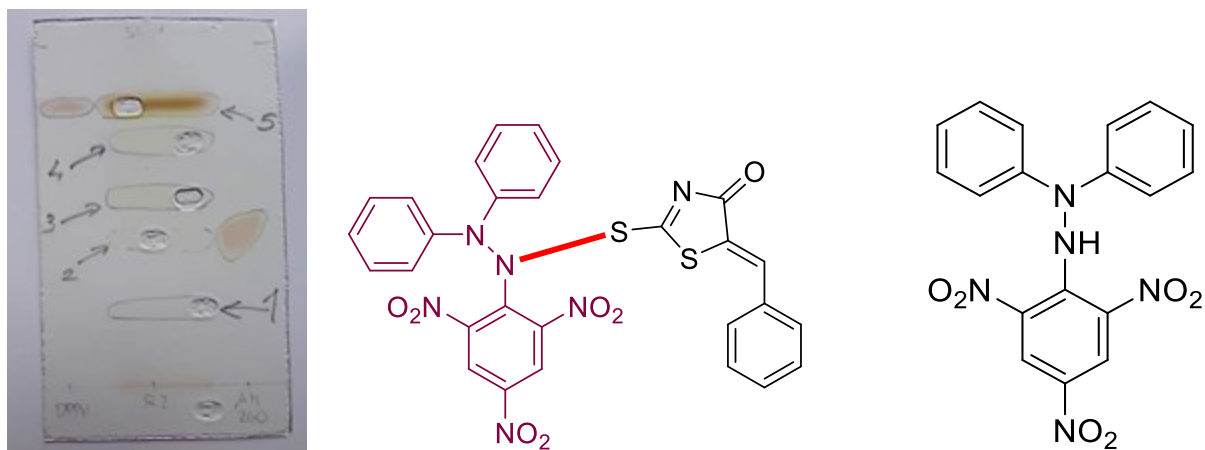
Na sliki 9 liso 2 predstavlja spojina **7**, liso 1 pa novonastala spojina (na sliki desno) s kemijsko formulo $C_{36}H_{27}N_7O_8S$.



Slika 9: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino **7**, ter struktura novonastale spojine.

- **AM-260 (8)**

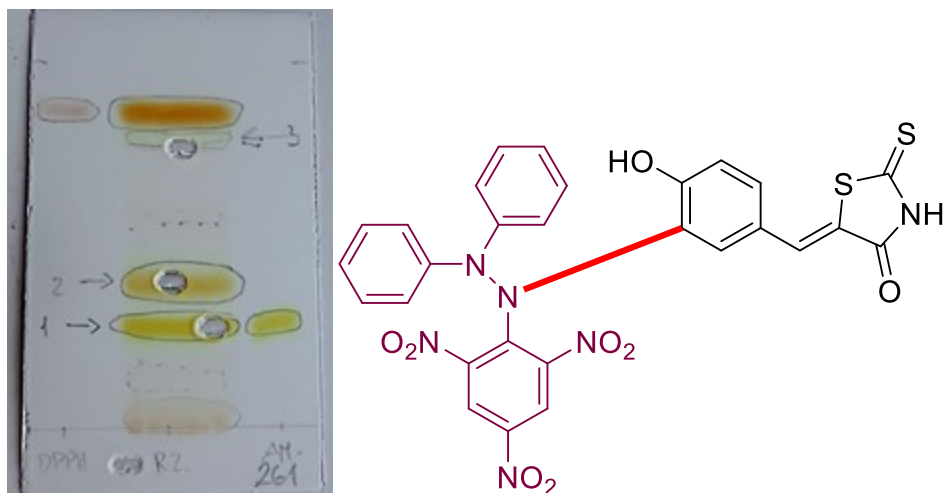
Na sliki 10 liso 2 predstavlja spojina **8**, liso 3 novonastala spojina s kemijsko formulo $C_{28}H_{18}N_6O_7S_2$, lisa 5 je fragment DPPH s formulo $C_{18}H_{13}N_5O_6$, produkta pod lisama 1 in 4 pa sta nam neznan.



Slika 10: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino **8**, ter struktura novonastale spojine in fragmenta DPPH.

- **AM-261 (9)**

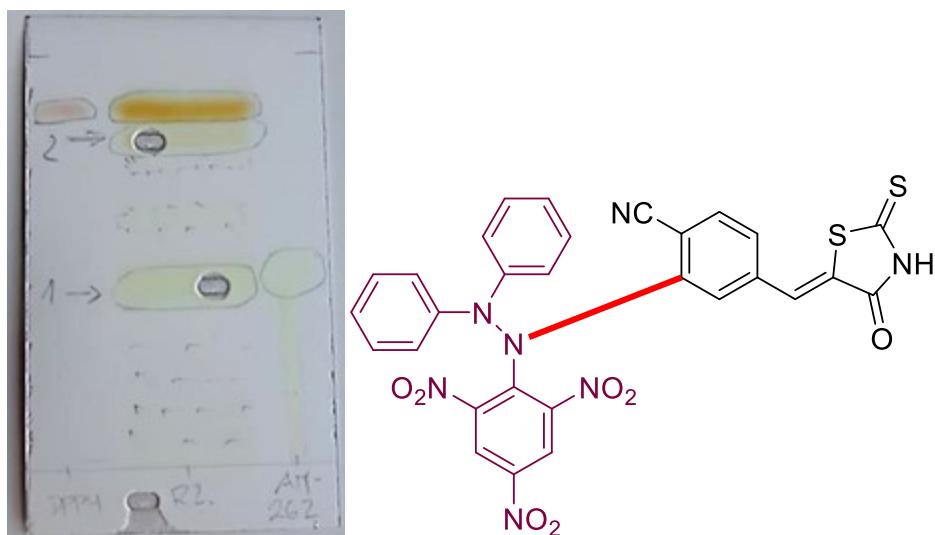
Na sliki 11 liso 1 predstavlja spojina **9**, liso 2 in 3 pa novonastala spojina (na sliki desno) s kemijsko formulo $C_{28}H_{18}N_6O_8S_2$.



Slika 11: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino **9**, ter struktura novonastale spojine.

- **AM-262 (10)**

Na sliki 12 liso 1 predstavlja spojina **10**, liso 2 pa novonastala spojina (na sliki desno) s kemijsko formulo $C_{29}H_{17}N_7O_7S_2$.

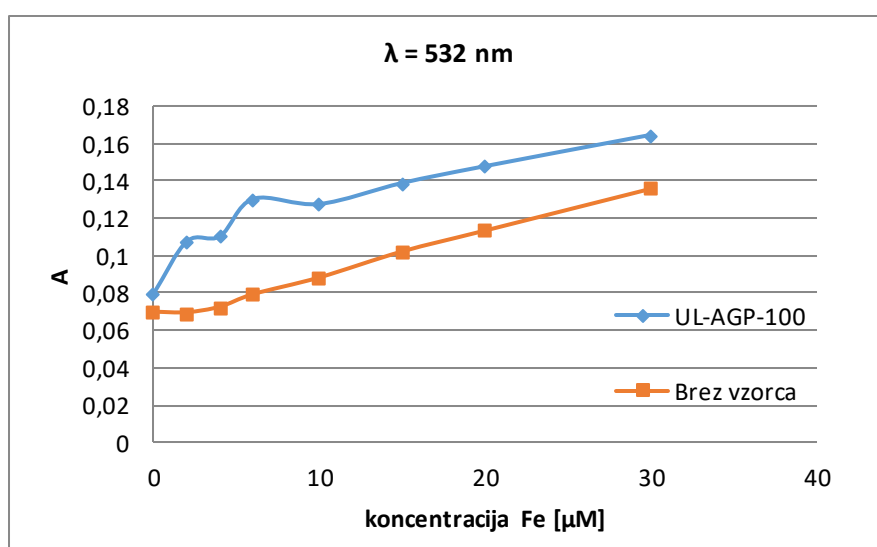


Slika 12: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino **10**, ter struktura novonastale spojine.

4.3 Rezultati deoksiriboznega testa

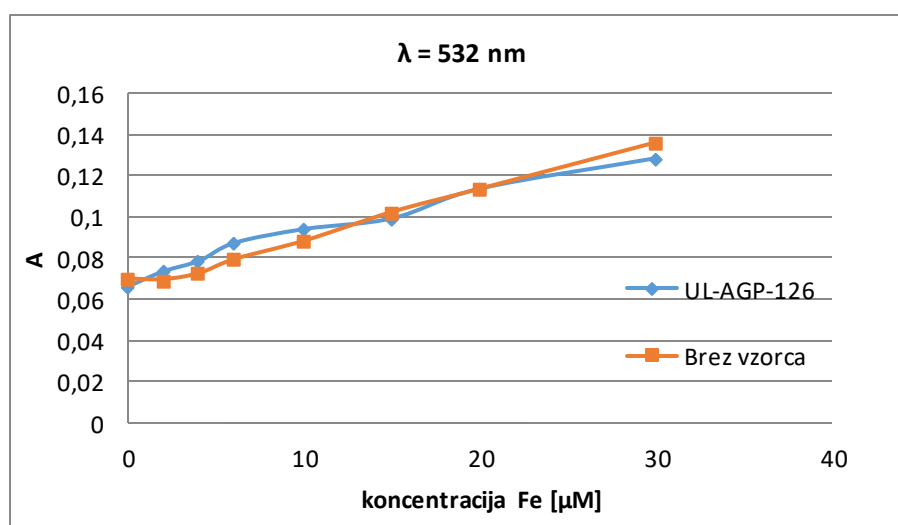
Z deoksiriboznim testom smo preizkušali 7 derivatov rodaninov (2, 3, 4, 6, 8, 9, 10) in α -tokoferol kot standard za primerjavo. Ostali derivati v vodi niso bili topni, zato z njimi nismo izvedli deoksiriboznega testa. Za vsako spojino posebej smo narisali graf absorbance v odvisnosti od koncentracije železa z dodatkom posameznega rodanina in ga primerjali z grafom absorbance v odvisnosti od koncentracije železa brez dodanega rodanina (slike 13-16). Z deoksiriboznim testom smo ugotovili, kako učinkovito izbran rodanin zaščiti 2-DR pred razgradnjo. Absorbance smo vedno merili takoj po inkubaciji.

- UL-AGP-100 (2)



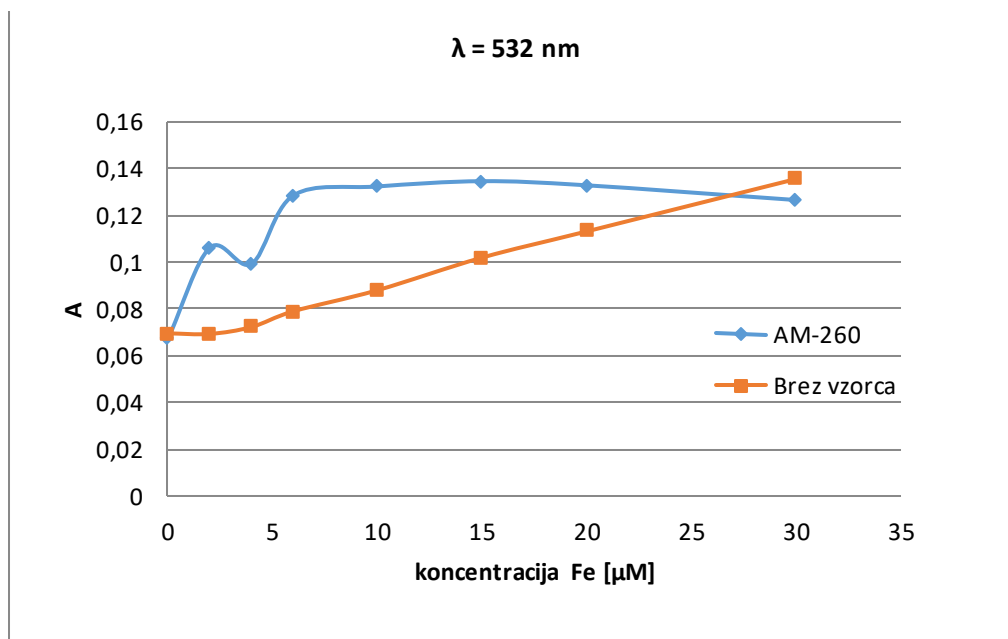
Slika 13: Primerjava absorbance spojine 2 v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm z izbranim rodaninom in brez vzorca.

- UL-AGP-126 (6)



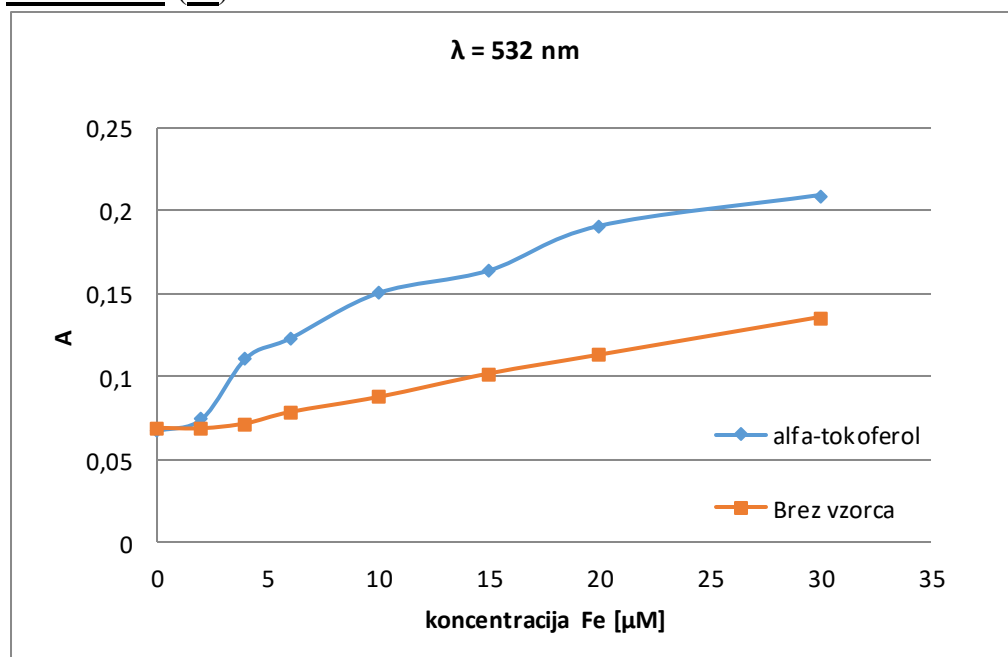
Slika 14: Primerjava absorbance spojine 6 v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm z izbranim rodaninom in brez vzorca.

- **AM-260 (8)**



Slika 15: Primerjava absorbanc spojine **8** v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532 \text{ nm}$ z izbranim rodaninom in brez vzorca.

- **α -tokoferol (12)**

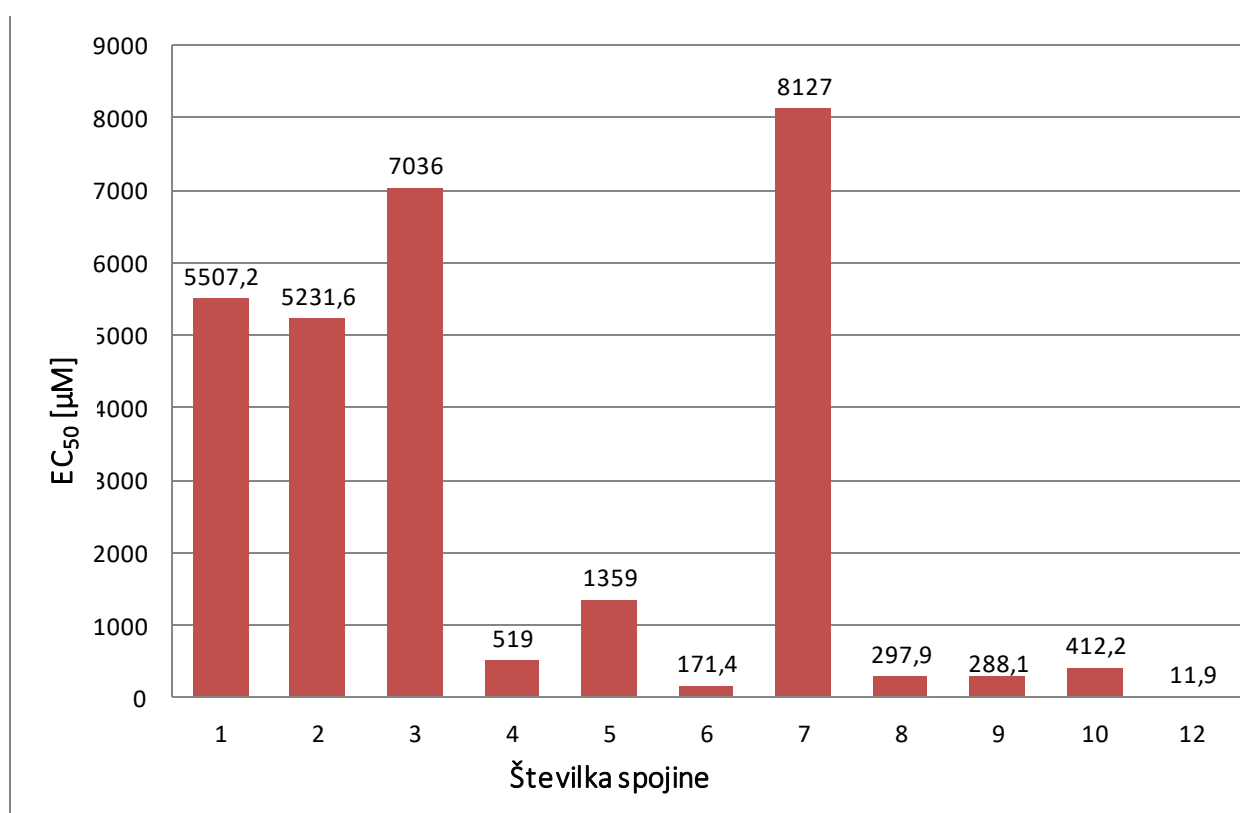


Slika 16: Primerjava absorbanc spojine **12** v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532 \text{ nm}$ z izbranim rodaninom in brez vzorca.

4.4 RAZPRAVA

4.4.1 Komentar rezultatov testa DPPH in vrednosti EC₅₀ za testirane rodanine

Izbranim rodaninom (1–10) smo določili TAC s testom redukcije radikala DPPH in določitvijo ter primerjavo vrednosti EC₅₀, ki smo jih izračunali iz regresijskih premic. Nižja kot je vrednost EC₅₀, boljša je TAC spojine. Opazovali in ugotavljali smo ali se izbrane spojine obnašajo kot AO in kakšen vpliv na TAC ima prisotnost funkcionalnih skupin. Slika 17 prikazuje dobljene vrednosti EC₅₀ za spojine 1-11.



Slika 17: Prikaz vrednosti EC₅₀ za spojine 1-11.

Spojino 12 oziroma α -tokoferol smo preizkušali kot standard in ga uporabili za potrditev ustreznosti in pravilnosti metode. Literarne vrednosti EC₅₀ α -tokoferola se gibljejo med 10 – 20 μ M (35), naša vrednost pa je bila $11,9 \pm 4,6 \mu$ M. α -tokoferol je zelo dober AO, zaradi prisotnosti fenolne skupine, ki se obnaša kot donor vodika ali elektrona (1).

Po pričakovanju se je izkazalo, da imajo preizkušane spojine slabše antioksidativne lastnosti kot α -tokoferol. Sledijo mu v naslednjem vrstnem redu s padajočim antioksidativnim

delovanjem: **6**, **9**, **8**, **10**, **4**, **5**, katerih EC_{50} se giblje med 288 – 1359 μM . Sledijo spojine **2**, **1**, **3**, **7**, ki pa so imele precej višji EC_{50} , med 5231-8127 μM , zato sklepamo, da imajo slabšo TAC ali celo podvomimo v njihovo antioksidativno delovanje, saj je vprašljivo ali bi jih v izdelke lahko vgrajevali v tako visokih koncentracijah. Pri spojini **11** smo pri relativno veliki maksimalni koncentraciji glede na ostale vzorce (1500 μM) kot rezultat dobili nelinearno upadanje absorbance v odvisnosti od koncentracije in na podlagi rezultatov zaključili, da spojina ne izkazuje antioksidativnih lastnosti, zato smo jo že na začetku izločili iz preizkusov. Rodanini so znani kot slabo topne spojine, kar predstavlja glavni problem pri uporabi (21). Za preizkušanje smo uporabili tako visoke koncentracije, ki so bile s pomočjo soniciranja še topne v MeOH. Pozorni smo bili, da se je raztopil ves topljenec in da smo dobili bistre raztopine.

Spojina **6** z $EC_{50} = 171,4 \pm 4,5 \mu\text{M}$, ki se je izmed preizkušenih izkazala za najboljši AO, je po strukturi hidrazin z enim protonom, zato sklepamo, da je to ključna funkcionalna skupina, ki prispeva k dobri TAC. Sledijo **9**, **8** in **10**, ki vse vsebujejo žveplo oziroma tiolno skupino (-SH) na drugem mestu rodaninskega obroča in ta je odgovorna za dobro antioksidativno delovanje vseh treh spojin. To lahko potrdimo s tem, da spojina **11** tiolne skupine nima in zato ne izkazuje AO lastnosti. Antioksidativno delovanje je posledica tautomerije rodaninov, pri čemer se znotraj strukture premika vodikov atom in spreminja se položaj dvojnih vezi. S tautomerijo nastane iz žvepla pripetega na rodaninski obroč z dvojno vezjo -SH skupina, ki je donor H atomov. Spojina **9** v svoji strukturi poleg tiolne skupine vsebuje tudi hidroksilno skupino (-OH) vezano na fenilni obroč, ki se prav tako obnaša kot donor H atomov, zato je **9** z $EC_{50} = 288,13 \pm 40,14 \mu\text{M}$ najboljši AO izmed omenjenih treh (**8**, **9**, **10**). Zanimivo je, da ji spojina **8** tesno sledi z $EC_{50} = 297,9 \pm 37,3 \mu\text{M}$. Ker spojina **8** v svoji strukturi nima hidroksilne skupine sklepamo, da pri redukciji DPPH sodelujejo tudi ostali vodikovi atomi v strukturi rodaninskega derivata. Sledi spojina **10** z nekoliko večjo $EC_{50} = 412,2 \pm 109,8 \mu\text{M}$, kar je posledica ciano skupine (-CN) na benzilidenskem obroču, ki zmanjšuje možnost donacije vodikovega atoma, saj polarizira S-H vez v tautomerni obliki. Spojina **4** z $EC_{50} = 519 \pm 13,8 \mu\text{M}$ je še vedno dokaj dober AO, kar pripisujemo prisotnosti dveh hidroksilnih skupin, ki sta odlična donorja H atomov. Spojina **5** za razliko od **4** vsebuje le eno -OH skupino vezano na fenilni obroč in je že nekoliko slabši AO z $EC_{50} = 1359 \pm 181 \mu\text{M}$. Sledijo spojine **2**, **1**, **3** in **7**, ki pa imajo tako visoke vrednosti EC_{50} , da lahko rečemo, da je njihova TAC majhna in izkazujejo šibke AO lastnosti. Spojini **2** ($EC_{50} = 5231,6 \pm 69,0 \mu\text{M}$) in **1** ($EC_{50} = 5507,2 \pm 202,2 \mu\text{M}$) vsebujeta fenolno -OH skupino, a očitno le-ta ni tako dober donor H atomov kot tista fenolna -OH skupina pripeta na benzilidenskem obroču. Spojina **2** ima na benzilidenski obroč pripeto še karboksilno skupino

(-COOH), ki je proton donor, kar ciano skupina v spojini **1** ni. Sledi spojina **3** z $EC_{50} = 7036 \pm 234,5 \mu\text{M}$, s pripeto -COOH skupino na benzilidenski obroč in spojina **7** z najvišjo vrednostjo $EC_{50} = 8127,0 \pm 105,6 \mu\text{M}$ in pripeto -OH skupino na fenilni obroč, ki je vezan na amino skupini rodanina.

Iz dobljenih vrednosti EC_{50} lahko izvlečemo zaključek, da so določeni derivati rodaninov potencialni AO, zlasti tisti z žveplom na drugem mestu, ki je zaradi tautomerije v ravnatežju s tioilno skupino in tisti s fenolnimi skupinami. Problem pri vgrajevanju v KI je njihova slaba topnost, zlasti v vodnih okoljih, ki pa prevladujejo med izdelki.

4.4.2 Komentar razvitih TLC ploščic in MS

Tankoplastna kromatografija je adsorpcijska kromatografska tehnika, ki se uporablja za kvalitativno ločbo vzorca. Stacionarna faza (SF), v našem primeru silikagel, je vezana na aluminijasto ploščico. Mobilna faza (MF) oziroma mešanica topil nato povzroči, da vzorec potuje in se medtem zaradi različne afinitete do SF ločuje po TLC ploščici (36).

S TLC smo preverjali morebiten nastanek novih aduktov v naših reakcijskih zmesih vzorcev in reagenta DPPH. Nove spojine nastanejo zaradi težnje radikala DPPH po zapolnitvi zunanje orbitale z manjkajočim elektronom na osrednjem dušikovem atomu. Rodanini se zaradi svoje strukture in funkcionalnih skupin obnašajo kot donorji atomov/elektronov, zato oddajo vodikov atom in se pretvorijo v resonančno stabilizirane radikale. Če tak rodaninski radikal reagira z DPPH radikalom, nastane nova kovalentna vez med nesparjenim elektronom na rodaninskem radikal in dušikom na DPPH.

Razvite TLC ploščice smo uporabili za identifikacijo snovi na osnovi molekulske mase z masno spektrometrijo. MS temelji na merjenju razmerja masa/naboj molekul s pomočjo električnega ali magnetnega polja. Rezultat detekcije je masni spekter, s katerim lahko potrdimo prisotnost novonastalih spojin (37).

Novi produkti so nastali v zmesih s spojinami **1**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **10**. V ostalih reakcijskih zmesih novih produktov nismo opazili. Pri spojinah **1**, **4** in **7** se je DPPH najverjetneje vezal na C atom na orto mestu fenoksilnega radikala, ki je nastal z oksidacijo rodaninskega derivata. Pri spojini **8** sklepamo, da se je DPPH radikal povezal s tioilnim radikalom (-S[•]), ki je nastal z oksidacijo

spojine **8**. V zmesih s spojinami **5**, **9** in **10** se je vez tvorila direktno preko rodaninskega skeleta, kar je dokaz, da pri redukciji DPPH sodelujejo vsi vodikovi atomi v strukturi rodaninskega derivata, kar se tudi sklada z našimi ugotovitvami pri testu redukcije DPPH.

Pri izvajanju TLC je kljub skrbnemu delu lahko prišlo do določenih napak. Pozorno smo morali izbrati MF, da je bila ustrezno polarna oziroma nepolarna. V kolikor polarnost MF ni ustrezna, spojine potujejo prehitro ali prepočasi za učinkovito ločbo. Sprva smo izbrali MF DCM : MeOH v razmerju 9:1 a smo po nekaj poskusih ugotovili, da pride do boljše ločbe pri nekoliko manj polarni MF z razmerjem DCM in MeOH 19:1. Do napak je lahko prišlo tudi zaradi neustrezne koncentracije reakcijskih zmesi. Kljub temu, da smo jih koncentrirali z rotavaporjem in nato izvajali TLC, je lahko v zmesih bilo premalo novonastalih produktov za detekcijo. Zato ne moremo s popolno gotovostjo trditi, da v reakcijskih zmesih DPPH in spojin **2**, **3**, **6** in **11** niso nastali adukti z DPPH, le mi jih nismo zaznali.

4.4.3 Komentar deoksiriboznega testa

S pomočjo testa razpada deoksiriboze smo še na drug način vrednotili antioksidativne lastnosti preiskovanih spojin. Proučevali smo sposobnost rodaninov, da reagirajo s hidroksilnim radikalom in s tem zaščitijo deoksiribozo. Pri mešanju Fe^{2+} ionov in H_2O_2 nastanejo hidroksilni radikali, ki poškodujejo deoksiribozo. Pričakovali smo, da bo dodatek AO zmanjšal te poškodbe, saj ta reagira s hidroksilnimi radikali, kar lahko merimo spektrofotometrično preko obarvanja reakcijske zmesi. Manj obarvana naj bi bila zmes (nižja A), boljše antioksidativno delovanje naj bi izkazoval dodan AO. Koncentracije vzorcev smo skrbno izbrali glede na pričakovano antioksidativno aktivnost. Pri nizkih in visokih koncentracijah dobimo plato (konstantno absorbanco), zato iščemo vmesno linearno naraščajoče območje absorbance. Pri izbiri koncentracij smo si pomagali z dobljenimi vrednostmi EC_{50} pri testu DPPH.

Poškodbe deoksiriboze v reakcijski zmesi smo najprej določili brez dodanih rodaninov in nato z dodanimi. Določeni rodanini (spojine **1**, **5**, **7**, **11**) v vodi niso bili topni, zato z njimi nismo izvedli deoksiriboznega testa. Pričakovali smo, da bo dodatek AO zmanjšal poškodbe 2-DR; torej, da bo absorbanca nižja kot pri preizkusu brez dodanih rodaninov (38, 39). Vendar pa smo dobili nepričakovane in natanko nasprotno rezultate. Pri vseh reakcijskih zmesih z dodanimi AO smo dobili višjo (spojine **2**, **3**, **8**, **9**, **10**, **12**) ali približno enako (spojini **4**, **6**) absorbanco,

kot pri reakcijski zmesi brez rodaninov. Iz tega sklepamo, da so preizkušani AO delovali prooksidativno in pospešili oksidacijo in razgradnjo deoksiriboze.

Predvidevamo, da so derivati rodaninov delovali kot reducenti in reducirali železo iz Fe^{3+} oblike v Fe^{2+} . V reakcijski zmesi je očitno prevladal učinek redukcije železa nad lovljenjem hidroksilnih radikalov. Dodatek EDTA je povečal topnost železa, kar je naredilo železo še bolj dostopno AO za redukcijo. Ker so preizkušane spojine slabši kompleksanti od EDTA, niso tekmovala za vezavo železa, temveč so ga le še dodatno reducirale in povzročile še večjo razgradnjo 2-DR.

5. SKLEP

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo dokazali, da se rodanini obnašajo kot donorji atomov/elektronov, oddajo vodikov atom in se pretvorijo v resonančno stabilizirane radikale, kar je posledica njihove strukture. V reakcijski zmesi z DPPH rodaninski radikali reagirajo z DPPH radikalom, pri čemer nastane nova kovalentna vez. S testom DPPH smo dokazali redukcijo radikala DPPH in odvisnost redukcije od koncentracije rodanina; redukcija se z višanjem koncentracije veča. Za vsak rodanin posebej smo izračunali vrednosti EC_{50} in jih primerjali z EC_{50} standarda α -tokoferola. Vse preizkušane spojine so se po pričakovanju izkazale za slabše AO kot je α -tokoferol. Kot najboljši AO med rodanini se je izkazala spojina **6**, kar pripisujemo strukturi hidrazina. Sledijo spojine **9**, **8** in **10**, ki vsebujejo žveplo oziroma tiolno skupino (-SH). Sledita spojini **4** in **5** s hidroksilnimi skupinami (-OH). Spojine **2**, **1**, **3** in **7** pa imajo bistveno višje vrednosti EC_{50} in izkazujejo šibke AO lastnosti. Pri deoksiriboznem testu smo pričakovali podobne rezultate, vendar pa smo dobili ravno nasprotno. Izkazalo se je, da pri tem testu derivati rodaninov delujejo prooksidativno in pospešujejo oksidacijo ter razgradnjo deoksiriboze. Predvidevamo, da do tega pride zato, ker so preizkušane spojine slabši kompleksanti kot EDTA ter ne tekmujejo za vezavo železa. Obnašajo se kot reducenti in reducirajo železo iz Fe^{3+} v Fe^{2+} obliko.

Kljub temu, da smo dobili nepričakovane rezultate, pa smo dokazali, da AO v določenih primerih lahko delujejo tudi prooksidativno, kar je v KI nezaželeno. Potrebne bi bile še nadaljnje raziskave in ugotovitve, kaj se dogaja s spojinami tekom reakcij. Smiselno bi bilo tudi opravljanje študij in meritev *in vivo*, kako se AO obnašajo znotraj organizma. Največji izziv pri vgrajevanju derivatov rodaninov v potencialne KI bi bila njihova slaba topnost.

6. LITERATURA

- (1) Mravljak J., Pečar S.: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu; 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 138-180
- (2) Pečar S.: Radikali v našem okolju. *Kemija v šoli in družbi*, 18(2); 2006: 26-30
- (3) Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, 2015: 187
- (4) Mravljak J.: Radikali in oksidativni stres. *Farmaceutski Vestnik* 2015; 66: 127-132.
- (5) Osredkar J.: Oksidativni stres, pregledni članek. *Zdrav vestn* 2012; 81: 393-406
- (6) Pečar S.: Radikali v našem življenju. *Kemija v šoli in družbi*, 18(3); 2006: 13-19
- (7) Mravljak J.: Dušikov oksid in reaktivne dušikove zvrsti (RNS). Predavanje pri predmetu *Reaktivni intermediati in antioksidanti*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2016.
- (8) Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C.: Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2); 2008:89-96
- (9) Pisoschi A. M., Pop A.: The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 97: 55-74
- (10) Kočevar G. N., Janeš D...: *Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora*; 1. Izdaja, Širimo dobro besedo d.o.o., Velenje, 2015: 246-266
- (11) Mravljak J.: Oksidativni stres in redoks signaliziranje. Predavanje pri predmetu *Reaktivni intermediati in antioksidanti*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2016.
- (12) Moyer M. W.: The myth of Antioxidants. *Scientific American* februar 2013; 56- 61
- (13) Sindhi V., Gupta V., Sharma K., Bhatnagar S., Kumari R., Dhaka N.: Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of pharmacy research* 2013; 7: 828-835
- (14) Mravljak J.: *Antioksidanti*. Predavanje pri predmetu *Reaktivni intermediati in antioksidanti*. Ljubaljan: Fakulteta za farmacijo, 2016.
- (15) Draelos Z. D.: *Cosmetic dermatology: products and procedures*, Blackwell Publishing Ltd, West Sussex UK, 2010: 281-284
- (16) Bhalerao P. P.: A technical seminar on 'A review on antioxidants'. North Maharashtra University, Jalgaon, 2016, dostopano 21.2.2017: <http://www.slideshare.net/bhaleraoprasanna/antioxidant-technical-ppt-64278473>
- (17) Allemann I. B., Baumann L.: Antioxidants used in skin care formulations. *Medscape* [online]. 2008; 13(7): 5-8, dostopano 20.2.2017: <http://www.medscape.com/viewarticle/582103>
- (18) Donald L. Bissett, Mary B. Johnson: *Cosmetic Anti-aging Ingredients*. Textbook of aging skin 2010; 99: 1069-1078
- (19) Gašperlin M.: *Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih*. Predavanje pri predmetu *Kozmetični izdelki 2*. Ljubaljan: Fakulteta za farmacijo, 2015.

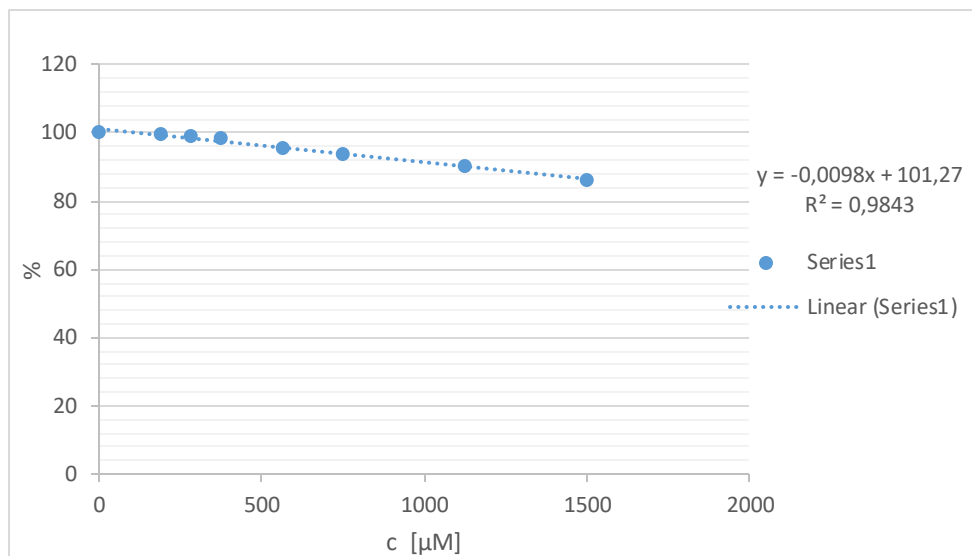
- (20) Baumgartner S.: Oksidacije, avtooksidacije in antioksidanti. Predavanje pri predmetu Kozmetični izdelki 1. Ljubaljan: Fakulteta za farmacijo, 2014.
- (21) Bhati R. S., Shah S., Suresh, Krishan P., Sandhu J. S.: Recent pharmacological developments on rhodanines and 2,4-thiazolidinediones. *International Journal of Medicinal Chemistry*. Volume 13, Article ID 793260
- (22) Song M., Zheng C., Deng X., Wang Q., Hou S., Liu T., Xing X., Piao H.: Synthesis and bioactivity evaluation of rhodanine derivatives as potential anti-bacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 54: 403-412
- (23) Pisoschi A. M., Negulescu G. P.: Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem & Anal Biochem* 2011; 1:1
- (24) Nur Alam Md., Bristi N. J., Rafiquazzaman Md.: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2013; 21: 143-152
- (25) Ono M., Hayashi S., Matsumura K., Kimura H., Okamoto Y., Ihara M., Takahashi R., Mori H., Saji H.: Rhodanine and Thiohydantoin Derivates for Detecting Tau Pathology in Alzheimer's Brain. *ACS Chemical Neuroscience* 2011; 2: 269-275
- (26) Sharma O.P., Bhat T.K.: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009; 113: 1202–1205
- (27) Chen Z., Bertin R., Frolidi G.: EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 2013; 138: 414–420
- (28) Kedare S. B., Singh R. P.: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 2011; 48: 412-422
- (29) Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. K.: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: critical review and results. *Food Chem* 2012; 130 (4): 1036-1043
- (30) Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss u Technol* 1995; 28: 25-30
- (31) Chobot V.: Simultaneous detection of Pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2010; 58: 2088-2094
- (32) Genaro-Mattos T. C., Dalvi L. T., Oliveira R. G., Ginani J. S., Hermes-Lima M.: Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1790: 1636-1642
- (33) Lopes G.K.B., Schulman H.M., Hermes-Lima M.: Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1472: 142-152
- (34) https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate-buffered_saline, dostopano 27.5.2016

- (35) Capuzzo A., Occhipinti A., Maffei M. E.: Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. *Natural Product Research*, 28(24); 2014: 2321-2323
- (36) <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html>, dostopano 7.2.2016
- (37) <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm>, dostopano 7.2.2016
- (38) Perez C., Wei Y., Guo M.: Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103; 2009: 326-332
- (39) Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., Bou-abdallah F., Chasteen N.: Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Royal Society of Chemistry*, 2007: 4951-4961

7. PRILOGE

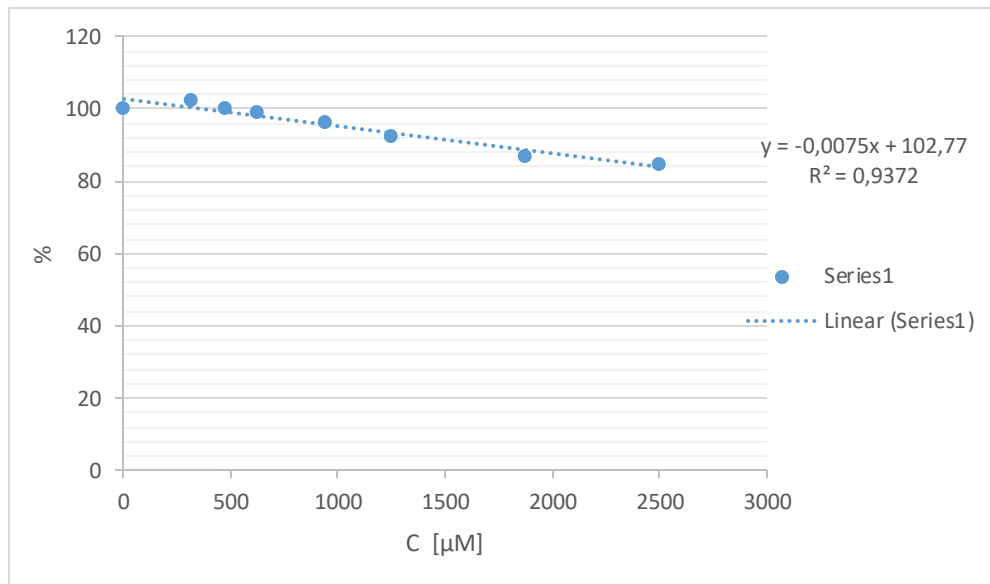
Priloga 1: Grafičen prikaz rezultatov testa DPPH spojin 2-10.

- **Spojina UL-AGP-100 (2)**



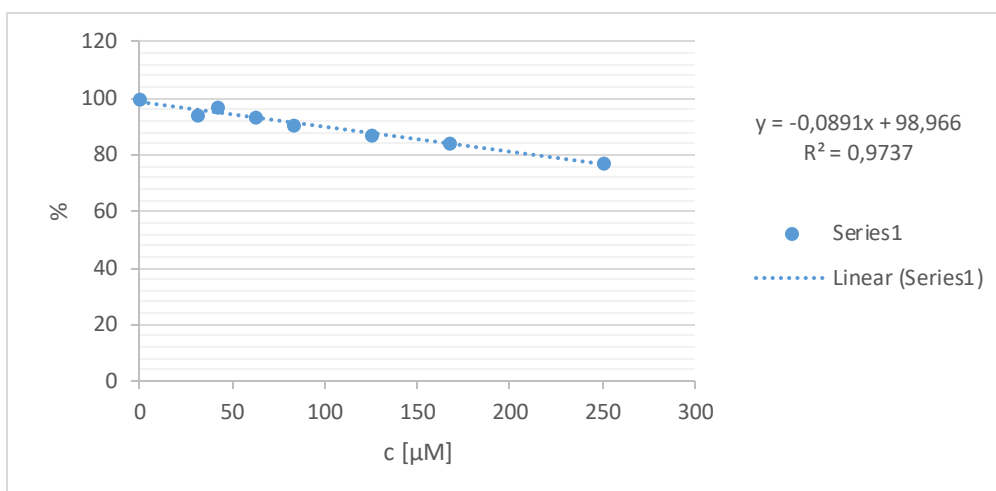
Slika 18: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 2.

- **Spojina UL-AGP-109 (3)**



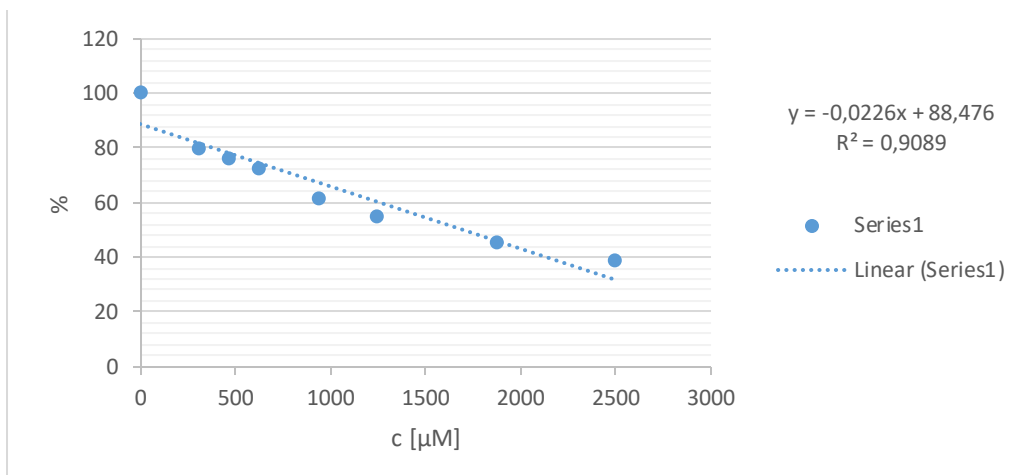
Slika 19: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 3.

- **UL-AGP-116 (4)**



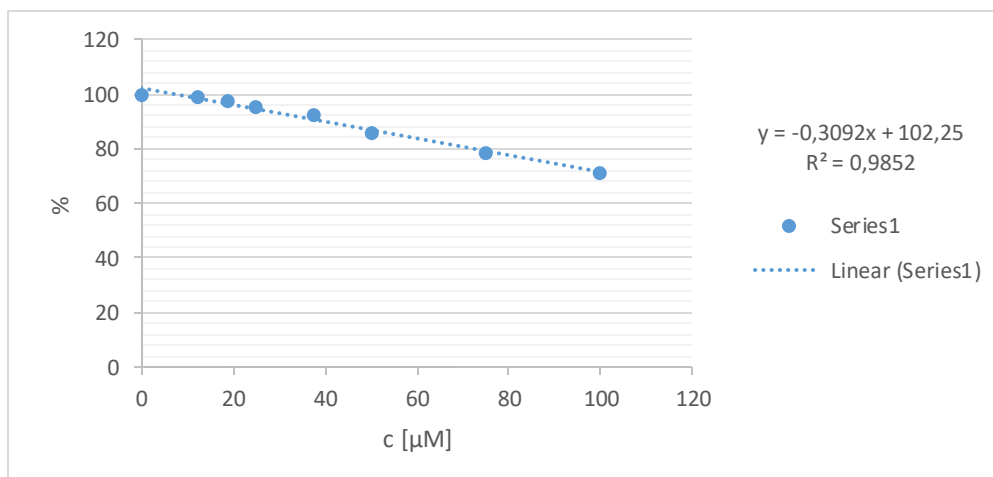
Slika20: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 4.

- **UL-AGP-117 (5)**



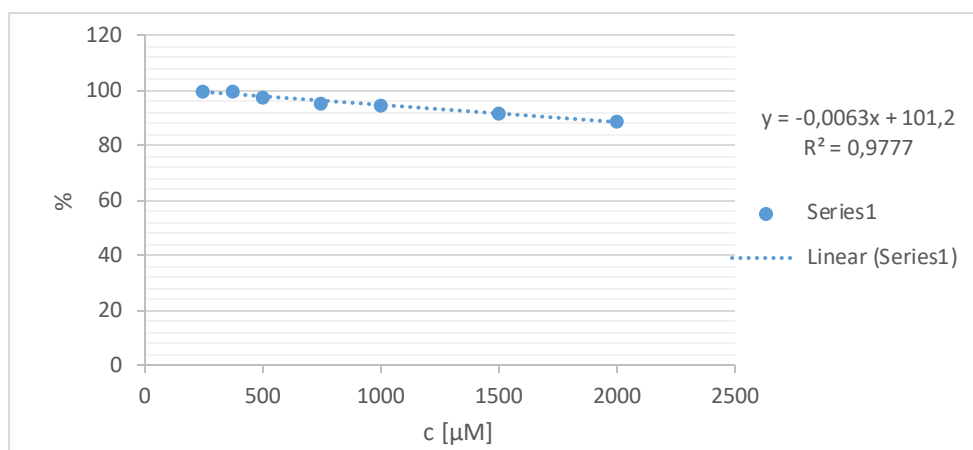
Slika21: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 5.

- **UL-AGP-126 (6)**



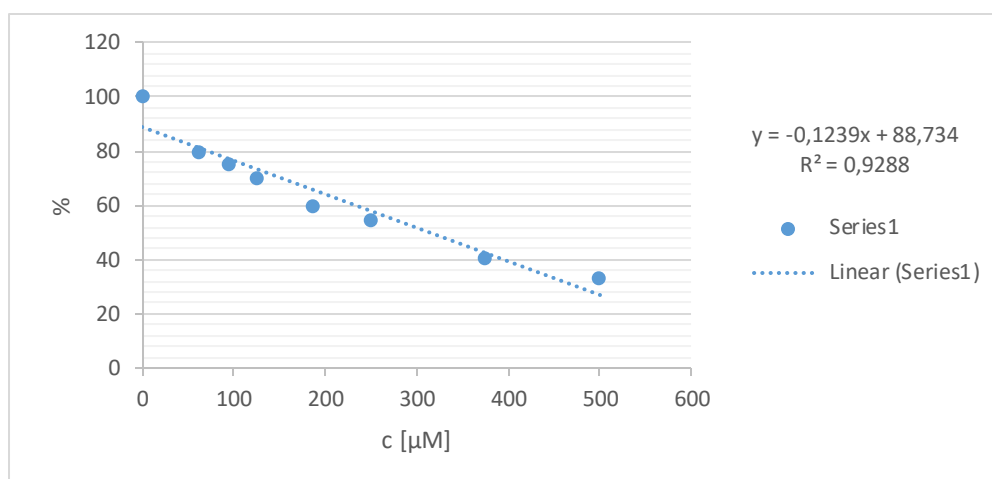
Slika22: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 6.

- **UL-AGP-127 (7)**



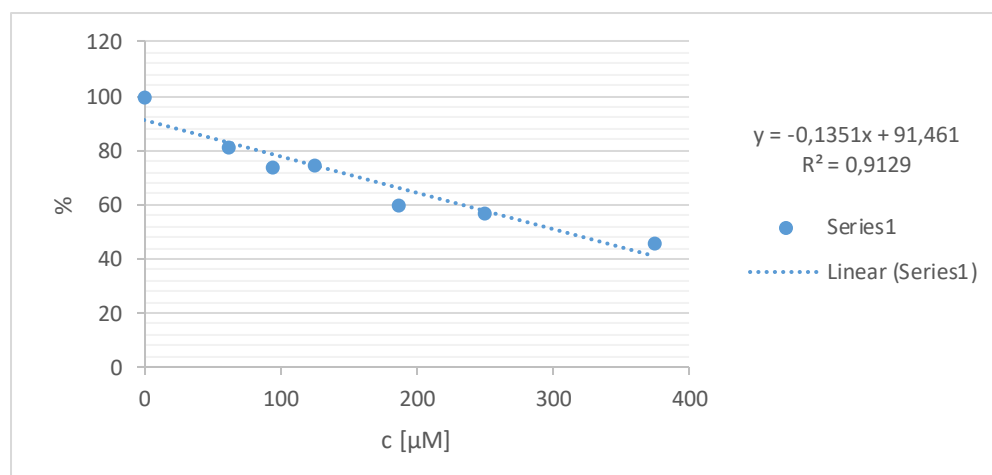
Slika 23: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **7**.

- **AM-260 (8)**



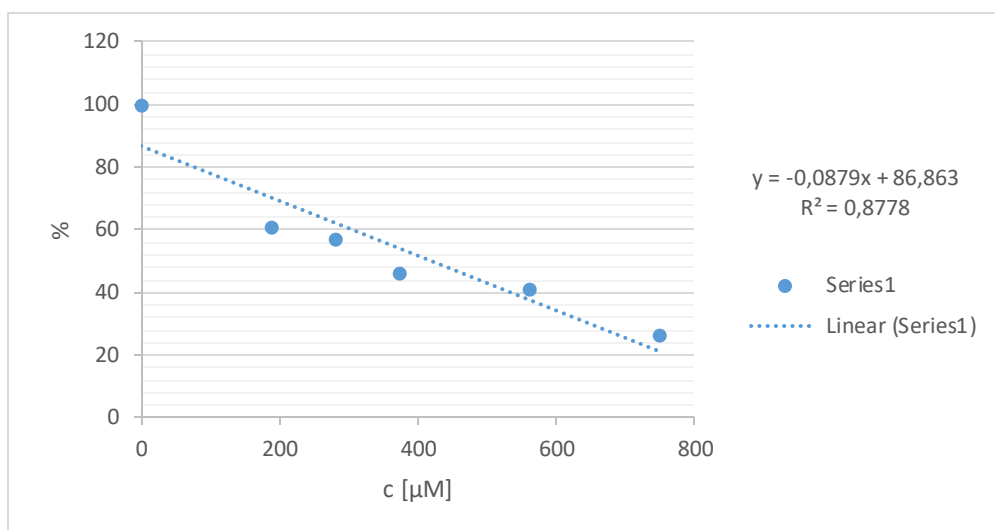
Slika 24: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **8**.

- **AM-261 (9)**



Slika 25: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **9**.

- **AM-262 (10)**

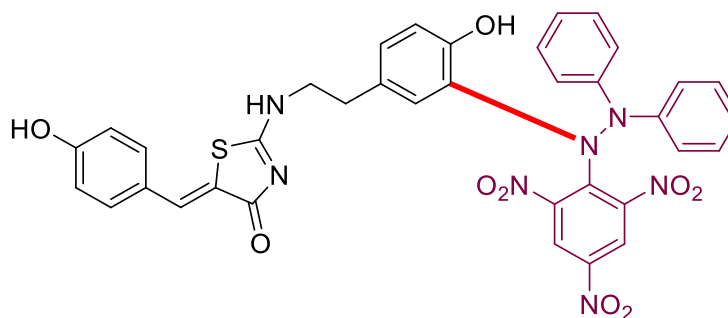


Slika 26: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **10**.

Priloga 2: Prikaz razvitih kromatogramov TLC ploščic za spojini **4** in **5** ter rezultati masne spektrometrije.

- **UL-AGP-116 (4)**

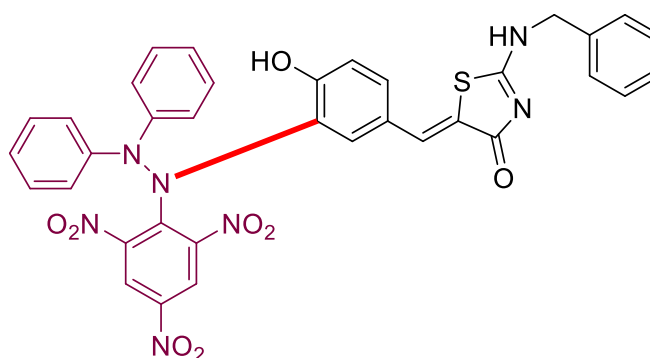
Na sliki 27 liso 1 predstavlja spojina **4**, liso 2 pa novonastala spojina (na sliki desno) s kemijsko formulo $C_{36}H_{27}N_7O_9S$.



Slika 27: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino **4**, ter struktura novonastale spojine.

- **UL-AGP-117 (5)**

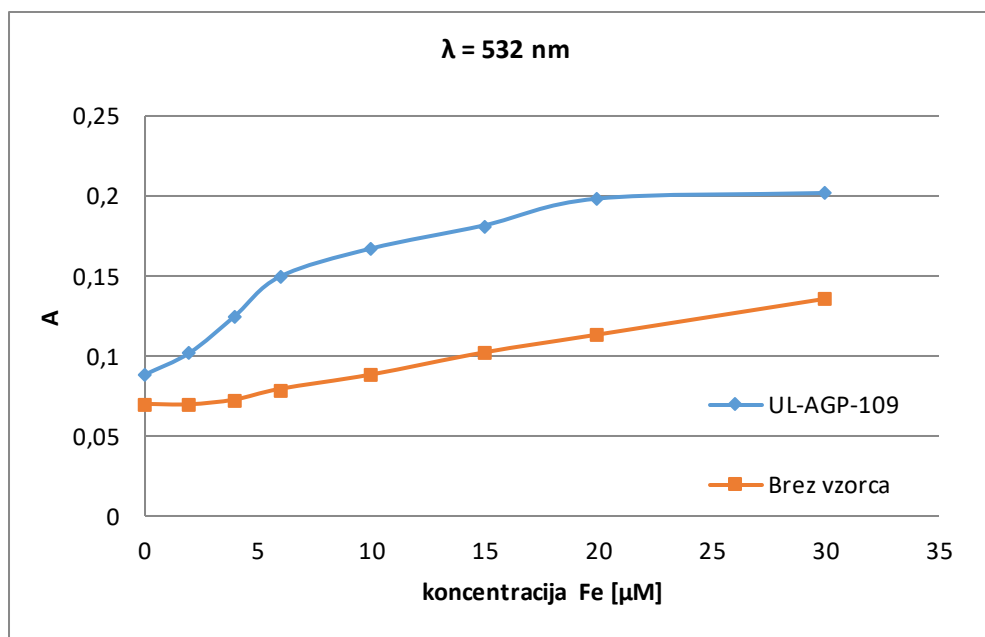
Na sliki 28 liso 1 predstavlja spojina **5**, liso 2 pa novonastala spojina (na sliki desno) s kemijsko formulo $C_{35}H_{25}N_7O_8S$.



Slika 28: TLC ploščica z nanešenim DPPH, koncentrirano reakcijsko zmesjo in spojino **5**, ter struktura novonastale spojine.

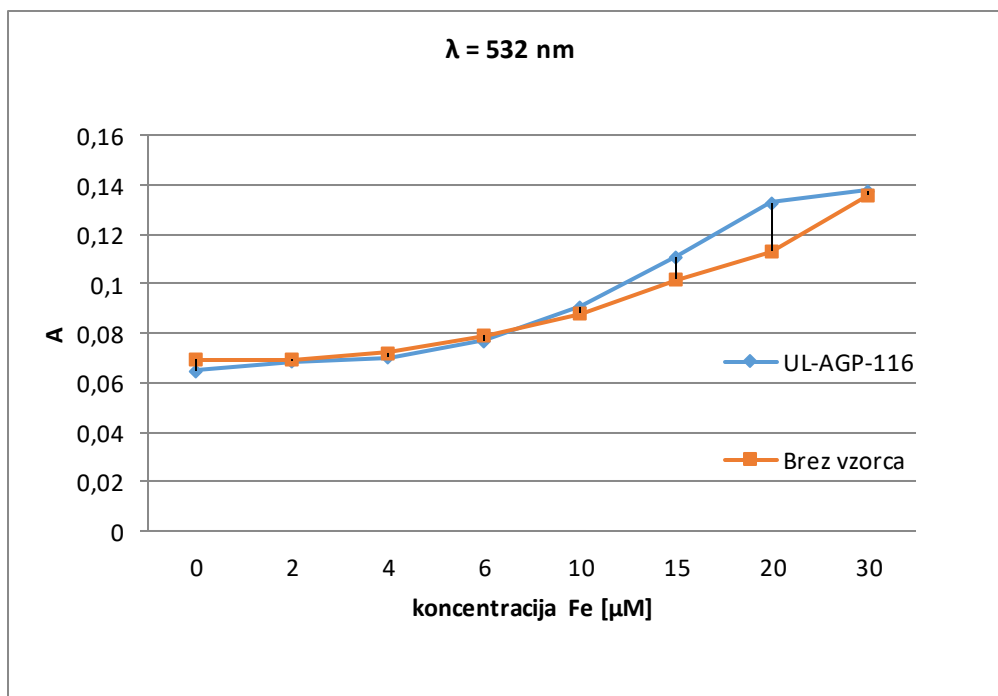
Priloga 3: Grafičen prikaz rezultatov deoksiriboznega testa za spojine **3**, **4**, **9** in **10**.

- **UL-AGP-109** (**3**)



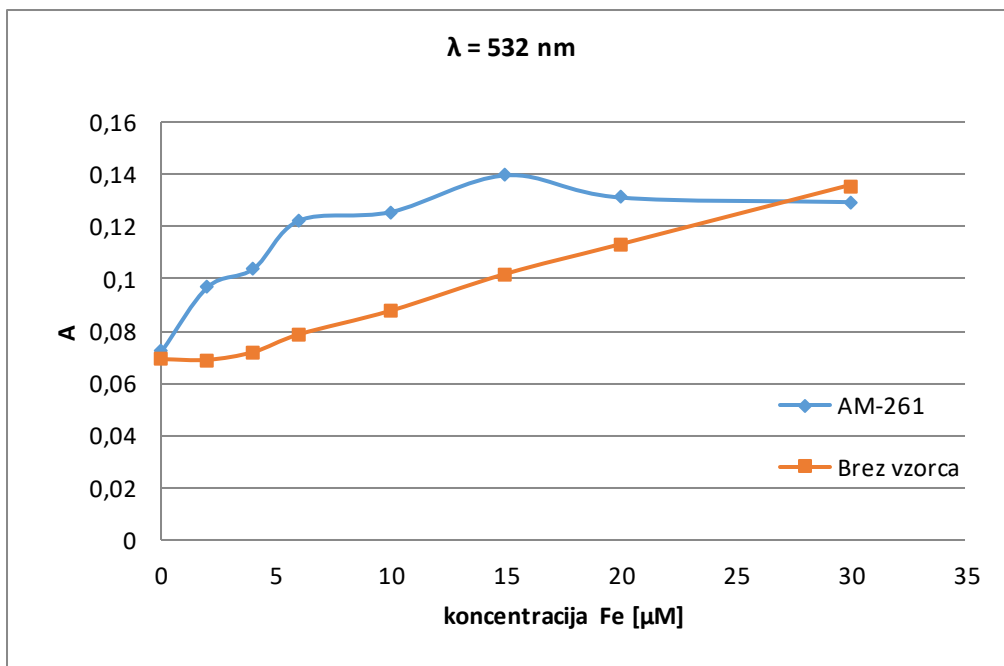
Slika 29: Primerjava absorbanc spojine **3** v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.

- **UL-AGP-116** (**4**)



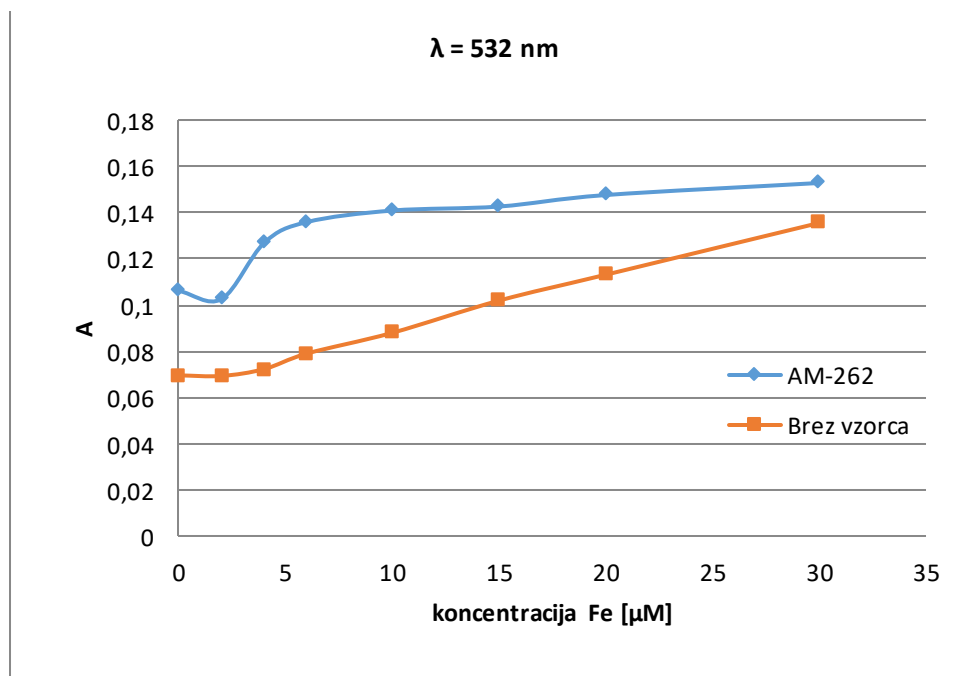
Slika 30: Primerjava absorbanc spojine **4** v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.

- **AM-261 (9)**



Slika31: Primerjava absorbanc spojine **9** v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.

- **AM-262 (10)**



Slika32: Primerjava absorbanc spojine **10** v odvisnosti od koncentracije Fe pri $\lambda = 532$ nm, z izbranim rodaninom in brez vzorca.