

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALERIJA JANEŽIČ

## **DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALERIJA JANEŽIČ

**SINTEZA SUBSTITUIRANIH 5,5'-(FENILMETILEN)BIS(BARBITURATOV) IN  
5,5'-(FENILMETILEN)BIS(TIOBARBITURATOV) IN DOLOČANJE  
NJIHOVEGA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA**

**SYNTHESIS OF SUBSTITUTED 5,5'-  
(PHENYLMETHYLENE)BIS(BARBITURATES) AND 5,5'-  
(PHENYLMETHYLENE)BIS(THIOBARBITURATES) AND DETERMINATION  
OF THEIR ANTI-OXIDANT ACTIVITY**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja, mag. farm., spektroskopske meritve in druga merjenja so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

### **Zahvala**

Najlepše se zahvaljujem mentorju doc. dr. Nacetu Zidarju, mag. farm. za pomoč, nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za pomoč pri izvajanju DPPH-testa.

Posebno se zahvaljujem tudi mojim najbližjim za vso podporo pri opravljanju študija.

### **Izjava**

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

Valerija Janežič

# VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	RADIKALI IN DRUGE REAKTIVNE SPOJINE .....	1
1.1.1	Nastajanje ROS in RNS .....	2
1.1.2	Radikalne reakcije .....	2
1.1.3	Škodljivi učinki radikalov in ostalih reaktivnih snovi.....	3
1.1.4	Pozitivni učinki radikalov in ostalih reaktivnih snovi .....	4
1.1.5	Ravnotežje med reaktivnimi spojinami in antioksidanti .....	4
1.2	ANTIOKSIDANTI .....	5
1.2.1	Delitev antioksidantov.....	5
1.2.2	Antioksidanti v koži .....	6
1.2.3	Vpliv UV svetlobe na nastanek ROS in na antioksidante v koži .....	7
1.2.4	Antioksidativni stres.....	8
1.3	TESTI ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....	9
1.3.1	DPPH-test.....	10
1.4	BARBITURNA IN TIOBARBITURNA KISLINA IN NJUNI DERIVATI.....	11
2	NAMEN DELA .....	13
2.1	NAČRTOVANJE POTENCIALNIH ANTIOKSIDANTOV .....	13
2.2	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....	14
3	MATERIALI IN METODE.....	15
4	EKSPERIMENTALNO DELO .....	17
4.1	SINTEZA.....	17
4.1.1	Sinteza <i>N,N'</i> -dimetilbarbiturne kisline (3) in <i>N,N'</i> -dimetilbarbiturne kisline (4) .....	17
4.1.2	Splošni postopek za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) 8, 10 in 12 ter 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov) 9 in 11.....	18
4.1.3	Splošni postopek za sintezo 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -kromeno-[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-5-il)pirimidionov 13 in 14.....	23
4.2	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....	25
4.2.1	Priprava raztopine DPPH in vzorcev.....	25
4.2.2	Priprava reakcijskih raztopin in določitev vrednosti EC <sub>50</sub> .....	25
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
5.1	RAZLAGA REAKCIJSKIH MEHANIZMOV .....	27
5.1.1	Sinteza <i>N, N'</i> -dimetil(tio)barbiturne kisline (1 in 2).....	27
5.1.2	Knoevenaglova kondenzacija in Michaelova adicija .....	27
5.1.3	Intramolekularna tvorba etrske vezi .....	30
5.2	DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA.....	31
5.3	KOMENTAR REZULTATOV DOLOČITVE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....	36
6	SKLEP .....	39
7	LITERATURA .....	41

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Struktura radikala DPPH; modro obarvana pikrilna skupina, redeče obarvana difenilaminska skupina. Prirejeno po (34) .....	10
<b>Slika 2:</b> Delokalizacija nesparjenega elektrona po molekuli DPPH.....	10
<b>Slika 3:</b> Strukture načrtovanih 5,5'-(fenilmetilen)bis((tio)barbituratov) ( <b>8-12</b> ) in (2,3,4,5-tetrahidro-1H-kromeno-[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidionov ( <b>13, 14</b> ). .....	14
<b>Slika 4:</b> Reakcijska shema sinteze spojin <b>3</b> in <b>4</b> . .....	17
<b>Slika 5:</b> Reakcijska shema sinteze 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) <b>8, 10</b> in <b>12</b> ter 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov) <b>10</b> in <b>11</b> . .....	18
<b>Slika 6:</b> Reakcijska shema sinteze 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1H-kromeno-[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidionov <b>13</b> in <b>14</b> .....	23
<b>Slika 7:</b> Mikrotitrna ploščica; shema nanašanja razredčin vzorcev, raztopine DPPH in MeOH za testiranje antioksidativnega delovanja treh različnih spojin. ....	26
<b>Slika 8:</b> Mehanizem reakcije sinteze spojin <b>1</b> in <b>2</b> . ....	27
<b>Slika 9:</b> Mehanizem Knoevenaglove kondenzacije.....	28
<b>Slika 10:</b> Mehanizem nastanka C-nukleofila. ....	29
<b>Slika 11:</b> Mehanizem Michaelove adicije. ....	29
<b>Slika 12:</b> Mehanizem intramolekularne tvorbe etrske vezi. ....	30
<b>Slika 13:</b> Reakcijska shema prenosa vodika z antioksidanta na radikal DPPH. Prirejeno po (32).....	31
<b>Slika 14:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije $\alpha$ -tokoferola. ....	31
<b>Slika 15:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>8</b> . ....	32
<b>Slika 16:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>9</b> . ....	32
<b>Slika 17:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>10</b> . ....	32
<b>Slika 18:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>11</b> . ....	33
<b>Slika 19:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>12</b> . ....	33
<b>Slika 20:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>13</b> . ....	33
<b>Slika 21:</b> Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine <b>14</b> . ....	34
<b>Slika 22:</b> Primer laktam-laktim tautomerije (spojina <b>8</b> ).....	36

## POVZETEK

Nastajanje radikalov in ostalih reaktivnih zvrsti je stalno prisotno v našem telesu in okolici. Njihovo ustrezno raven uravnavajo spojine, ki preprečujejo oksidacijske reakcije, imenovane antioksidanti. Področje raziskav novih antioksidantov se širi, saj smo zaradi številnih dejavnikov vedno bolj izpostavljeni reaktivnim spojinam, ki jih telo z obstoječimi antioksidanti ne more v zadostni meri nevtralizirati.

Določeni derivati barbiturne in tiobarbiturne kisline, predvsem 5-arilidenski derivati, imajo poleg ostalih pomembnih bioloških učinkov tudi antioksidativno delovanje. Antioksidativno delovanje je eno izmed delovanj, ki je v zadnjem času vzbudilo zanimanje za dodatne raziskave barbituratov in tiobarbituratov.

Na podlagi literaturnih virov smo v okviru diplomske naloge sintetizirali serijo sedmih derivatov, jih okarakterizirali in določili njihovo antioksidativno delovanje. Sintetizirane spojine imajo enako osnovno ogrodje, razlikujejo pa se v vsebnosti barbiturnega ali tiobarbiturnega obroča, v substituentih na dušikovih atomih in na fenilnem obroču ter v vsebnosti dodatne etrske vezi. Primerjali smo vplive različnih strukturnih sprememb na antioksidativno delovanje spojin. Rezultate smo primerjali s standardom  $\alpha$ -tokoferolom.

Kot metodo za določanje antioksidativnega delovanja smo uporabili DPPH-test, ki temelji na uporabi radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila, ki se v prisotnosti antioksidanta reducira. S spektroskopskimi meritvami smo spremljali spremembo barve reakcijske zmesi in iz teh podatkov izrisali umeritvene premice. Antioksidativno delovanje spojin smo določili na podlagi izračuna vrednosti srednjih efektivnih koncentracij. Boljše antioksidativno delovanje kot derivati tiobarbiturne kisline so izkazovali derivati barbiturne kisline. Poleg tega smo ugotovili, da na izboljšanje antioksidativnega delovanja spojin pomembno vpliva dodatna intramolekularna etrska vez.

Obetavno antioksidativno delovanje pripravljenih spojin odpira veliko možnosti za nadaljnje raziskave na tem področju in s tem za odkritje spojin s še boljšim antioksidativnim delovanjem.

**Ključne besede:** antioksidant, DPPH-test, 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbiturati), 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbiturati)

## ABSTRACT

The generation of free radicals and other reactive species in our body and in our environment is a continuous process. An appropriate level of radicals is regulated by antioxidants, which prevent oxidation reactions. Due to different factors, we are exposed to increasing levels of these reactive species and since endogenous antioxidants are not able to sufficiently neutralize them, new research in the field of antioxidants is very important.

Derivatives of barbituric and thiobarbituric acid, especially 5-arylidene derivatives, in addition to other important biological activities, also possess antioxidant activity. Antioxidant activity has in recent years stimulated an increased interest in research of barbiturates and thiobarbiturates.

Based on the literature data a series of seven derivatives were prepared and synthesized. These derivatives were chemically characterized and their antioxidant activity was determined. All synthesized compounds possess the same basic scaffold, but they differ in the fact if they contain barbituric or thiobarbituric ring, in the nature of the attached groups on the nitrogen atom and on the phenyl ring, and also in the fact if they contain an ether linkage. The effects of various structural modifications on their antioxidant activity were studied. The results were compared with the standard  $\alpha$ -tocopherol.

Antioxidant activities were evaluated using a DPPH assay. This is a method for determining the antioxidant activity and is based on the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl which is reduced in the presence of antioxidants. The change in color of the reaction mixture was observed with the spectroscopic measurements and based on the results the calibration curves were drawn. Antioxidant activities were determined based on calculated half maximal effective concentration values. Derivatives of barbituric acid had a higher antioxidant activity compared to derivatives of thiobarbituric acid. Moreover, compounds with the additional intramolecular ether linkage displayed a significantly improved antioxidant activity.

The promising activities of the prepared compounds offer good basis for further research to obtain compounds with improved antioxidant activities.

**Key words:** antioxidant, DPPH assay, 5,5'-(phenylmethylene)bis(barbiturates), 5,5'-(phenylmethylene)bis(thiobarbiturates)

## SEZNAM OKRAJŠAV

CAT	katalaza
d	dublet
dd	dublet dubleta
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DPPH-H	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
EC <sub>50</sub>	50 odstotna učinkovita koncentracija
GSH	glutation
HOCl	hipoklorna kislina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
HO•	hidroksilni radikal
HOO•	hidroperoksilni radikal
IR (ATR)	infrardeča spektroskopija, tehnika oslabiljene popolne odbojnosti
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
LPO	lipidna peroksidacija
m	multiplet
NMR	jedrska magnetna resonanca
NADPH	nikotin adenin dinukleotid fosfat
NO•	dušikov oksid
NO <sub>2</sub> •	dušikov dioksid
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletni kisik
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	superoksidni radikal
O <sub>3</sub>	ozon
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrit
RNA	ribonukleinska kislina
RNS	reaktivne dušikove zvrsti ( <i>angl.</i> reactive nitrogen species)
RO•	alkoksilni radikal
ROO•	peroksilni radikal
ROOH	hidroperoksid



ROS	reaktivne kisikove zvrsti ( <i>angl.</i> reactive oxygen species)
s	singlet
SN	standardna napaka
SOD	superoksid dismutaza
T	temperatura
t	triplet
$\delta$	kemijski premik
UV	ultra vijolično

# 1 UVOD

## 1.1 RADIKALI IN DRUGE REAKTIVNE SPOJINE

Radikali so atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki imajo v zunanji (valenčni) orbitali vsaj en nesparjen elektron (2). Glede na atom, na katerem se najverjetneje nahaja nesparjen elektron, razlikujemo kisikove, dušikove, žveplove in ogljikove radikale. Prvi trije tipi so v celici stalno prisotni, saj so vpleteni v presnovo in patofiziološke procese, zadnji pa nastajajo le občasno (3). Radikali so predmet intenzivnih raziskav, ne le na področju fizike, kemije, fiziologije, biokemije in farmakologije, ampak tudi na področju različnih kliničnih disciplin. Radikali imajo pomembno vlogo v procesih staranja, kancerogeneze, kardiovaskularnih, metaboličnih, nevrodegenerativnih in endokrinih boleznih, poleg tega pa so pomembni tudi v imunskem in avtoimunskem odzivu (1).

Radikali sodelujejo v velikem številu reakcij, pri katerih se tvorijo zelo reaktivni metaboliti. Ti nastanejo v reakcijah z osnovnimi molekulami radikalov, kot so superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) ali dušikov oksid ( $NO^{\bullet}$ ). Metaboliti imajo visoko oksidativno sposobnost in so pogosto bolj reaktivni od osnovnih molekul iz katerih so nastali. Radikale in njihovi metabolite označujemo s skupnim imenom »reaktivne zvrsti« (1).

Mnogi radikali so zelo reaktivni in lahko oddajo ali sprejmejo elektron z drugih molekul, torej se lahko obnašajo kot oksidanti ali reducenti. Zaradi njihove visoke reaktivnosti ima večina radikalov v bioloških sistemih zelo kratko razpolovno dobo ( $10^{-6}$  s ali manj), nekateri pa so obstojni tudi dlje časa (5). Tarče radikalov so vse vrste molekul v telesu. Napadajo lahko pomembne makromolekule kot so nukleinske kisline, lipide in proteine, kar vodi do poškodbe celic in motnje v homeostazi (4).

V normalnih fizioloških pogojih se ohranja ravnotežje med nastajanjem in odstranjevanjem reaktivnih kisikovih zvrsti (*angl.* reactive oxygen species, ROS) in reaktivnih dušikovih zvrsti (*angl.* reactive nitrogen species, RNS). ROS sestavljajo kisikovi radikali, kot so superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\bullet}$ ), peroksilni radikal ( $ROO^{\bullet}$ ), hidroperoksilni radikal ( $HOO^{\bullet}$ ) in alkoksilni radikal ( $RO^{\bullet}$ ). Med reaktivne dušikove zvrsti (RNS) prištevamo radikale, kot sta dušikov oksid ( $NO^{\bullet}$ ), in dušikov dioksid ( $NO_2^{\bullet}$ ). Tako ROS kot RNS vključujejo tudi neradikale, npr. vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroperoksidi ( $ROOH$ ), peroksnitrit ( $ONOO^{\bullet}$ ), dušikovi oksidi ( $N_2O_3$ ,  $N_2O_4$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) in hipoklorna kislina ( $HOCl$ ) (1,3). Radikali v telesu nastajajo po več mehanizmih, ki so odvisni tako od notranjih kot tudi od zunanjih dejavnikov (5).

### 1.1.1 Nastajanje ROS in RNS

Vzroki za nastanek ROS in RNS so lahko eksogeni ali endogeni. Endogeno nastajajo radikali pri aktivaciji celic imunskega sistema, vnetju, duševnem stresu, pretirani vadbi, ishemiji, okužbah, raku in staranju. Eksogeni vzroki za nastanek ROS in RNS so onesnažen zrak in voda, cigaretni dim, alkohol, težke in prehodne kovine, nekatera zdravila (ciklosporin, takrolimus, gentamicin, bleomicin), industrijska topila in elektromagnetno sevanje. Ko te eksogene spojine po različnih poteh prodrejo v telo, se lahko razgradijo ali presnovijo do radikalov (6).

Radikali nastajajo v vseh delih celice, npr. v mitohondriju, lizosomih, peroksisomih, endoplazmatskem retikulumu, plazemski membrani in v citosolu (7). ROS in RNS lahko nastanejo v celicah na dva načina: v encimskih ali neencimskih reakcijah. V encimskih reakcijah nastajajo radikali v dihalni verigi, pri fagocitozi, prostaglandinskemu sistemu in sistemu citokroma P450 (6). Nekatere encimske reakcije potekajo po radikalskih mehanizmih in nekatere skupine v aktivnih centrih encimov so pravzaprav radikali (3). Prav tako lahko radikali nastanejo pri neencimskih reakcijah med kisikom in organskimi spojinami ter pri reakcijah sproženih z ionizirajočim sevanjem. Neencimske reakcije pri katerih nastajajo radikali se lahko pojavijo tudi v mitohondriju v procesu oksidativne fosforilacije (6).

### 1.1.2 Radikalske reakcije

Radikalske reakcije so na splošno zelo hitre, razvejane in razširjene. Konstanta hitrosti reakcije  $\text{HO}^\bullet$ , ki je najreaktivnejši radikal, s tipičnimi celičnimi sestavinami je v območju od  $10^8$  do  $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ta radikal torej reagira s skoraj vsako molekulo, ki jo sreča na svoji poti. Reaktivnost radikalov je neposredno odvisna od težnje elektrona po nastanku elektronskega para. V primeru, da obstaja možnost delokalizacije nesparjenega elektrona, se stabilnost radikala poveča. Stabilnost se poveča tudi, če je nesparjen elektron ujet v sterično oviranem področju molekule (8).

Radikali lahko reagirajo na različne načine. Radikalske reakcije so pogosto verižne reakcije, kjer nastajajo novi radikali. Dva radikala se lahko povežeta s kovalentno vezjo, pri čemer vsak od njiju prispeva po en nesparjen elektron. Primer je hitra reakcija dušikovega oksida s kisikovim radikalom, kjer pride do nastanka neradikalskega produkta, peroksinitrita ( $\text{NO}^\bullet + \cdot\text{O}_2 \rightarrow \text{NOO}^\bullet$ ).

Biološke molekule večinoma niso radikali. Kadar radikali reagirajo z neradikali nastane pri tem nov radikal, pri čemer lahko pride do verižne reakcije na več načinov:

- 1) Adicija radikala na drugo molekulo, pri čemer nastane adukt, ki ima še vedno nesparjen elektron. Primer: HO• se veže na položaj 8 v ciklični strukturi gvanina v molekuli DNA. Produkt je radikal 8-hidroksigvanin.
- 2) Radikal kot reducent odda elektron neradikal. Primer: Radikal ogljikovega oksida reducira Cu<sup>+</sup> do Cu.
- 3) Radikal kot oksidant sprejme elektron z neradikala. Primer: Oksidacija hidroksilnega radikala.
- 4) Odvzem vodikovega atoma s C-H vezi. Primer: HO• odvzame vodikov atom iz stranske C-H skupine v maščobni kislini. Nastali ogljikov radikal lahko naprej reagira s kisikom do nastanka peroksilnega radikala (9).

### 1.1.3 Škodljivi učinki radikalov in ostalih reaktivnih snovi

Pri prekomerni količini reaktivnih zvrsti lahko pride do resnih poškodb celičnih membran in drugih celičnih struktur, kot so proteini, lipidi, lipoproteini in nukleinske kisline (6). Reaktivni radikali sprožajo lipidno peroksidacijo, ki je lokalizirana oksidacija fosfolipidov v bioloških membranah. Oksidacija fosfolipidov poteka po verižnem mehanizmu. (2). Sprožitelj lipidne peroksidacije je navadno hidroksilni radikal. Ta odvzame vodikov atom iz lipidne molekule, pri čemer nastane lipidni radikal, ki se nato z reakcijo s kisikom pretvori v peroksilni radikal. Peroksilni radikal lahko odvzame vodikov atom iz nove lipidne molekule in se tako pretvori v lipidni peroksid. Tako se reakcija odvzema vodika in nastajanja novih radikalov nadaljuje. Zaradi peroksidacije lipidov se tvorijo številne spojine imenovane biomarkerji lipidne peroksidacije. Te so zaznali pri številnih boleznih, kot so nevrodegenerativne bolezni, ishemične reperfuzijske poškodbe in diabetes (4).

Prav tako lahko pride do oksidacije proteinov. Nekatere aminokisline, kot so metionin, cistein, arginin in histidin, so zelo občutljive na oksidacijo (4). Oksidacije lahko potekajo na peptidni verigi ali pa na aminokislinskih ostankih v proteinih (2). Te vplivajo na spremembo signalnih mehanizmov, encimsko aktivnost, toplotno stabilnost in proteolizno občutljivost, kar vodi v staranje (4).

Na oksidativne poškodbe so dovzetne tudi nukleinske kisline (RNA in DNA). DNA je pomembna tarča reaktivnih spojin zlasti pri staranju in raku (4). Radikali najpogosteje reagirajo s sladkorji in nukleinskimi bazami na DNA. Po reakciji so možni različni

rezultati, ki so odvisni od tega s katerim delom DNA reagira radikal. Nekateri od teh so pretrganje verige DNA, odcepitev nukleinske baze, oksidacija baz, kovalentna povezava med DNA in bližnjim proteinom, deamniacija, kovalentna povezava med nukleinskima bazama iz nasprotnih verig DNA ali med dvema zaporednima nukleinskima bazama (2).

#### **1.1.4 Pozitivni učinki radikalov in ostalih reaktivnih snovi**

Reaktivne snovi v organizmu ne povzročajo samo škode, ampak so jih celice tekom evolucije vključile v svoje biokemijske procese, kjer opravljajo številne nepogrešljive naloge (2). ROS in RNS so v nizkih koncentracijah potrebne pri procesu zorenja celičnih struktur in lahko delujejo kot zaščita v obrambnem sistemu gostitelja. Nekatere reaktivne zvrsti, zlasti  $\text{NO}^\bullet$ , imajo pomembno fiziološko vlogo pri celi vrsti celičnih signalnih procesov. Te zvrsti lahko modulirajo razmnoževanje celic, aktivirajo signalne poti, ki celici omogočijo preživetje in povečajo njeno odpornost v primeru bolezni, ali pa ob večjih koncentracijah sprožijo apoptozo. Reaktivne zvrsti so tudi pomemben del imunskega sistema in s tem obrambe pred patogeni (virusi, bakterije, glivice), ki vdrejo v telo. Aktivirani fagociti (nevtrofilci, makrofagi in monociti) namreč namenoma proizvajajo večje količine reaktivnih zvrsti ( $\text{HOCl}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), da uničijo prisotne patogene (2, 6). Poleg tega reaktivne zvrsti sodelujejo pri redoks regulacijah in tako lahko aktivirajo transkripcijske faktorje in ostale dejavnike za ekspresijo genov. (11).

#### **1.1.5 Ravnotežje med reaktivnimi spojinami in antioksidanti**

Pri običajnih fizioloških pogojih je proizvodnja reaktivnih snovi približno uravnotežena z antioksidativnim obrambnim sistemom. Ravnotežje ni popolno, rahlo se nagiba v smer reaktivnih spojin, zaradi tega neprestano prihaja do poškodb. Antioksidativni obrambni sistem nadzoruje raven reaktivnih zvrsti, tako, da jim omogoča opravljanje osnovnih nalog (9). Če antioksidanti dobro opravljajo svojo nalogo, oksidativni stres sicer poteka, vendar v zelo majhnem obsegu. To je pozitiven ali fiziološko pomemben oksidativni stres (2). Pri presežku proizvedenih radikalov in ostalih reaktivnih snovi pride do t.i. oksidativnega stresa, kjer pride do škodljivih učinkov za celice. Z drugimi besedami je oksidativni stres rezultat neravnovesja med tvorbo in odstranjevanjem ROS in RNS (6). Oksidativni stres je lahko posledica zmanjšanja količine antioksidantov zaradi različnih mutacij in s tem zmanjšane delovanja endogenih antioksidativnih encimov, prenizkega vnosa hranil, ki

vsebujejo antioksidante, ali pa povečanja proizvodnje reaktivnih spojin zaradi eksogenih in endogenih dejavnikov (9,11).

Možne posledice oksidativnega stresa, ki so odvisne od vrste celic in razširjenosti tega procesa, so povečana proliferacija, prilagoditev celic z uravnavo obrambnih sistemov, poškodbe celic, staranje in celična smrt (9).

## **1.2 ANTIOKSIDANTI**

Organizem je razvil ustrezne obrambne mehanizme, ki delujejo proti toksičnim učinkom prekomerno proizvedenih radikalov in ostalih reaktivnih spojin (1). Človeška antioksidativna obramba je zapletena in poskuša čimbolj zmanjšati raven reaktivnih spojin, hkrati pa dovoljevati opravljanje njihove koristne vloge pri celičnem signaliziranju in redoks regulaciji (10). Stopnja in sestava antioksidativne obrambe se razlikujeta glede na vrsto tkiva in celic (9).

Antioksidanti so spojine, ki že pri nizkih koncentracijah preprečujejo oksidativne poškodbe molekul z radikali in ostalimi reaktivnimi spojinami (1). Spojina je opredeljena kot učinkovit antioksidant *in vivo*, kadar izpolnjuje naslednje pogoje: i) reagira z biološko aktivnimi reaktivnimi metaboliti, ii) produkt reakcije prooksidanta in antioksidanta je manj toksičen od prooksidanta, iii) v organizmu je prisotna v zadostnih koncentracijah in iv) njena razpolovna doba je dovolj dolga, da reagira z oksidantom (1). Antioksidanti delujejo na različne načine, glede na njihove funkcije pa jih razvrstimo na lovilce radikalov (npr. vitamin C), lovilce neradikalov (npr. katalaza), spojine, ki zavirajo nastajanje oksidantov (npr. kelatorji kovin) in spojine, ki inducirajo nastajanje antioksidantov (npr. izotiocianati) (11).

### **1.2.1 Delitev antioksidantov**

Poznamo tako endogeno kot eksogeno antioksidativno obrambo, ki ščitita celične sestavine pred oksidativnimi poškodbami, ki jih povzročijo radikali in ostale reaktivne zvrsti (5). Endogene spojine v celicah lahko opredelimo kot encimske antioksidante in neencimske antioksidante. Glavni encimski antioksidanti, ki so neposredno vključeni v nevtralizacijo ROS in RNS so superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza in glutation reduktaza. Neencimski endogeni antioksidanti nastajajo v metabolnem procesu. To so lipojska kislina, glutation (GSH), L-arginin, koencim Q, melatonin, sečna kislina, bilirubin, razni proteini, ki kelirajo kovine (ferritin, laktoferin, transferin) itd. Poleg

neencimskih endogenih antioksidantov uvrščamo v skupino neencimskih antioksidantov tudi eksogene antioksidante. Teh telo ni zmožno proizvajati samo, zato jih v telo vnesemo s hrano ali prehranskimi dopolnili. Najpomembnejši eksogeni antioksidanti so vitamin E, vitamin C, karotenoidi, flavonoidi, omega-3 in omega-6 maščobne kisline (6).

Antioksidante lahko delimo tudi glede na njihove kemijske lastnosti, ker je od tega odvisno, kako se bodo v telesu porazdelili (5). Tako encimski kot neencimski antioksidanti se nahajajo znotraj in zunaj celičnih prostorov (6). Delimo jih na hidrofilne in lipofilne. Slednji se nahajajo pretežno v celičnih membranah, kjer lovijo radikale ter s tem preprečujejo lipidno peroksidacijo. Najpomembnejši lipofilni antioksidant je vitamin E. V to skupino spadajo še karotenoidi, flavonoidi in ubikinol 10. Hidrofilni antioksidanti, med katerimi je najpomembnejši vitamin C, odstranjujejo radikale iz vodnega okolja. Med hidrofilne antioksidante spadajo še proteini s tiolnimi skupinami in GSH (5).

### **1.2.2 Antioksidanti v koži**

Koža je izpostavljena oksidativnemu stresu tako s strani endogenih kot tudi eksogenih virov in le manjši del tkiva v telesu je podvržen podobni stopnji izpostavljenosti. Med evolucijo je postala koža, tako kot tudi druga tkiva, prilagojena na naraščajočo koncentracijo kisika in kisikovih metabolitov, zato je za obvladovanje prekomerne izpostavljenosti škodljivim reaktivnim metabolitom razvila več linij obrambe. K tem prištevamo različne mehanizme, kot so npr. popravljalni sistem (npr. encimi, ki popravljajo DNA), fizična obramba (npr. zaščita bioloških molekul) in antioksidativna obramba (12). Koža torej deluje kot obrambni sistem proti oksidativnemu stresu, vendar je tudi ena izmed glavnih tarč oksidativnih poškodb. (13)

Najpomembnejši obrambni mehanizem kože je antioksidativni sistem. Ta se je razvil skozi evolucijo kot odgovor na povečanje koncentracije kisika in je bil namenjen neposredni interakciji z ROS, da prepreči njihov dostop in napad na pomembne biološke molekule (12). Antioksidativna zaščita v koži vključuje encimske antioksidante, kot so glutathion peroksidaza, SOD in CAT ter neencimske nizkomolekularne antioksidante, kot so vitamin E, vitamin C, GSH, sečna kislina in ubikinol. V koži so prisotne tudi številne druge komponente, ki delujejo kot močni antioksidanti. To so askorbat, karotenoidi in sulfhidrili. Med hidrofilne antioksidante, ki jih najdemo v plazmi spadajo glukoza, piruvat, sečna kislina, askorbinska kislina, bilirubin in glutathion. Med lipofilne antioksidante spadajo  $\alpha$ -tokoferol, ubikinol-10, likopen,  $\beta$ -karoten, lutein, zeaksantin in  $\alpha$ -karoten. Na splošno so v

zunanji plasti kože, epidermisu, višje koncentracije antioksidantov kot v nižje ležečem dermisu. Glede na molsko razmerje v koži prevladujejo hidrofilni antioksidanti. Poleg tega je tudi aktivnost encimov v epidermisu dosti višja kot v dermisu (11).

V roženi plasti kože se nahajajo tako hidrofilni kot tudi lipofilni antioksidanti, vendar pa ti niso enakomerno porazdeljeni, saj njihova koncentracija narašča proti globljim plastem rožene plasti. To lahko pojasnimo s tem, da je parcialni tlak kisika v zunanjih plasteh rožene plasti višji, kar povzroča oksidativni stres in s tem večje izčrpavanje zalog antioksidantov. Prav tako so višje locirani korneociti že dalj časa sestavni del rožene plasti in tako so že dlje izpostavljeni oksidativnemu stresu povzročenemu z zunanjimi vplivi (11).

Keratinociti in kožni fibroblasti vsebujejo milimolarne količine GSH,  $\alpha$ -tokoferola, askorbata in encimov, ki popravljajo DNA. Na splošno so keratinociti veliko bolj odporni proti  $H_2O_2$ , organskim peroksidom in peroksinitritom, kot večina ostalih celic (11).

### **1.2.3 Vpliv UV svetlobe na nastanek ROS in na antioksidante v koži**

Najbolj pogost in najbolj raziskan eksogeni vir, ki povzroča nastanek reaktivnih zvrsti v koži je zagotovo UV svetloba. Pri pretirani izpostavljenosti UV žarkom pride do pospešenega staranja kože in povečane pojavnosti določenih vrst kožnega raka. Prav tako pride do neposrednih poškodb ob izpostavljenosti kože ozonu (13). UV sevanje močno prispeva k nastanku ROS v koži. Vrsta nastalih ROS je odvisna od valovne dolžine UV sevanja. UVB svetloba pretežno stimulira nastanek  $O_2^{\bullet-}$  preko aktivacije NADPH oksidaze in reakcij v dihalni verigi, medtem ko UVA svetloba proizvaja singletni kisik ( $^1O_2$ ) preko reakcije fotosenzibilizacije s kromofori, kot sta riboflavin in porfirin. UVA svetloba proizvaja tudi superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) preko aktivacije NADPH oksidaze. Glavna vrsta ROS proizvedenih na površini kože je  $^1O_2$ , ki nastane v reakciji fotosenzibilizacije porfirinov iz bakterijske flore, ki je prisotna na koži, z UVA svetlobo.  $^1O_2$  lahko oksidira skvalen, holesterol in nenasičene acilne ostanke v sebumu do lipidnih hidroperoksidov (14).

Poškodbe zaradi UV sevanja vključujejo poleg tvorbe ROS tudi izčrpavanje endogenega antioksidativnega sistema. Pri izpostavljenosti kože UVB žarkom pride do izčrpanja zalog askorbata, GSH in ubikinola tako v dermisu kot tudi v epidermisu. Po obsevanju kože pa se tudi močno zmanjša aktivnost CAT in SOD (11).



Po upadu količine lipofilnih antioksidantov (vitamina E in ubikinola) v koži, se njihove zaloge po prenehanju izpostavljenosti sevanju obnovijo dokaj hitro (v 24 urah), v primerjavi s hidrofilnimi antioksidanti (vitamin C in glutation), ki potrebujejo za obnovo do 120 ur. Za antioksidante je značilno, da med seboj tvorijo antioksidativno mrežo. Dobro znana je obnova vitamina E s pomočjo askorbinske kisline. UV svetloba povzroči nastanek tokoferolnega radikala, ki se lahko s pomočjo vitamina C pretvori nazaj v vitamin E (13). Zaradi veliko hitrejšega upada količine askorbata in katalaze v povrhnjici kot v usnjici, je UV svetloba veliko bolj škodljiva za antioksidativno obrambo v povrhnjici. Akutna izpostavljenost človeške kože sevanju *in vivo* povzroča oksidacijo celičnih biomolekul, kar lahko preprečimo z nanosom antioksidantov na kožo. Radikalske reakcije pospešijo procese staranja, zato je njihova omejitev ali preprečitev pomembna za upočasnitev staranja in zmanjšanje hitrosti bolezenske patogeneze (11).

#### **1.2.4 Antioksidativni stres**

Antioksidanti lahko v določenih pogojih delujejo kot prooksidanti. To so snovi, ki sprožijo oksidativni stres, bodisi tako da tvorijo ROS ali da inhibirajo antioksidativne sisteme. Ali je neka snov antioksidant ali prooksidant je odvisno predvsem od koncentracije snovi, prisotnosti kisika in ionov prehodnih kovin (3). Prekomeren vnos antioksidantov v telo lahko povzroči negativne učinke. Pod določenimi pogoji lahko vsi antioksidanti povzročijo t.i. antioksidativni stres. Ta ima škodljive učinke na organizem, saj lahko tako kot oksidativni stres pospeši staranje in povzroči nastanek raznih bolezni. Na primer, prekomeren vnos vitamina C lahko povzroči večjo verjetnost srčnega napada. Poleg tega, naj bi povečan vnos vitamina C vplival tudi na manjšo raven vitamina B12, saj naj bi ta zmanjšal njegovo absorpcijo iz hranilnih snovi. Visoki odmerki vitamina E ovirajo absorpcijo vitaminov A in K. Prav tako lahko pride do negativnih učinkov pri dolgotrajnem uživanju selena (15). Prekomerno povečanje koncentracije enega antioksidanta pogosto povzroči zmanjšanje koncentracije drugih antioksidantov, tako da ostane celokupna kapaciteta antioksidantov nespremenjena. Vnos večje količine enega samega antioksidanta v telo lahko spremeni zapleten sistem endogene antioksidativne zaščite celic ali pa vpliva na sprožitev apoptoze v celici (2).

Pri uporabi eksogenih antioksidantov je potrebno biti pozoren na njihovo interakcijo z naravno fiziološko obrambo pred radikali. Kljub temu, da antioksidanti dokazano zmanjšujejo oksidativni stres, je pomembno vprašanje, pri katerih količinah imajo ugoden

učinek (15). Prehranska dopolnila z antioksidanti so koristna in učinkovita pri zmanjšanju oksidativnega stresa le v primeru, če je začetni oksidativni stres pri posamezniku povišan (2).

Dolgoročni učinki različnega odmerjanja antioksidantov, mikrohranil in ostalih dodatkov so le malo poznani. Glede na to, da telo dobro uravnava homeostazo, bi lahko neustrezni odmerki antioksidantov motili naravno ravnovesje in povzročili negativne učinke. Pri razvoju novih antioksidantov in uravnavanju terapije je pomembno vprašanje, kako se ta zdravila odmerjajo in ali so v sorazmerju z obstoječimi endogenimi antioksidanti (15).

### **1.3 TESTI ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA**

Za določanje antioksidativnega delovanja snovi se uporabljajo različne *in vitro* in *in vivo* metode. *In vitro* metode so razmeroma enostavno izvedljive, pri njih pa se kot reagenti uporabljajo radikali oziroma oksidanti.

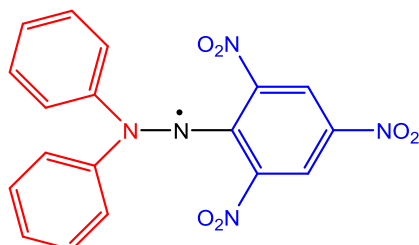
Pri *in vivo* metodah se testni vzorci antioksidantov najpogosteje preizkušajo na živalih, tako da se določen odmerek vzorca aplicira po predpisani metodi in nato preučuje njegovo antioksidativno delovanje.

Med *in vitro* metodami se najpogosteje uporablja DPPH-test, saj je dokaj enostaven in razmeroma poceni. Med *in vivo* metodami je najpogosteje v uporabi lipoproteinski (LPO) test. Lipidi so namreč glavna sestavina celičnih membran, zato lahko s tem testom skoraj neposredno določimo njihovo oksidacijo in vpliv na poškodbo celic *in vivo*. (16)

Na osnovi kemijskih reakcij razdelimo *in vitro* teste za določanje antioksidativnega delovanja v dve skupini: i) testi na osnovi reakcije, kjer pride do prenosa elektrona, ki vključujejo redoks reakcijo z oksidantom, kot indikatorjem končne točke reakcije. Pri teh testih pride do prenosa elektrona z antioksidanta na oksidant, pri čemer se oksidant reducira. Določa se redukcijska sposobnost antioksidantov. ii) Testi na osnovi reakcije, kjer pride do prenosa vodikovega atoma. Pri teh metodah se kot oksidirana molekula uporablja radikal, kot analit pa antioksidant, ki mu želimo določiti delovanje. Določa se zmožnost prenosa vodikovega atoma, kar je ključni korak pri radikalskih verižnih reakcijah. Vsi ti testi so namenjeni merjenju zmožnosti lovljenja radikalov oziroma oksidantov (17).

### 1.3.1 DPPH-test

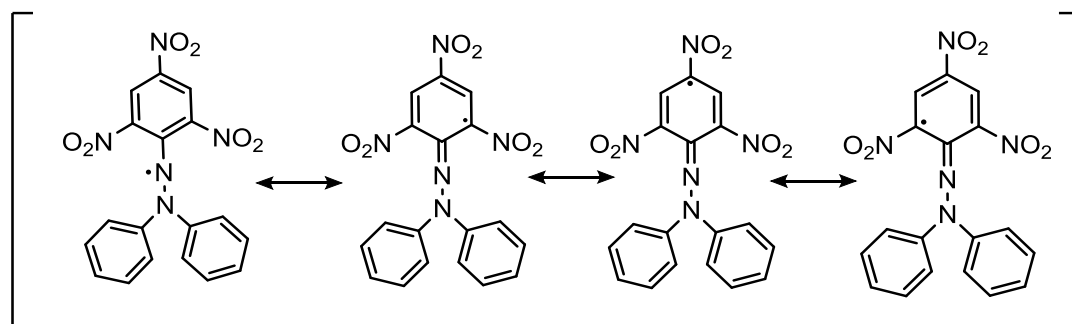
DPPH-test je pred skoraj 60 leti uvedel Marsden Blois, ki je kot antioksidant pri testu uporabil aminokislino cistein. Pri reakciji je prišlo do prenosa vodikovega atoma s cisteina na radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Test temelji na uporabi molekule DPPH, ki je stabilen dušikov radikal (Slika 1) (18).



**Slika 1:** Struktura radikala DPPH; modro obarvana pikrilna skupina, rdeče obarvana difenilaminska skupina. Prirejeno po (34)

Stabilnost molekule DPPH je predvsem posledica steričnih ovir okoli dvovalentnega dušikovega atoma, v manjši meri pa k njej pripomoreta tudi difenilaminska skupina (donor elektrona) in pikrilna skupina (akceptor elektrona) na dvovalentnem dušiku, ki omogočata tako imenovani kaptodativni učinek (19). Poleg tega je stabilnost DPPH tudi posledica delokalizacije elektrona (Slika 2), zaradi česar, za razliko od večine ostalih radikalov, ta radikal ne dimerizira (21).

Poleg stabilnosti je prednost uporabe DPPH tudi njegova obarvanost. Ta je prav tako posledica delokalizacije elektronov, kar daje spojini močno vijoličasto barvo in absorpcijski maksimum pri valovni dolžini okoli 515 nm. Točna vrednost absorpcijskega maksimuma je sicer odvisna tudi od uporabljenega topila. (Slika 2) (16,19).



**Slika 2:** Delokalizacija nesparjenega elektrona po molekuli DPPH

Radikal DPPH lahko reagira z radikali in donorji vodikovega atoma na različnih mestih v molekuli. Do reakcije z radikali lahko pride na fenilnem ali pikrilnem obroču DPPH, medtem ko z donorji vodikovega atoma reagira dvovalentni dušikov atom (19). Antioksidant, kot donor vodika ali elektrona, se mora dovolj približati dušiku, da pride do

prenosa vodikovega atoma na radikal DPPH. Pri tem nastane reducirana oblika DPPH, hidrazin DPPH-H, kar povzroči spremembo barve raztopine iz vijolične v blede rumeno barvo. To nam omogoča, da lahko reakcijo spremljamo z UV/VIS spektrofotometri (16, 19).

Ali prevlada mehanizem prenosa vodika ali mehanizem prenosa elektrona je odvisno predvsem od vrste topila in redoks potenciala vzorca. Na splošno v nepolarnih in polarnih protičnih topilih prevlada mehanizem prenosa vodikovega atoma. Pri polarnih aprotičnih topilih pa prevlada mehanizem prenosa elektrona. Do prenosa vodikovega atoma torej pride v primerih, kadar uporabimo topila, kot sta na primer etanol in metanol (17, 20). Reakcijo DPPH z vzorcem (antioksidantom) spremljamo s spektrofotometričnimi meritvami. Običajno pripravimo metanolno raztopino DPPH, ki ji dodamo ustrezno količino vzorca in po končani reakciji določamo količino reduciranega DPPH. Delež preostalega DPPH je sorazmeren koncentraciji antioksidanta in njegovi antioksidativni moči. Koncentracijo antioksidanta, ki povzroči 50 odstotno zmanjšanje začetne koncentracije DPPH imenujemo srednja efektivna koncentracija ali EC<sub>50</sub> (17). Ta parameter se pogosto uporablja za predstavitev antioksidativnega delovanja spojin (18).

## **1.4 BARBITURNA IN TIOBARBITURNA KISLINA IN NJUNI DERIVATI**

Leta 1863 je nemški znanstvenik Adolf von Baeyer v laboratoriju prvi sintetiziral barbiturno kislino. Za pripravo barbiturne kisline je uporabil sečnino, ki jo je dobil iz živalskega urina in malonsko kislino, ki jo pridobimo iz sadja. Od odkritja so razvili že več kot 2000 različnih derivatov barbituratne kisline, od katerih jih je bilo v preteklosti okoli petdeset uporabljenih kot zdravilne učinkovine (22).

Derivate barbiturne kisline imenujemo barbiturati. Kadar v postopku sinteze namesto sečnine uporabimo tiosečnino dobimo tiobarbiturno kislino, njenim derivatom pa pravimo tiobarbiturati.

Vsi barbiturati vsebujejo kot osrednji obroč barbiturno kislino, ki sama po sebi nima bioloških učinkov. Z dodajanjem ali menjavo različnih strukturnih elementov v barbiturni kislini pa lahko nastanejo različne vrste barbituratov, ki imajo različne biološke učinke. Prvi barbiturat, fenobarbital, ki je bil razvit kot zdravilo in je prišel na trg, je imel hipnotičen in pomirjevalen učinek (22). Barbiturati in tiobarbiturati so pogosto prisotni kot zdravilne učinkovine, saj imajo številne biološke učinke za različna bolezenska stanja (23).

Odvisno od kemijske sestave, odmerka in načina dajanja imajo na centralni živčni sistem različno stopnjo pomirjevalnega učinka. Tako imajo lahko pomirjevalni, hipnotični, antikonvulzivni in anestetični učinek (24). Poleg tega so jih uporabljali tudi za zdravljenje epilepsije, saj poročajo o učinkih na motorične in senzorične funkcije, in kot baktericidno sredstvo (23). Leta 1951 je Sandberg določil osnovne zahteve, ki jih morajo imeti barbiturati za dobre hipnotične učinke. Ključno je to, da je njihov porazdelitveni koeficient (lipofilnost/hidrofilnost) v ustreznem območju. Ustrezne hipnotične, antikonvulzivne in anestetične učinke imajo le 5,5-disubstituirane barbiturne kisline, 5,5-disubstituirane tiobarbiturne kisline in 1,5,5-trisubstituirane barbiturne kisline (24).

Okoli leta 1960 se je zaradi številnih neželenih učinkov, tveganj povezanih s prevelikimi odmerki in razvoja novih, učinkovitejših zdravil z blažjimi stranskimi učinki uporaba barbituratov začela zmanjševati (22). Zaradi neželenih učinkov ter povzročanja tolerance in odvisnosti je danes njihova uporaba močno upadla (24).

V zadnjih letih so barbiturati in tiobarbiturati pritegnili precejšnjo pozornost zaradi učinkov, kot so inhibicija kolagenaze-3, matrične metaloproteaze, encimov citokroma P450, metionin aminopeptidaze-1, tirozinaze in ureaze. Prav tako so številne raziskave usmerjene k proučevanju njihovega antioksidativnega delovanja.

Številni 5-arilidenski derivati (tio)barbiturne kisline imajo poleg antibakterijskega delovanja in zaviranja ureaze, dokazano tudi antioksidativno delovanje. Ti derivati nastanejo pri reakciji (tio)barbiturne kisline z aromatskimi aldehidi v t.i. Knoevenaglovi kondenzaciji (25). 5-Ariliden-(tio)barbiturati vsebujejo polarizirano eksociklično dvojno vez s pozitivnim delnim nabojem na ogljikovem atomu, zato so lahko podvrženi številnim kemijskim spremembam. Ena izmed možnih reakcij je nukleofilna adicija, kjer pride do adicije aminov, tiolov, vode in C-nukleofilov iz aktivnih metilenskih skupin in nastanejo t.i. Michaelovi adukti (26).

## 2 NAMEN DELA

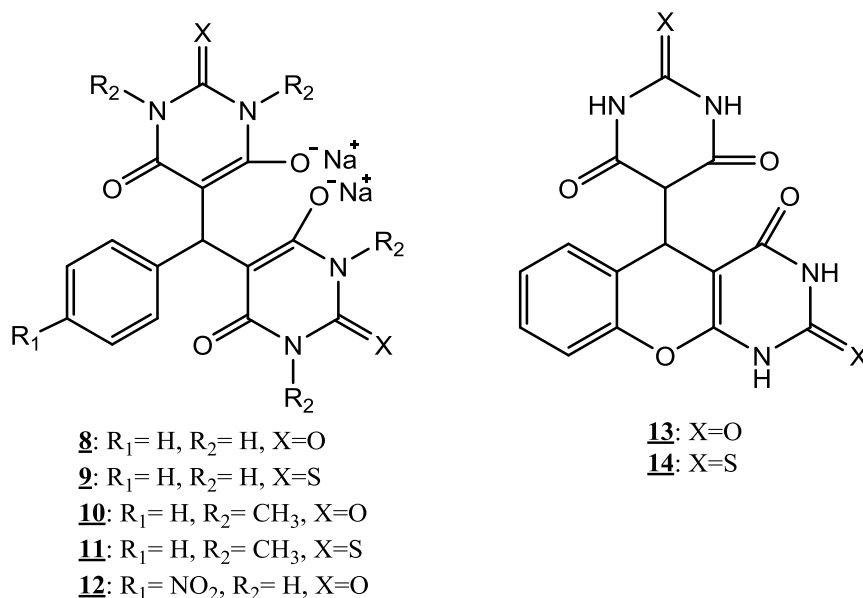
V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali manjšo serijo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) (**8**, **10**, **12**, Slika 3), 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituraoov) (**9**, **11**, Slika 3) in 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-kromeno-[2,3-*d*]pirimidin-5-il)pirimidionov (**13**, **14**, Slika 3) ter jih kemijsko in biološko ovrednotili. Namen sinteze derivatov barbiturne in tiobarbiturne kisline je določiti moč njihovega antioksidativnega delovanja s pomočjo DPPH-testa, izračunati vrednosti srednjih efektivnih koncentracij ( $EC_{50}$ ) za vse derivate in te vrednosti med seboj kritično primerjati. Uporaba antioksidantov je razširjena na mnogih področjih, med drugim v farmaciji in kozmetologiji. S sintezo novih potencialnih antioksidantov v okviru diplomske naloge bomo razširili znanje na tem področju in prispevali k razjasnitvi odnosa med njihovo strukturo in delovanjem.

### 2.1 NAČRTOVANJE POTENCIALNIH ANTIOKSIDANTOV

S pripravo manjše serije 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov) želimo ugotoviti, kako na njihovo antioksidativno delovanje vplivajo spremembe na osnovnem skeletu, ki vključujejo zamenjavo barbiturnih obročev s tiobarbiturnimi (spojini **9** in **11**), substitucijo dušikovih atomov na (tio)barbiturnem obroču z metilnimi skupinami (spojini **10** in **11**) in uvedbo nitro skupine na fenilni obroč (spojina **12**). Prav tako nas zanima antioksidativno delovanje dveh spojin, (2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-kromeno-[2,3-*d*]pirimidin-5-il)pirimidionov **13** in **14**, ki se po zgradbi od ostalih derivatov razlikujeta v tem, da vsebujeta dodatno intramolekularno etrsko vez.

Najprej bomo iz malonske kisline in *N,N'*-dimetilsečnine ali *N,N'*-dimetiltiosečnine sintetizirali *N,N'*-dimetilbarbiturno kislino in *N,N'*-dimetiltiobarbiturno kislino, ki ju bomo uporabili v nadaljnjih reakcijah. Nato bomo s Knoevenaglovo kondenzacijo in Michaelovo adicijo pripravili pet 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov) (**8-11**, Slika 3). V sintezi bomo uporabili različno substituirane benzaldehide in na ta način primerjali vpliv različnih strukturnih elementov oziroma pripetih skupin na antioksidativno delovanje. Tako bomo med spojinama **8** in **9**, ki vsebujeta na dušikovih atomih H-atome, ter spojinama **10** in **11**, ki vsebujeta na dušikovih atomih metilne skupine, primerjali vpliv dodatnih metilnih skupin na delovanje. Poleg tega bomo preverili tudi vpliv zamenjave kisikovega atoma v barbiturnem obroču (spojini **8** in

**10**) z žveplom (spojini **9** in **11**). S sintezo spojine **12**, ki ima na fenilnem obroču pripeto elektron-akceptorsko nitro skupino, bomo, ob primerjavi s spojino **8**, ki na fenilnem obroču nima nobenega substituenta, preverili vpliv nitro skupine na antioksidativno delovanje. Sintetizirali bomo tudi spojini **13** in **14**, ki se od ostalih spojin razlikujeta v tem, da vsebujeta dodatno intramolekularno etersko vez (Slika 3).



**Slika 3:** Strukture načrtovanih 5,5'-(fenilmetilen)bis((tio)barbituratov) (**8-12**) in (2,3,4,5-tetrahidro-1H-kromeno-[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidionov (**13, 14**).

## 2.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Vsem sintetiziranim spojinam bomo določili antioksidativno delovanje s pomočjo DPPH-testa. To je najpogosteje uporabljena *in vitro* metoda za določanje antioksidativnega delovanja. Test temelji na spremljanju redukcije stabilnega radikala DPPH, pri čemer pride do spremembe barve iz vijoličaste v blede rumeno. Najprej bomo za vzorce izbrali ustrezno topilo, v katerem so ti dobro topni. Nato bomo v končni točki reakcije z UV/VIS-spektrofotometrom pri valovni dolžini 515 nm izmerili absorbanco, ki je sorazmerna s količino reducirane oblike DPPH in s tem tudi z antioksidativnim delovanjem testiranih spojin. Rezultate bomo podali kot vrednost EC<sub>50</sub>, ki je definirana kot koncentracija substrata, ki povzroči redukcijo 50 odstotkov DPPH. Na podlagi teh vrednosti bomo nato primerjali antioksidativno delovanje spojin glede na standard ( $\alpha$ -tokoferol) in med seboj ter skušali ugotoviti, kateri del molekule je odgovoren za boljše ali slabše antioksidativno delovanje oz. kaj vpliva na razlike v antioksidativnem delovanju sintetiziranih spojin.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **TOPILA IN REAGENTI**

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabljali topila in reagente naslednjih proizvajalcev: Fluka, Merck, Acros Organics, Sigma-Aldrich in Carlo Erba. Uporabljali smo deionizirano vodo, ki je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo.

#### **APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA**

Analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245

Precizna tehtnica: Mettler Toledo PB403

Polavtomatske pipete: Thermo scientific in BRAND

Nastavki za pipete: BRAND

Kivete: 1.5 mL semi-mikro kivete za enkratno uporabo, dimenzije 12.5 x 12.5 x 45 mm, BRAND

Rotavapor: Büchi 461 WaterBath

Ultrazvočna kopel: Sonis 3 Iskra

#### **PROGRAMSKA OPREMA**

Program ChemBioDraw Ultra 14.0 proizvajalca CambridgeSoft smo uporabili za risanje kemijskih struktur in reakcij, poimenovanje sintetiziranih spojin in izračun njihovih molekulskih mas.

S programom OriginPro 9.0 smo iz dobljenih absorbanca za vsako spojino posebej narisali grafe in določili enačbe premic. V programu MS Excel 2010 smo izračunali vrednosti EC<sub>50</sub> statistične parametre.

#### **KARAKTERIZACIJA SINTETIZIRANIH SPOJIN**

JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR): Za merjenje spektrov <sup>1</sup>H in <sup>13</sup>C smo uporabili spektrofotometer Bruker Avance DPX 400 na Fakulteti za farmacijo. Vzorce smo posneli v devteriranem topilu DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 400 MHz. Dobljene spektre smo analizirali s programom MestReC 4.7.0.0.

INFRARDEČA (IR) SPEKTROSKOPIJA: Za merjenje IR spektrov smo uporabili spektrofotometer Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo. Pri



merjenju smo uporabili tehniko oslabiljene popolne odbojnosti (ATR). Dobljene spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA: Za določitev absorpcijskega maksimuma raztopine DPPH smo uporabili UV/VIS spektrofotometer CARY 50 CONC na Fakulteti za farmacijo.

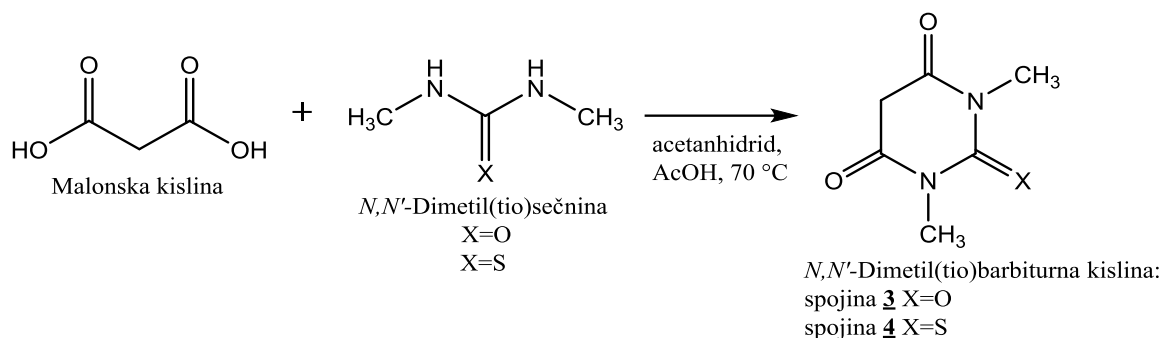
DOLOČANJE TALIŠČ: Tališča sintetiziranih spojin smo določili z mikroskopom z ogrevalno mizico, ki služi določanju temperature tališča trdnih kristaliničnih spojin. Proizvajalec mikroskopa je Leica.

DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA: Za določitev antioksidativnega delovanja spojin smo uporabili test DPPH, ki temelji na redukciji stabilnega radikala DPPH. Pri testu smo za merjenje absorbanc uporabili mikrotitrne ploščice s šestindevetdesetimi vdolbinami, protokol meritve smo nastavili v programu Gen5 Biotek in z mikrotitrskim čitalcem Synergy H4 Hybrid Reader Biotek izmerili absorbance.

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 SINTEZA

#### 4.1.1 Sinteza *N,N'*-dimetilbarbiturzne kisline (**3**) in *N,N'*-dimetilbarbiturzne kisline (**4**)



**Slika 4:** Reakcijska shema sinteze spojin **3** in **4**.

V 100 mL bučko smo natehtali malonsko kislino (1 ekvivalent) in dimetil(tio)sečnino (1,00 g; 1 ekvivalent). Nato smo dodali očetno kislino (40 mL) in acetanhidrid (2 ekvivalenta) ter reakcijsko zmes 24 ur mešali na oljni kopeli pri 70 °C. Zatem smo na rotavaporju pri povišani temperaturi (55 °C) odparili topilo. Produkt v bučki je bil rumenkaste barve in oljnate konsistence. Temu smo nato dodali etanol in na rotavaporju ponovno, pri isti temperaturi odparili topilo. Preostanku smo dodali dietileter, vsebino premešali in zopet odparili topilo na rotavaporju. Na dnu bučke smo dobili oborino, ki smo jo suspendirali v dietiletru, jo odnučali ter sprali z dietiletrom. Produkt smo 15 min sušili v sušilnik na 65 °C, da smo odstranili ves dietileter. Kot produkt smo v primeru *N,N'*-dimetilbarbiturzne kisline (**3**) dobili 732 mg belega praška, v primeru *N,N'*-dimetiltiobarbiturzne kisline (**4**) pa 586 mg rumenih kristalov.

#### Lastnosti produkta:

*N,N'*-dimetilbarbiturna kislina (**3**)

Izgled: bela trdna snov

Molekulska masa: 156.14 g/mol

Izkoristek reakcije: 41%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.12 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm

*N,N'*-dimetiltiobarbiturna kislina (**4**)

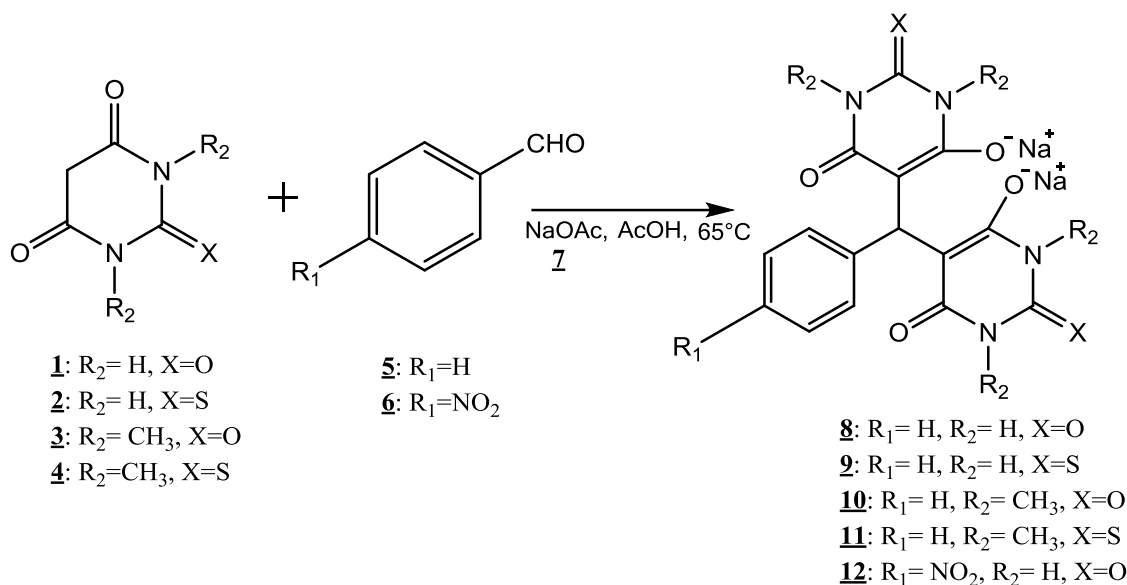
Izgled: rumeni kristali

Molekulska masa: 172.20 g/mol

Izkoristek reakcije: 35%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.56 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 1H), 5.17 (s, 1H) ppm

#### 4.1.2 Splošni postopek za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) **8**, **10** in **12** ter 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov) **9** in **11**



**Slika 5:** Reakcijska shema sinteze 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) **8**, **10** in **12** ter 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov) **10** in **11**.

V 50 mL bučko smo odmerili (dimetil)(tio)barbiturno kislino (1 ekvivalent; **1-4**) in natrijev acetat (1 ekvivalent; **7**). Reagente smo raztopili v očetni kislini (20 mL) in dodali (4-nitro)benzaldehyd (1 ekvivalent **5** ali **6**) ter reakcijsko zmes mešali 10 ur na oljni kopeli pri 65 °C. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo.

#### Sinteza natrijevega 5,5'-(fenilmetilen)bis(2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-oleata) (**8**)

Spojino **8** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov)*, pri čemer smo v reakciji uporabili benzaldehyd (95.7 µL; 100 mg; 0.94 mmol; **5**) in barbiturno kislino (121 mg; 0.94 mmol; **1**).

Nastala je oborina, ki smo jo odnučali ter sprali z očetno kislino. Oborino smo 1 uro sušili v sušilniku na 60 °C, da smo iz produkta odstranili vso očetno kislino. Ker je NMR analiza spojine pokazala, da je v vzorcu prisoten še zaostanek očetne kisline, smo spojino suspendirali v dietiletru, suspenzijo postavili za 2 minuti v ultrazvočno kopel in ponovno odnučali ter sprali z dietiletrom. Produkt smo 1 uro sušili v sušilniku na 60 °C. NMR analiza je pokazala, da smo odstranili večino očetne kisline.

**Lastnosti produkta:**

Izgled: beli kristali

Molekulska masa: 388.24 g/mol

Izkoristek reakcije: 21%

T tališča: > 250 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.94 (s, 1H, CH), 7.01-7.03 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.12-7.16 (m, 2H, 2 x Ar-H), 10.01 (s, 4H, 4 x NH) ppm

IR (ATR) ν [cm<sup>-1</sup>] = 3580, 3138, 2980, 2628, 1686, 1599, 1478, 1374, 1302, 1245, 1159, 1119, 1047, 891, 810, 776, 765, 735, 702, 679, 642, 539

**Sinteza natrijevega 5,5'-(fenilmetilen)bis(6-okso-2-tiokso-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-oleata) (9)**

Spojino **9** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov)*, pri čemer smo v reakciji uporabili benzaldehid (95.7 μL; 100 mg; 0.94 mmol; **5**) in tiobarbiturno kislino (136 mg; 0.94 mmol; **2**).

Nastala je oborina, ki smo jo odnučali ter sprali z etanolom. Vzorec smo 1 uro sušili v sušilniku na 60 °C, da smo odparili očetno kislino in etanol. Ker je NMR analiza vzorca pokazala, da je v vzorcu še zaostanek očetne kisline, smo ga suspendirali v dietiletru, suspenzijo postavili za 2 minuti v ultrazvočno kopel in ponovno odnučali ter sprali z dietiletrom. Produkt smo 1 uro sušili v sušilniku na 60 °C. NMR analiza pokazala, da smo odstranili večino očetne kisline.

**Lastnosti produkta:**

Izgled: rumena trdna snov

Molekulska masa: 420.37 g/mol

Izkoristek reakcije: 18%

T tališča: >250 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.97 (s, 1H, CH), 6.99-7.08 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.15-7.19 (m, 2H, 2 x Ar-H), 11.50 (s, 2H, 2 x NH), 11.63 (s, 2H, 2 x NH) ppm

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 30.29, 95.71, 124.71, 126.43, 127.51, 142.86, 162.51, 163.62, 172.63 ppm

IR (ATR) v [cm<sup>-1</sup>] = 3548, 3105, 2893, 1593, 1526, 1491, 1446, 1366, 1303, 1202, 1176, 1131, 1004, 862, 799, 767, 721, 612, 524, 501

**Sinteza natrijevega 5,5'-(fenilmetilen)bis(1,3-dimetil-2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-oleata) (10)**

Spojino **10** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov)* v razmerju benzadehid:dimetilbarbiturna kislina (1:2). V predhodnem poskusu v razmerju 1:1 je namreč bil v vzorcu zaostanek nezreagirane izhodne spojine **5**, ki je tudi po čiščenju z dietiletrom nismo mogli odstraniti. Benzaldehidu (33 µL; 34 mg; 0.32 mmol; **5**) smo dodali dimetilbarbiturno kislino (100 mg; 0.64 mmol; **3**).

Po ohladitvi reakcijske zmesi na sobno temperaturo ni nastala oborina, zato smo na rotavaporju odparili očetno kislino pri 60 °C. V bučki je ostal rumen oljnat zaostanek. Temu smo nato dodali dietil eter, bučko stresali v ultrazvočni kopeli in nato na rotavaporju odparili dietileter pri 45 °C. Na dnu bučke je nastala rumena oborina. To smo suspendirali v dietil etru, bučko za nekaj minut izpostavili ultrazvočni kopeli in produkt odnučali ter sprali z dietiletrom. Produkt smo sušili v sušilnik na 65 °C pol ure, da smo popolnoma odstranili topila.

Ker je NMR analiza vzorca pokazala zaostanek natrijevega acetata (**7**), smo vzorcu dodali topilo v katerem natrijev acetat ni topen - acetonitril - in preostalo oborino odnučali. V filtratu smo tako dobili raztopljeno spojino **10**. Nato smo na rotavaporju pri 45 °C odparili topilo. Na dnu bučke je nastala bela oborina. Suspendirali smo jo v dietiletru in jo odnučali ter sprali z dietiletrom. NMR analiza je pokazala, da je bilo čiščenje spojine uspešno.

**Lastnosti produkta:**

Izgled: svetlo rumeni kristali

Molekulska masa: 444.35 g/mol

Izkoristek reakcije: 39%

T tališča: >250 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.15 (s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>), 6.22 (s, 1H, CH), 7.02-7.04 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.12-7.16 (m, 2H, 3 x Ar-H) ppm

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 27.86, 33.12, 91.01, 124.32, 126.57, 127.37, 143.97, 151.26, 162.93 ppm

IR (ATR) v [cm<sup>-1</sup>] = 2935, 1692, 1667, 1583, 1490, 1450, 1390, 1357, 1322, 1280, 1254, 1217, 1122, 1035, 982, 949, 866, 826, 797, 769, 760, 743, 723, 692, 662, 646, 629, 615, 505

**Sinteza natrijevega 5,5'-(fenilmetilen)bis(1,3-dimetil-6-okso-2-tiokso-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-oleata) (11)**

Spojino 11 smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov)*, pri čemer smo v reakciji uporabili benzaldehid (95.7 µL; 100 mg; 0.94 mmol; 5) in dimetiltiobarbiturno kislino (162 mg; 0.94 mmol; 4).

Po ohladitvi na sobno temperaturo ni nastala oborina, zato smo na rotavaporju odparili očetno kislino pri 60 °C. Na dnu bučke je po odparitvi topila nastala oborina. To smo suspendirali v dietiletru, bučko za nekaj minut izpostavili ultrazvočni kopeli in nato produkt odnučali ter sprali z dietiletrom. Produkt smo pol ure sušili v sušilniku na 60 °C, da smo odparili topilo. NMR analiza je pokazala, da je še vedno prisotnega nekaj topila in da je prisoten tudi ostanek natrijevega acetata (7). Vzorcju smo zato dodali acetonitril, v katerem je končna spojina 11 dobro topna, medtem ko je natrijev acetat netopen. Tako smo dobljeno zmes odnučali, sprali z acetonitrilom in v filtratu dobili raztopljen produkt. Iz bučke smo nato na rotavaporju pri 45 °C odparili topilo in na dnu bučke dobili oborino. Čiščenje je bilo, glede na rezultate NMR analize uspešno.

**Lastnosti produkta:**

Izgled: roza kristali

Molekulska masa: 476.06 g/mol

Izkoristek reakcije: 32%

T tališča: 227-231 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.63 (s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>), 6.33 (s, 1H, CH), 7.02-7.09 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.16-7.19 (m, 2H, 2 x Ar-H) ppm

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 33.65, 35.56, 95.81, 117.99, 124.80, 126.42, 127.67, 142.16, 161.26, 161.67, 174.98 ppm

IR (ATR) v [cm<sup>-1</sup>] = 3444, 2912, 2259, 1638, 1610, 1588, 1491, 1448, 1399, 1362, 1330, 1302, 1246, 1207, 1179, 1102, 1030, 932, 886, 789, 755, 739, 721, 697, 651, 628, 569, 515

**Sinteza natrijevega 5,5'-((4-nitrofenil)metilen)bis(2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-oleata) (12)**

Spojino 12 smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov)*, pri čemer smo v reakciji uporabili 4-nitrobenzaldehyd (100 mg; 0.66 mmol; 6) in barbiturno kislino (84.8 mg; 0.66 mmol; 1).

Nastala je oborina, ki smo jo odnučali in sprali z očetno kislino. Dobljen produkt smo 1 uro sušili na 80 °C, da smo odparili očetno kislino. NMR analiza je pokazala, da je produkt ustrezen in čist.

**Lastnosti produkta:**

Izgled: rumeni kristali

Molekulska masa: 433.24 g/mol

Izkoristek reakcije: 36%

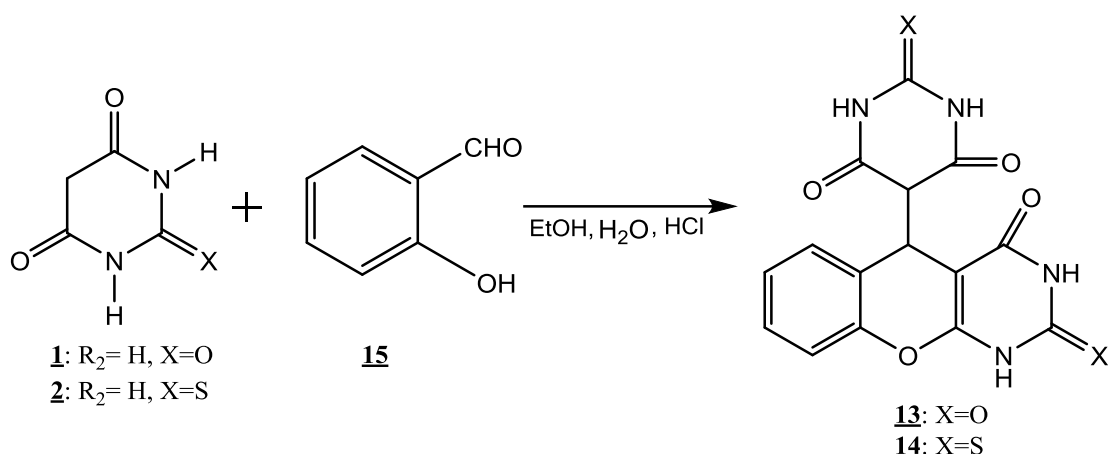
T tališča: >250 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.05 (s, 1H, CH), 7.27 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, 2 x Ar-H), 8.06 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, 2 x Ar-H), 10.15 (s, 4H, 4 x NH) ppm

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31.15, 90.37, 122.74, 127.75, 144.83, 150.55, 154.17, 164.29, 165.28 ppm

IR (ATR)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3341, 2941, 2820, 1688, 1590, 1509, 1489, 1410, 1343, 1226, 1183, 1157, 1113, 1088, 1012, 879, 837, 797, 776, 752, 718, 631, 552

#### 4.1.3 Splošni postopek za sintezo 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1H-kromeno-[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidionov **13** in **14**



Slika 6: Reakcijska shema sinteze 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1H-kromeno-[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidionov **13** in **14**.

V 50 mL bučko smo natehtali barbiturno ali tiobarbiturno kislino (500 mg; 2 ekvivalenta; **1** ali **2**) in odmerili salicilaldehid (1 ekvivalent; **15**). V bučko smo nato po vrsti dodali etanol (9 mL), vodo (5 mL) in klorovodikovo kislino (1 mL). Reakcijsko zmes smo čez noč mešali na oljni kopeli pri 100 °C. Bučko smo ohladili na sobno temperaturo in nastalo oborino odnučali in sprali z vodo, etanolom in etrom. Suhemu produktu smo dodali 5 mL očetne kisline in čez noč segrevali na oljni kopeli pri 70 °C. Na rotavaporju smo odparili očetno kislino pri 50 °C.

#### Sinteza 5-(2,4-dioksa-1,3,4,5-tetrahidro-2H-kromeno[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (**13**)

Spojino **13** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1H-kromeno-[2,3-d]pirimidin-5-il)pirimidionov*, pri čemer smo v reakciji uporabili barbiturno kislino (500 mg; 3.90 mmol; **1**) in salicilaldehid (205 µL; 238 mg; 1.95 mmol; **15**).

#### Lastnosti produkta:

Izgled: svetlo rjavi kristali

Molekulska masa: 342.26 g/mol

Izkoristek reakcije: 83%

T tališča: 227 – 233 °C



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3.85 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, CH), 4.72 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, CH), 7.08-7.24 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.32-7.36 (m, 1H, Ar-H), 10.99 (s, 1H, NH), 11.19 (s, 1H, NH), 11.30 (s, 1H, NH), 11.98 (s, 1H, NH) ppm

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  33.49, 53.18, 85.08, 116.36, 120.77, 125.48, 127.92, 129.12, 148.99, 149.43, 150.44, 155.28, 163.40, 168.84, 169.50 ppm

MS (ESI): 341.1 [M-H]<sup>-</sup>

IR (ATR)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3480, 3276, 3219, 2861, 1695, 1672, 1646, 1581, 1522, 1492, 1457, 1442, 1424, 1376, 1353, 1332, 1278, 1242, 1226, 1198, 1181, 1096, 1043, 889, 875, 786, 763, 746, 691, 662, 633, 615, 563, 551, 537, 516, 507

**Sinteza**      **5-(4-okso-2-tiokso-1,3,4,5-tetrahidro-2*H*-kromeno[2,3-*d*]pirimidin-5-il)-2-tioksodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**14**)**

Spojino **14** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-(2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-kromeno-[2,3-*d*]pirimidin-5-il)pirimidionov*, pri čemer smo v reakciji uporabili tiobarbiturno kislino (500 mg; 3.47 mmol; **2**) in salicilaldehid (183  $\mu$ L; 1.74 mmol; **15**).

**Lastnosti produkta:**

Izgled: beli kristali

Molekulska masa: 374.39 g/mol

Izkoristek reakcije: 89%

T tališča: > 250 °C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  5.12 (s, 1H, CH), 6.99-7.01 (m, 1H), 7.10-7.13 (m, 2H), 7.21-7.26 (m, 2H), 11.79 (s, 1H, NH), 12.20 (s, 1H, NH), 12.34 (s, 1H, NH), 13.30 (s, 1H, NH) ppm

MS (ESI): 373.05 [M-H]<sup>-</sup>

IR (ATR)  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3279, 3056, 2900, 2731, 2008, 1761, 1678, 1650, 1595, 1555, 1528, 1484, 1451, 1417, 1378, 1359, 1302, 1275, 1234, 1221, 1201, 1189, 1172, 1128, 1103, 1079, 992, 951, 885, 781, 754, 740, 707, 684, 638, 611, 598, 569, 539, 529, 515

## **4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA**

### **4.2.1 Priprava raztopine DPPH in vzorcev**

V okviru izvedbe DPPH-testa smo najprej pripravili raztopino DPPH. V 25 mL bučko z ravnim dnom smo natehtali 6.90 mg DPPH. Bučko smo do polovice napolnili z metanolom in kristale DPPH razbili s pomočjo ultrazvočne kopeli, tako da se je ves DPPH raztopil. Nato smo dodali metanol do oznake in vse skupaj premešali. Koncentracija nastale raztopine je bila 700  $\mu\text{M}$ . Raztopino smo do uporabe hranili v hladilnik zavito v aluminijasto folijo, saj je molekula DPPH občutljiva na svetlobo in na povišano temperaturo. Tako pripravljeno raztopino smo uporabljali le dva dni po pripravi, za kasnejša testiranja pa smo po enakem postopku pripravili svežo raztopino.

Osnovno raztopino DPPH s koncentracijo 700  $\mu\text{M}$  smo redčili z metanolom v razmerju 1:4. V 10 mL penicilinko smo s pipeto odmerili 2 mL DPPH, dodali 8 mL metanola ter vse skupaj premešali. Nastala raztopina je imela koncentracijo 140  $\mu\text{M}$ . To raztopino smo nadalje uporabili pri pripravi reakcijskih raztopin. Pripravljene raztopine DPPH smo z UV/VIS spektrofotometrom izmerili absorbanco tako, da smo v kiveto dali 500  $\mu\text{L}$  140  $\mu\text{M}$  raztopine DPPH in 500  $\mu\text{L}$  metanola. Absorbanca 70  $\mu\text{M}$  raztopine DPPH je znašala 0.89, absorpcijski maksimum pa je bil pri 515 nm.

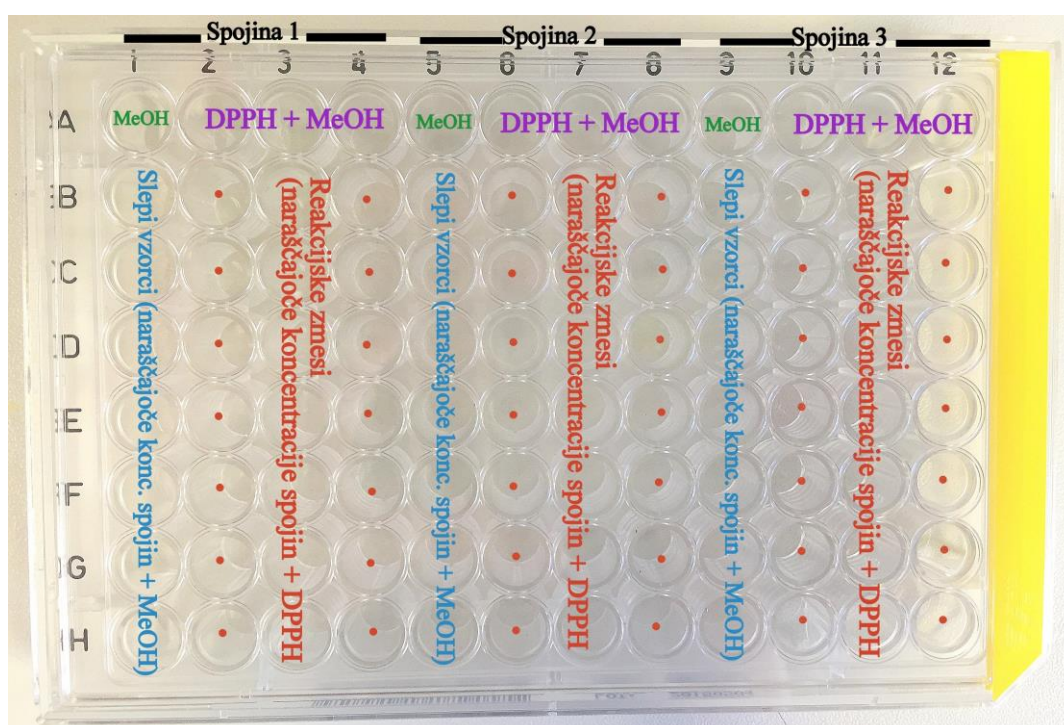
Kot topilo za pripravo raztopin vzorcev smo uporabili metanol, saj se v njem vsi vzorci dobro raztapljajo. Vse raztopine smo pripravili po enakem postopku. Najprej smo v penicilinko natehtali ustrezno količino vzorca, preračunano tako, da smo po dodatku metanola dobili 5 mL 600  $\mu\text{M}$  raztopine. Nato smo z redčenjem te pripravili še šest do sedem raztopin s koncentracijami od 10  $\mu\text{M}$  do 600  $\mu\text{M}$ , ki smo jih uporabili za meritve.

### **4.2.2 Priprava reakcijskih raztopin in določitev vrednosti $EC_{50}$**

Za pripravo reakcijskih raztopin in merjenje absorbance smo uporabili mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami. Na eni mikrotitrski ploščici smo tako pripravili reakcijske raztopine za tri vzorce s sedmimi različnimi koncentracijami. Poleg teh, smo izvedli še meritve za  $\alpha$ -tokoferol, ki je služil kot standard, s katerim smo preverili ustreznost analitske metode. Nanos raztopin je bil za vse vzorce enak. Najprej smo v zgornje štiri vdolbine odmerili 150  $\mu\text{L}$  metanola. Nato smo pod vse te vdolbine navpično navzdol nanесли po 150  $\mu\text{L}$  vzorcev naraščajočih koncentracij. V prvi stolpec smo nato dodali po 150  $\mu\text{L}$  metanola, v vse ostale pa 150  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH (Slika 7). Tako smo ponovili še za naslednja dva vzorca. V

vdolbinah so bile tako pred meritvijo zaradi 2-kratnega redčenja polovične koncentracije predhodno pripravljenih raztopin vzorca, torej od 5  $\mu\text{M}$  do 300  $\mu\text{M}$  in polovične koncentracije raztopin DPPH, torej 70  $\mu\text{M}$ . Prvi stolpec je služil kot slepi vzorec, absorbance teh raztopin pa smo odšteli od izmerjenih absorbanc reakcijskih raztopin. Tako smo dobili absorbance reakcijskih raztopin brez ozadja. Mikrotitrsko ploščo smo pred meritvijo v temi na sobni temperaturi inkubirali 1 uro in pol.

Po inkubaciji smo z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbance. Meritve smo prenesli v program Excel, narisali grafe odvisnosti deleža DPPH od koncentracij vzorca in iz enačbe premice določili vrednosti  $\text{EC}_{50}$ .



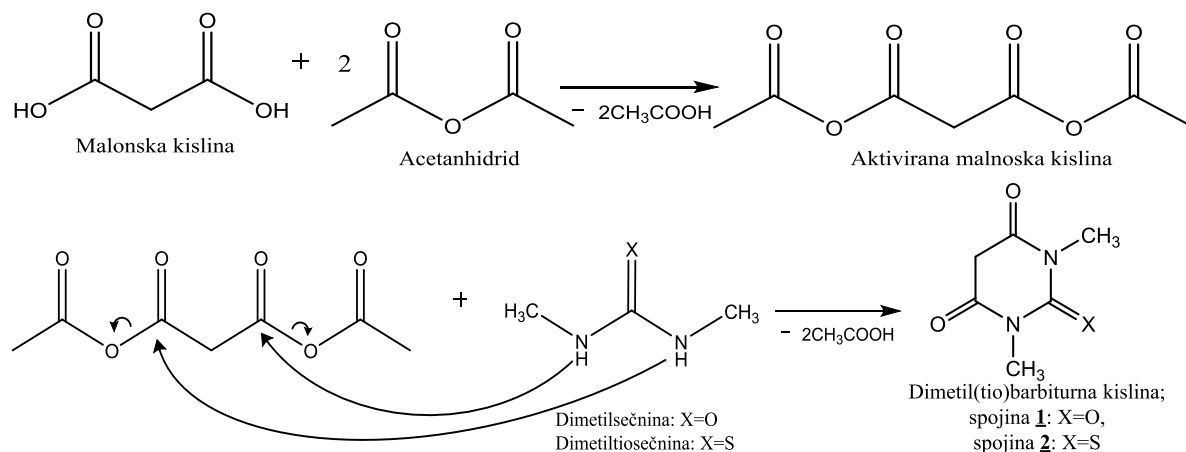
**Slika 7:** Mikrotitrsko ploščica; shema nanašanja razredčin vzorcev, raztopine DPPH in MeOH za testiranje antioksidativnega delovanja treh različnih spojin.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 RAZLAGA REAKCIJSKIH MEHANIZMOV

#### 5.1.1 Sinteza *N,N'*-dimetil(tio)barbiturne kisline (1 in 2)

*N,N'*-Dimetilbarbitruno kislino (1) in *N,N'*-dimiltiobarbiturno kislino (2) smo sintetizirali iz malonske kisline in *N,N'*-dimetilsečnine ali *N,N'*-dimiltiosečnine. Da reakcija poteče, je potrebno najprej aktivirati karbonylni skupini malonske kisline. Aktivacijo smo izvedli preko tvorbe mešanega anhidrida s pomočjo acetanhidrida. V nadaljevanju je sledil nukleofilni napad amskih skupin *N,N'*-dimetil(tio)sečnine na aktivirani karbonylni skupini, odcep dveh molekul očetne kisline in tvorba obroča. Aktivacija in nadaljnji potek reakcije sta prikazana na Sliki 8.



Slika 8: Mehanizem reakcije sinteze spojin 1 in 2.

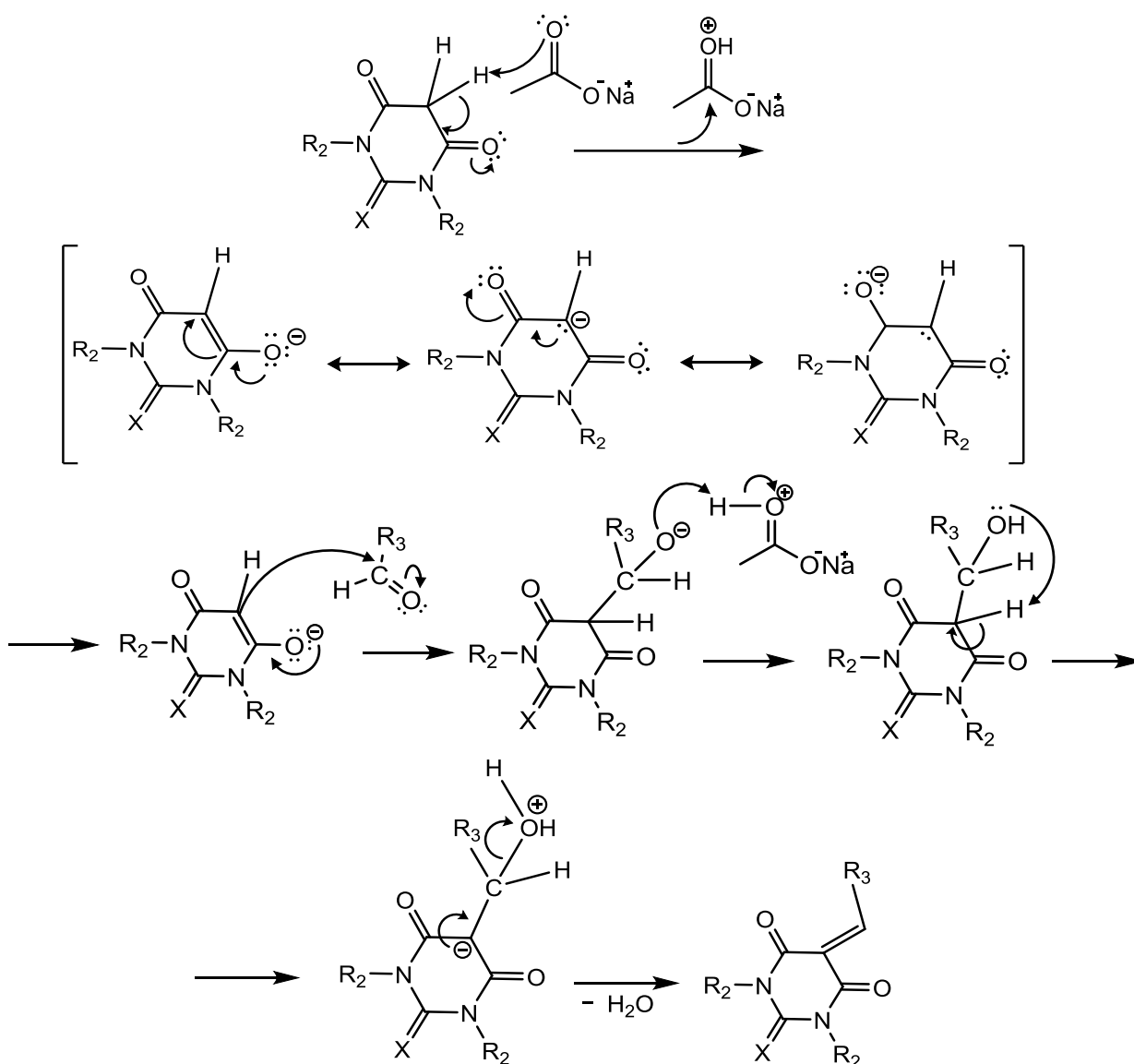
#### 5.1.2 Knoevenaglova kondenzacija in Michaelova adicija

Spojine 8-14 smo pripravili iz različnih benzaldehidov in (tio)barbiturnih ali *N,N'*-dimetil(tio)barbiturnih kislin v dvostopenjskih reakcijah, kjer je najprej prišlo do Knoevenaglove kondenzacije in nato še do Michaelove adicije. Pri vzorcih 13 in 14 je nato prišlo še do intramolekularne tvorbe etrske vezi.

Knoevenaglova kondenzacija je aldolni kondenzaciji sorodna reakcija, ki poteka med aldehidi ali ketoni in spojinami z aktiviranimi metilenskimi skupinami, ob prisotnosti amina ali druge baze kot katalizatorja (27, 28). Pri reakciji pride do adicije aktivirane metilenske skupine na karbonylni skupino aldehida ali ketona s sledečo eliminacijo vode. V prvi stopnji pride do odstranitve protona z  $\alpha$  C-atoma glede na karbonylni skupino pod vplivom baze (v našem primeru natrijevega acetata), pri čemer nastane resonančno

stabiliziran enoladni anion (27, 29). Ta nato reagira z elektropozitivnim ogljikom na aldehidu ali ketonu. Po mehanizmu, ki je prikazan na Sliki 9, nato pride do večstopenjskega bazično kataliziranega prenosa protonov in elektronov in v končni stopnji reakcije do odcepa molekule vode ali kondenzacije (30). Produkt reakcije je  $\alpha,\beta$ -nenasičena karbonilna spojina 5-benziliden(tio)barbiturat.

V našem primeru ima vlogo bazičnega katalizatorja natrijev acetat, kot aldehyd pa smo v našem primeru uporabili benzaldehid oz. pri sintezi spojine **12** 4-nitrobenzaldehyd (Slika 9).

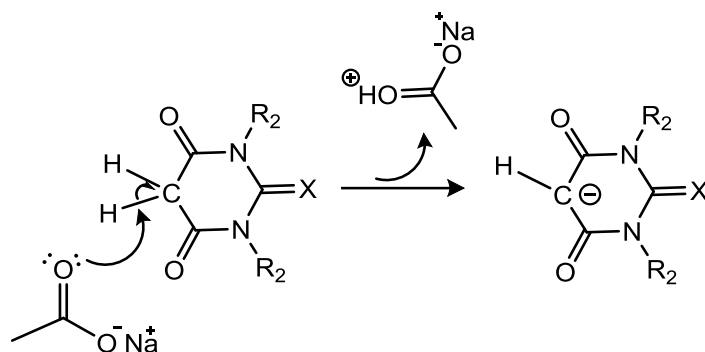


**Slika 9:** Mehanizem Knoevenaglove kondenzacije.

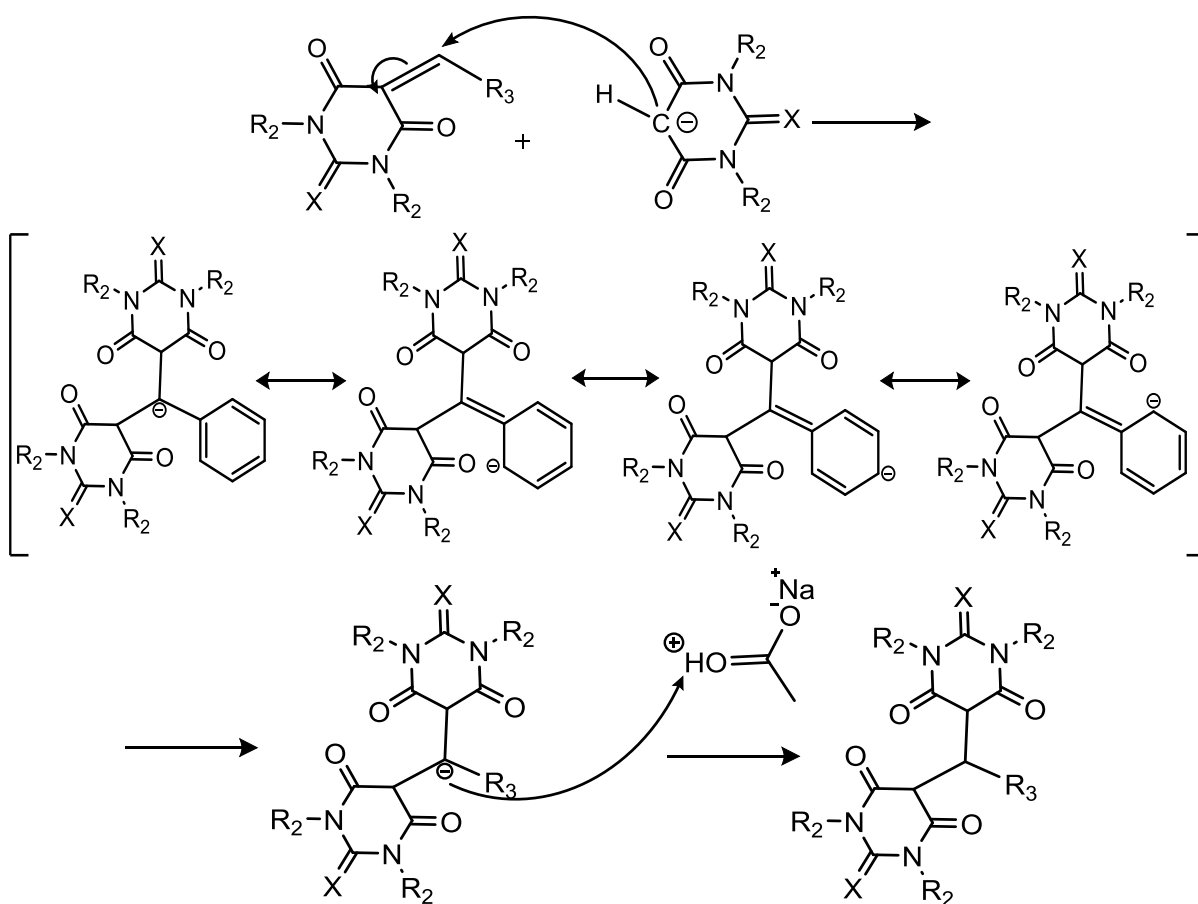
Michaelova adicija je nukleofilna adicija karboanionov ali drugih nukleofilov na  $\alpha,\beta$ -nenasičene karbonilne spojine, t.j. na spojine, ki imajo glede na karbonilno skupino na  $\alpha,\beta$ -

mestu dvojno vez. Michaelova adicija spada v širšo skupino konjugativnih adicij in je zelo pomembna za tvorbo C-C vezi (31).

V našem primeru pride v prvi stopnji iz molekule (tio)barbiturne kisline s pomočjo baze do tvorbe resonančno stabiliziranega karboaniona (Slika 10). Karboanion nato kot nukleofil napade  $\beta$ -ogljikov atom na 5-benziliden(tio)barbituratu. Ko nastali adukt sprejme proton iz konjugirane baze, pride do nevtralizacije molekule in do nastanka tako imenovanega Michaelovega adukta (Slika 11) (31, 32).



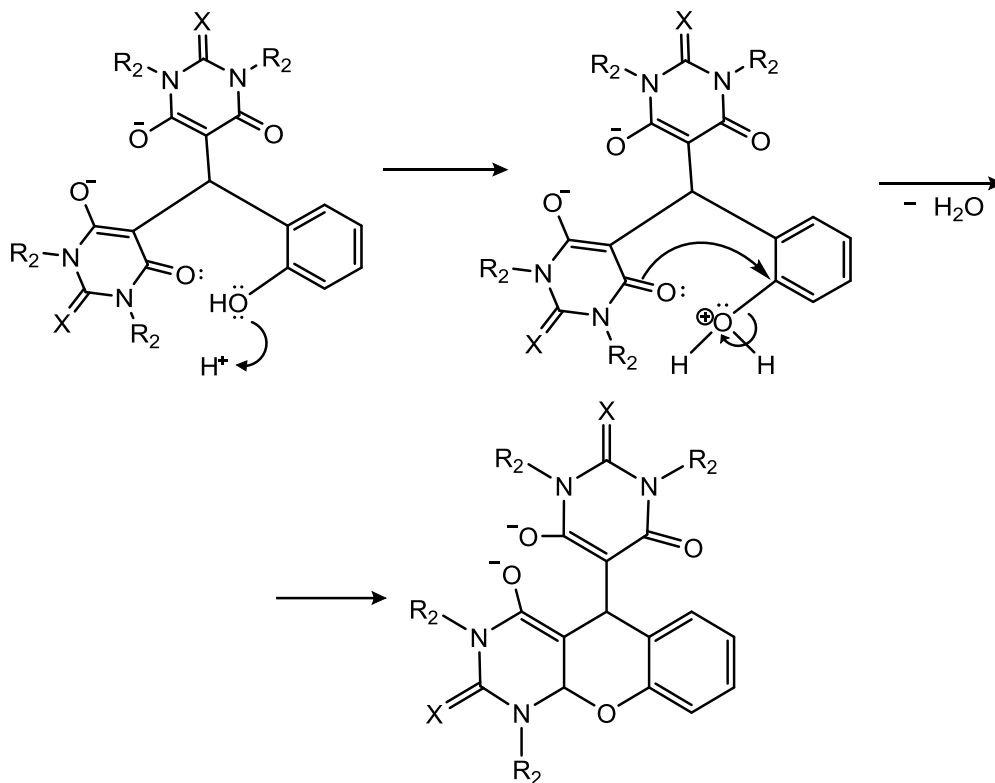
**Slika 10:** Mehanizem nastanka C-nukleofila.



**Slika 11:** Mehanizem Michaelove adicije.

### 5.1.3 Intramolekularna tvorba etrske vezi

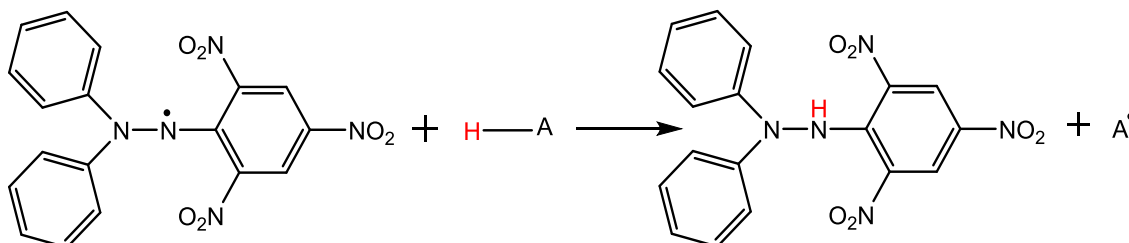
Pri vzorcih **13** in **14** pride poleg Knoeveneglove kondenzacije in Michaelove adicije še do intramolekularne tvorbe etrske vezi. Pri tem nastane šestčlenski obroč, saj je v tej obliki molekula najbolj stabilna.



Slika 12: Mehanizem intramolekularne tvorbe etrske vezi.

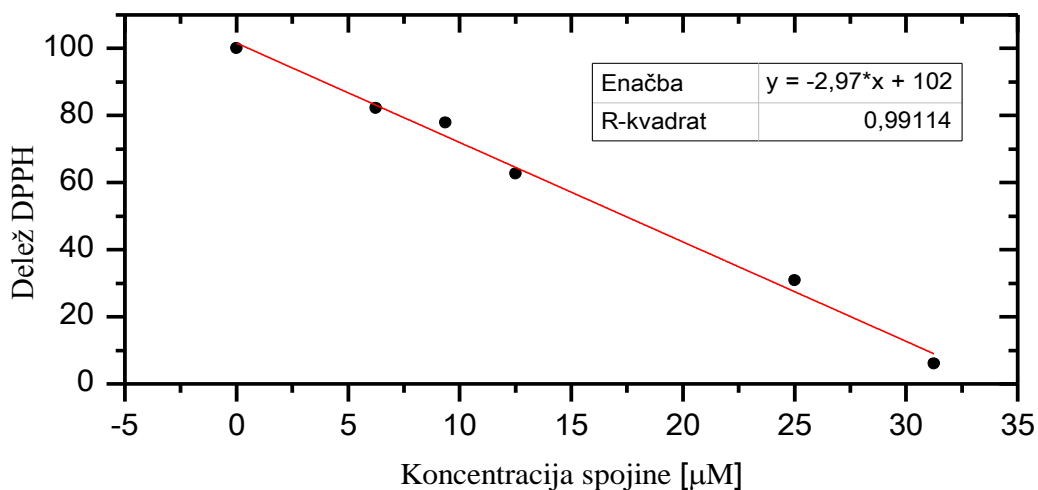
## 5.2 DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Sintetiziranim spojinam smo določili antioksidativno delovanje s pomočjo DPPH-testa. Pri tem testu je prišlo pri reakciji radikala DPPH s testiranimi spojinami do njegove redukcije, torej do nastanka reducirane oblike DPPH-H (Slika 13).



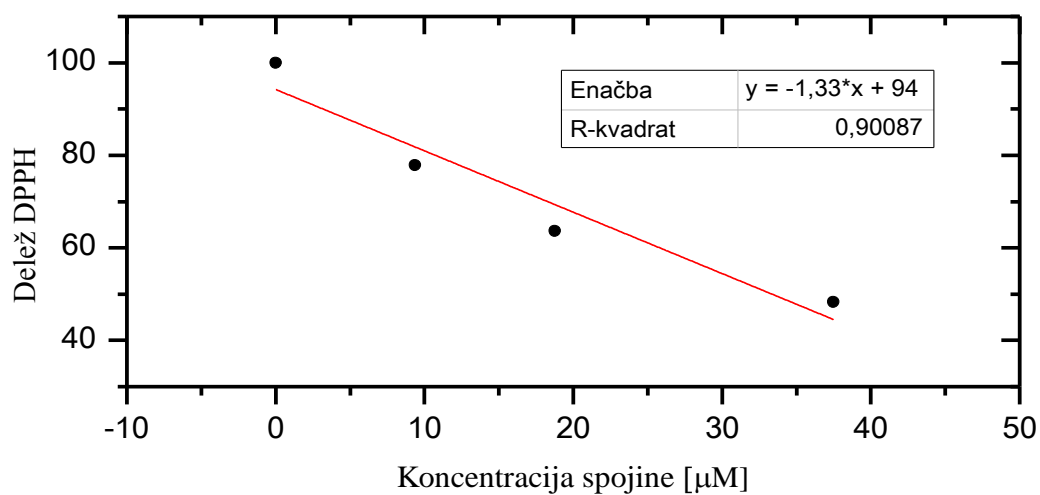
**Slika 13:** Reakcijska shema prenosa vodika z antioksidanta na radikal DPPH. Prirejeno po (32).

Rezultate smo za vsako spojno posebej podali v obliki grafov, ki prikazujejo odvisnost deleža nezreagirane DPPH od koncentracije spojin. Iz enačb premic smo nato izračunali vrednosti srednjih učinkovitih koncentracij ( $EC_{50}$ ). Za natančno določitev vrednosti  $EC_{50}$  je pomembno, da izvedemo zadostno število meritev in da so točke na grafu ustrezno razporejene nad in pod vrednostjo  $EC_{50}$ . Temu primerno smo tudi prilagodili koncentracije vzorcev. Ker so si vzorci strukturno podobni, smo pri meritvah lahko uporabljali podobne koncentracije vzorcev.

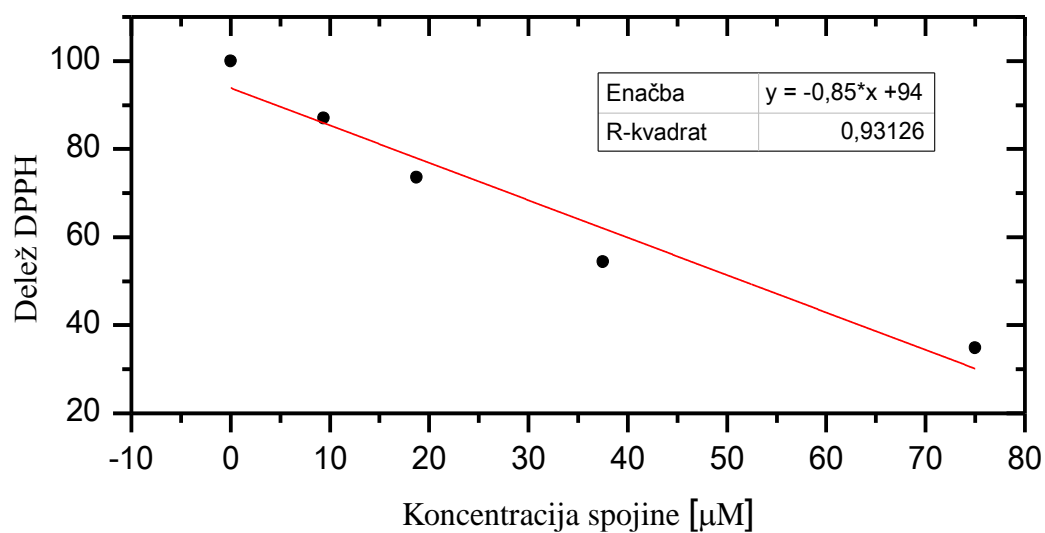


**Slika 14:** Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije  $\alpha$ -tokoferola.

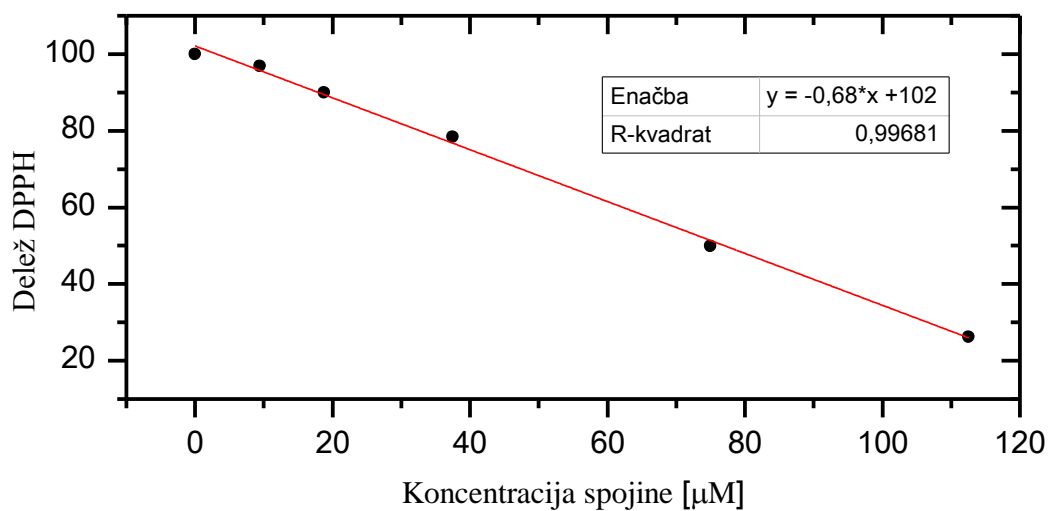




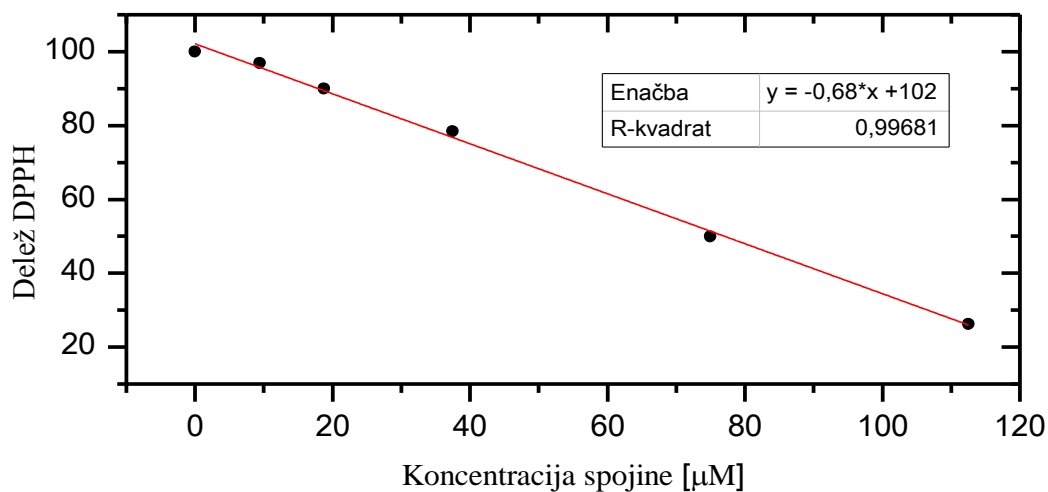
Slika 15: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 8.



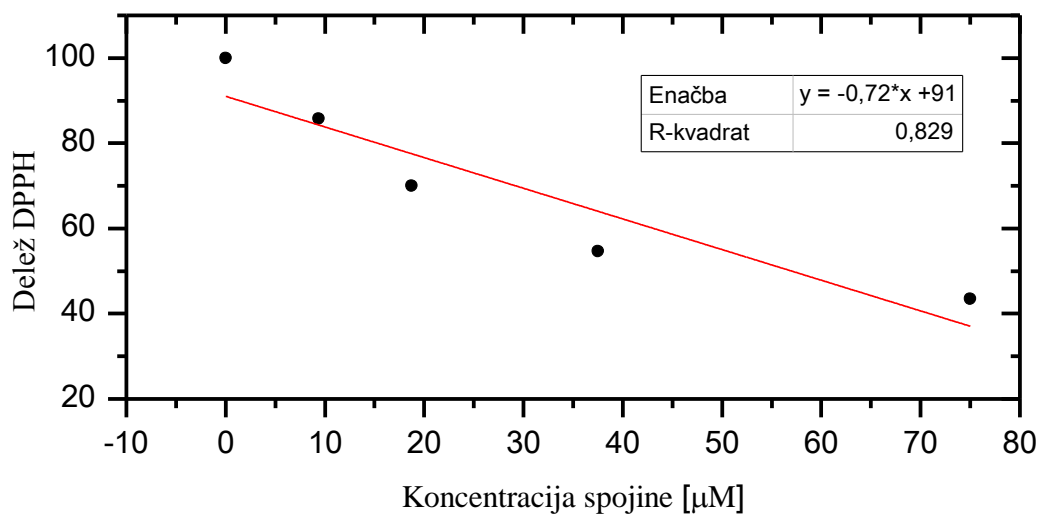
Slika 16: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 9.



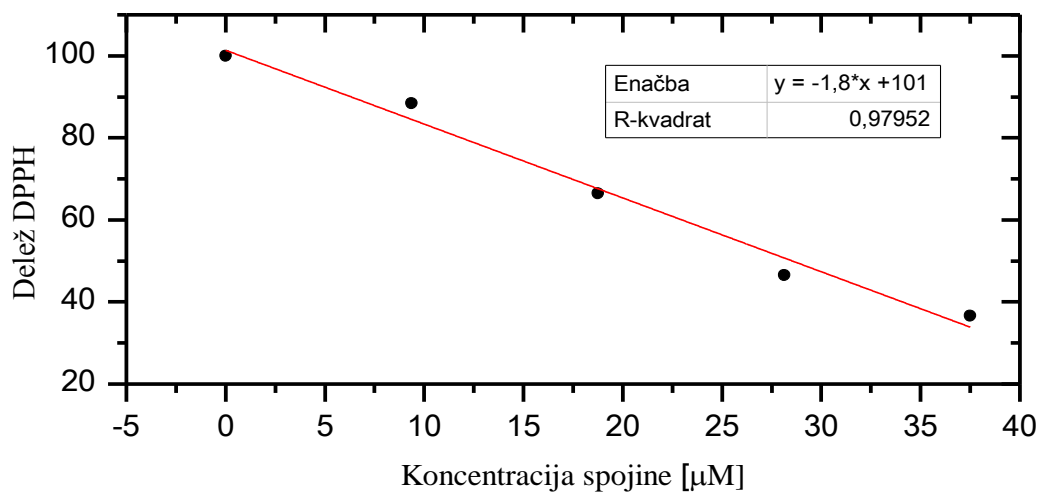
Slika 17: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 10.



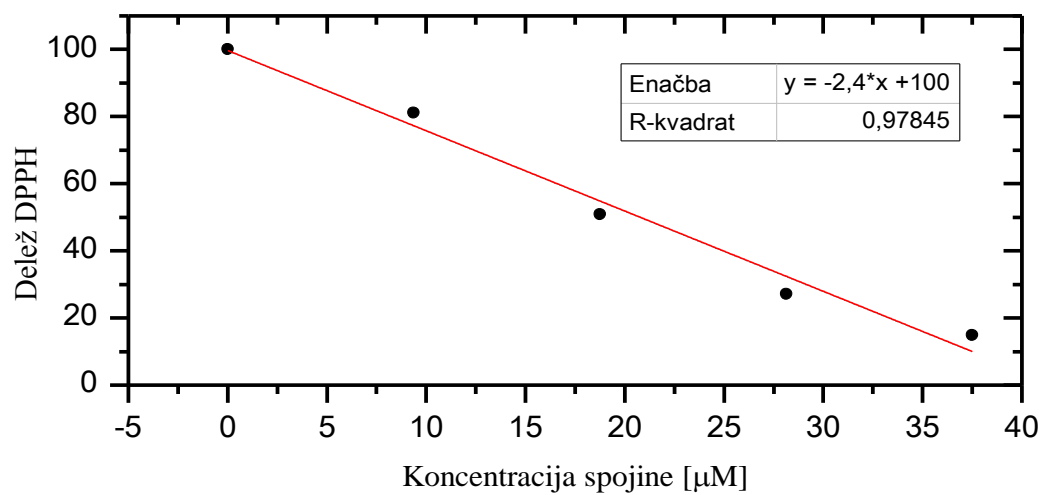
Slika 18: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 11.



Slika 19: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 12.



Slika 20: Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 13.

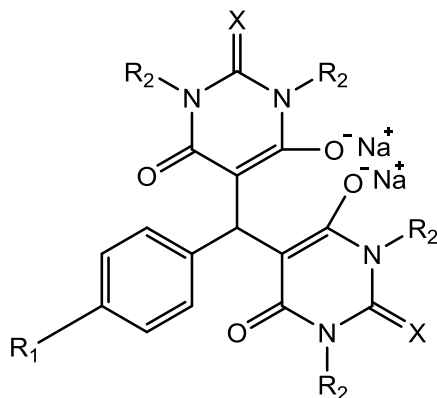


**Slika 21:** Delež nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **14**.

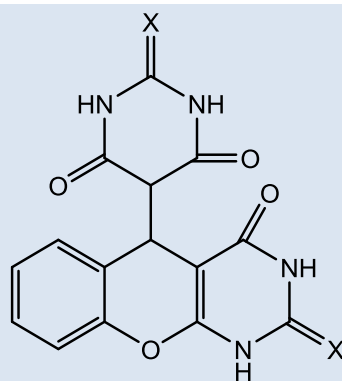
## Vrednosti srednjih efektivnih koncentracij (EC<sub>50</sub>)

V preglednici I smo podali vrednosti EC<sub>50</sub> in standardne napake (SN) za testirane spojine (**8-14**) in za standard  $\alpha$ -tokoferol, izračunane iz umeritvenih premic.

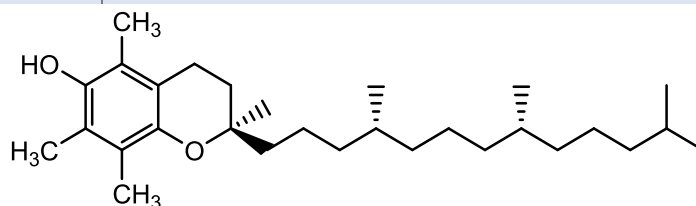
**Preglednica I:** Vrednosti srednjih efektivnih koncentracij (EC<sub>50</sub>) testiranih spojin **8-14** in  $\alpha$ -tokoferola.



SPOJINA	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X	EC <sub>50</sub> ±SN [μM]
<u>8</u>	H	H	O	33.4±5.2
<u>9</u>	H	H	S	51.6±8.0
<u>10</u>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	O	20.0±2.3
<u>11</u>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	77.0±2.5
<u>12</u>	NO <sub>2</sub>	H	O	57.0±13



<u>13</u>	/	/	O	28.5±2.1
<u>14</u>	/	/	S	20.8±2.2



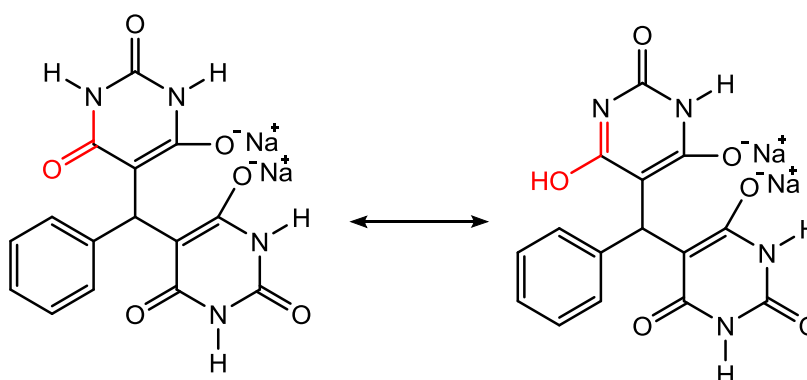
$\alpha$ -Tokoferol	/	/	/	17.4±1.1
---------------------	---	---	---	----------

### 5.3 KOMENTAR REZULTATOV DOLOČITVE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Vsem sintetiziranim spojinam smo določili antioksidativno delovanje s pomočjo DPPH-testa. Izračunane vrednosti  $EC_{50}$  za vse spojine smo med seboj primerjali ter skušali poiskati vzroke za dobljene rezultate. Kot standard smo pri testiranju uporabili  $\alpha$ -tokoferol, za katerega so v literaturi podane vrednosti  $EC_{50}$  med 11 in 27  $\mu$ M (35, 36). Za njegovo antioksidativno delovanje je bistvena fenolna skupina, ki je lahko donor vodika ali elektrona. Po reakciji je nastali tokoferilni radikal dobro stabiliziran, saj njegova struktura omogoča delokalizacijo elektrona. Ena molekula  $\alpha$ -tokoferola lahko reagira z dvema radikaloma, kar je še dodaten razlog, za njegovo učinkovito preprečevanje oksidacije (3).  $\alpha$ -Tokoferol smo testirali po enakem postopku kot naše sintetizirane spojine. Na ta način smo preverili ustreznost metode in jo tudi potrdili, saj smo iz meritev izračunali vrednost  $EC_{50}$ , ki je bila 17.4  $\mu$ M, kar je v skladu z literaturnimi vrednostmi.

V primerjavi z  $\alpha$ -tokoferolom imajo naše spojine slabše antioksidativno delovanje, vendar so vrednosti  $EC_{50}$  za nekatere spojine le malo višje od vrednosti za  $\alpha$ -tokoferol. Najboljše antioksidativno delovanje med vsemi sintetiziranimi spojinami ima spojina **10** ( $EC_{50}$  = 20.0  $\mu$ M), le malo slabšo aktivnost pa ima spojina **14** ( $EC_{50}$  = 20.8  $\mu$ M), kar je razvidno iz Preglednice I.

Možen razlog za antioksidativno delovanje nekaterih sintetiziranih spojin je ta, da se spojine lahko pojavljajo kot laktam-laktim tautomeri, kar je bilo dokazano tudi z IR spektroskopijo (Slika 22) (26).



Slika 22: Primer laktam-laktim tautomerije (spojina **8**)

Laktimske oblike omogočajo prenos vodika iz hidrosilnih skupin na molekulo radikala, pri čemer se ta nevtralizira.

Ker smo spojine **8-12** pripravili v obliki dinatrijevih soli, se te v topilu lahko protonirajo, torej sprejmejo dva protona iz molekul topila. V našem primeru smo kot topilo uporabili metanol, ki je protično topilo, kar pomeni, da je možen donor protonov. S tem v strukturi molekul nastaneta še dve hidroksilni skupini, ki pripomoreta k antioksidativnemu delovanju spojin. Pri spojinah **8**, **10** in **12**, ki na dušikih nimajo metilnih skupin, lahko pride do prenosa vodikovega atoma tudi z dušika. Kot že omenjeno, je za antioksidativno delovanje spojin pomembno, da po prenosu vodikovega atoma na molekulo radikala iz antioksidanta nastane stabilen radikal, ki ne reagira naprej in tako zaustavi nadaljnjo oksidacijo. Ker pri vseh testiranih spojinah lahko pride do delokalizacije elektrona po molekuli, naše spojine ustrezajo temu kriteriju.

Če primerjamo vpliv zamenjave barbiturnih obročev s tiobarbiturnimi (spojini **8** in **9**) opazimo precejšnjo razliko v antioksidativnem delovanju, ki je pri spojini **8**, ki v svoji strukturi vsebuje barbiturna obroča, precej močnejše ( $EC_{50} = 33.4 \mu M$ ), kot pri tiobarbiturnem analogu **9** ( $EC_{50} = 51.6 \mu M$ ). Razlogi za boljše antioksidativne lastnosti barbiturnih analogov so najverjetneje v različnih verjetnostih za tautomerijo ali v različni sposobnosti porazdeljevanja elektrona po nastalem radikalu iz antioksidanta. V primeru, ko je molekula v laktimski obliki, vsebuje spojina sintetizirana iz barbiturne kisline več hidroksilnih skupin v primerjavi s tistimi, ki smo jih sintetizirali iz tiobarbiturne kisline, zaradi česar je morda verjetnost, da pride do prenosa protona večja. Prav tako dobimo podoben rezultat, če primerjamo antioksidativno delovanje spojin **10** in **11**, ki se tudi razlikujeta le v tem ali vsebujeta barbiturna ali tiobarbiturna obroča. V tem primeru je razlika v vrednostih  $EC_{50}$  še večja, saj ima spojina **10** ( $EC_{50} = 20.0 \mu M$ ) z barbiturnima obročema skoraj 4-krat močnejše delovanje kot spojina **11** ( $EC_{50} = 77.0 \mu M$ ) s tiobarbiturnima obročema. Ker pri teh dveh spojinah ne more priti do laktam-laktim tautomerije, je razlog za takšno razliko morda različna zmožnost za protoniranje. Na osnovi vrednosti  $EC_{50}$  bi lahko sklepali, da se spojina **10** lažje protonira kot spojina **11**.

Glede na to, da lahko k antioksidativnemu delovanju spojin prispeva tudi prenos vodika z dušikovega atoma, smo pričakovali, da bodo imeli boljše antioksidativno delovanje tisti derivati, pri katerih dušikovi atomi niso metilirani (spojine **8**, **10** in **12**), saj lahko pri teh derivatih pride tudi do laktam-laktim tautomerije. To smo potrdili s primerjavo aktivnosti vzorca **9**, ki na dušikovih atomih nima substituentov in je imel  $EC_{50}$  vrednost  $51.6 \mu M$ , z njegovim tetrametiliranim analogom **11** z  $EC_{50}$  vrednostjo  $77.0 \mu M$ . Pri primerjavi vzorcev, ki smo ju sintetizirali iz barbiturne kisline (spojini **8** in **10**) pa smo, nasprotno,

ugotovili, da ima boljše antioksidativno delovanje, kot spojina **8** ( $EC_{50} = 33.4 \mu\text{M}$ ) spojina **10** ( $EC_{50} = 20.0 \mu\text{M}$ ), torej vzorec s pripetimi metilnimi skupinami. Iz tega lahko sklepamo, da v primeru spojin **8** in **10** za antioksidativno delovanje morda ni ključen mehanizem prenosa vodikov iz dušikovih atomov, ampak je bolj pomembno protoniranje obeh kisikovih atomov - atomov, ki sta v spojinah v obliki natrijeve soli - zaradi česar lahko molekula deluje kot antioksidant tako, da radikal odda vodikov atom.

S primerjavo spojin **8** in **12** smo ugotavljali vpliv dodatne nitro skupine na *para* mestu fenilnega obroča. Izkazalo se je, da ta poslabša antioksidativno delovanje spojin, saj je imela spojina **8** ( $EC_{50} = 33.4 \mu\text{M}$ ) nižjo  $EC_{50}$  vrednost kot spojina **12** ( $EC_{50} = 57.0 \mu\text{M}$ ). Možen razlog za takšno razliko je, da je nitro skupina močno elektronprivlačna, zato pritegne elektrone k sebi in tako težje pride do protoniranja kisikov kot v primeru, ko na fenilnem obroču ni pripete nobene skupine.

Molekuli, pri katerih je prišlo še do intramolekularne tvorbe etrske vezi (spojini **13** in **14**), sta izkazovali dobro antioksidativno delovanja. Derivat barbiturne kisline, spojina **13**, je imela  $EC_{50}$  vrednost  $28.5 \mu\text{M}$ , tiobarbiturni analog **14** pa  $20.8 \mu\text{M}$ . Možen razlog za boljše antioksidativno delovanje teh dveh spojin od večine ostalih vzorcev je, poleg tega, da se lahko pojavljata v laktimski oz. tiolaktimski obliki, ciklična etrska vez. S tvorbo dodatnega šestčlenskega obroča se poveča rigidnost molekule, ki postane zaradi tega tudi bolj planarna. Nastali radikal se lahko zato morda stabilizira z delokalizacijo po večjem obročnem sistemu, kar lahko poveča njegovo stabilnost. V primeru teh dveh spojin je boljše antioksidativno delovanje kot vzorec sintetiziran iz barbiturne kisline (spojina **13**), izkazoval derivat tiobarbiturne kisline (spojina **14**).

## 6 SKLEP

Reaktivne spojine so snovi, ki hitro reagirajo tako z različnimi molekulami v okolju, kot tudi z biološko pomembnimi molekulami, zato so za preprečitev oksidacijskih reakcij ključnega pomena antioksidanti. Njihova uporaba je razširjena tudi na področju kozmetologije, saj bistveno pripomorejo k antioksidativni obrambi kože, kot organu, ki je najbolj izpostavljen zunanjim in notranjim virom reaktivnih spojin. Iz tega razloga so raziskave na področju odkrivanja novih, boljših spojin z antioksidativnimi lastnostmi, ki so sposobne čim bolj učinkovito preprečiti neželene radikalske reakcije zelo pomembne. K razširitvi znanja na področju potencialnih antioksidantov smo prispevali tudi mi z izvedbo eksperimentalnega dela v okviru diplomske naloge.

Uspešno smo sintetizirali sedem spojin, jih ovrednotili s pomočjo DPPH-testa in na podlagi dobljenih vrednosti  $EC_{50}$  primerjali njihovo antioksidativno delovanje. Glede na to, da so imele spojine podobno osnovno ogrodje in so se razlikovale le v nekaterih strukturnih elementih, smo lahko opazovali vpliv strukturnih sprememb na antioksidativno delovanje. Izmed prvih štirih spojin, **8**, **9**, **10** in **11**, so se derivati barbiturne kisline v primerjavi z derivati tiobarbiturne kisline pri testu antioksidativnega delovanja odrezali bolje. Pri primerjavi molekul z metiliranimi dušiki s tistimi, ki imajo na dušikih vezan le vodik, smo dobili nasprotno rezultate. Ko smo primerjali spojini **9** in **11** smo dobili, glede na predhodno sklepanje, pričakovane rezultate, torej, da ima boljše antioksidativno delovanje spojina, ki nima metiliranih dušikov (**9**). Pri primerjavi spojin **8** in **10** pa smo dobili obratne rezultate. Iz tega smo sklepali, da verjetno na antioksidativno delovanje spojin močno vpliva tudi sposobnost protoniranja molekule, ki je morda pri spojini **10** večja kot pri spojini **8**.

Kot najboljši antioksidant se je med vsemi vzorci izkazala spojina **10** ( $EC_{50} = 20.0 \mu M$ ), ki je imela v primerjavi z  $\alpha$ -tokoferolom ( $EC_{50} = 17.4 \mu M$ ) le malo višjo vrednost  $EC_{50}$ . Tej spojini sledita spojini **13** in **14**, ki vsebujeta v strukturi dodatno intramolekularno etrsko vez. Iz primerjave rezultatov smo opazili, da prisotnost te vezi v molekuli izboljša antioksidativno delovanje. Nitro skupina na *para* mestu fenilnega obroča (spojine **12**) poslabša antioksidativno delovanje.

Predstavljena raziskava je šele uvod v spoznavanje antioksidativnega delovanja 5,5'-(fenilmetilen)bis(barbituratov) in 5,5'-(fenilmetilen)bis(tiobarbituratov). Za boljši vpogled



v njihove antioksidativne lastnosti bi bilo zanimivo izvesti še druge teste, s katerimi bi lahko dodatno ovrednotili njihovo delovanje in določili kinetiko antioksidativnega delovanja. Glede na to, da se antioksidanti pogosto uporabljajo na področju kozmetologije in farmacije pa bi bile potrebne tudi *in vivo* študije.

## 7 LITERATURA

1. Laher I.: Systems Biology of free radicals and antioxidants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2014: 3-18, 39-59, 113-17, 489-92, 3753, 3754, 3785-96
2. Mravljak J.: Radikali in oksidativni stres. Farm vest, 66; 2015: 127-32
3. Mravljak J. in Pečar S.: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 14-42, 138-83, 199-201
4. Lobo V., Patil A., Phatak A. in Chandra N.: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 4(8); 2010: 118-26
5. Young I. in Woodside J.: Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol, 54(3); 2001: 176-86
6. Pham-Huy L.A., He H. in Pham-Huy C.: Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Int J Biomed Sci, 4(2); 2008: 89-96
7. Machlin L.J. in Bendich A.: Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. FASEB J, 1(6); 1987: 441-45
8. Pečar S.: Radikali v našem okolju. Kemija v šoli in družbi, 18(2); 2006: 26-30
9. Halliwell B. in Gutteridge J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, 2015: 30-34, 79-81, 187-89
10. Poljšak B., Šuput D. in Milislav I., 2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, [internet]. Dostopno na: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/956792/> [junij 2016]
11. Poljšak B.: Skin aging, free radicals and antioxidants. Nova Science, New York, 2012: 19-30, 40-43, 116-27
12. Kohen R.: Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - new approaches for their evaluation. Biomed Pharmacother, 53(4); 1999: 181-192
13. Chandan K. S., Packer L., Hänninen O.: Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier Science B, Amsterdam, 2000: 3-45, 585-90
14. Masaki H.: Role of antioxidant in the skin anti aging effects. J dermatol Sci, 58(2); 2010: 85-90
15. Dündar Y. in Aslan R.: Antioxidative stress. East J Med, 5(2); 2000: 45-47
16. Nur Alam Md., Bristi N. J. in Rafiquzzaman Md.: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharma J, 21(2); 2013: 143-152

17. Huang D., Ou B. in Prior R. L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53(6); 2005: 1841-56
18. Molyneux P.: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2); 2004: 211-19
19. Foti M.C.: The Use and Abuse of the DPPH• Radical. *J Agric Food Chem*, 63(40); 2015: 8765-76
20. Foti M.C., Daquino C. in Geraci C.: Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acid and Their Methyl Esters with the DPPH Radical in alcoholic solutions. *J Org Chem*, 69(7); 2004: 2309-14
21. Kedare B. S. in Singh R. P.: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 48(4); 2011: 412-22
22. Henn D. in DeEugenio D.: Barbiturates. Chelsea house, New York, 2007: 30-37
23. Qureshi A. M., Mumtaz S., Rauf A., Ashraf M., Nasar R. in Chohan Z. H.: New barbiturates and thiobarbiturates as potential enzyme inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(1); 2015: 119-25
24. Foye W. O.: Foye's principles of medicinal chemistry 6th edition. Wolters Kluwer: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 514-516
25. Sokmen B. B., Ugras S., Sarikaya H. Y., Urgas H. I. in Yanardag R.: Antibacterial, antiurease, and antioxidant activities of some arylidene barbiturates. *Appl Biochem Biotechnol*, 171(8); 2013: 2030-39
26. Zidar N. in Kikelj D.: Preparation and Reactivity of 5- benzylidenebarbituric and 5-benzylidene-2thiobarbituric Acids. *Acta Chim Slov*, 58; 2011: 151-57
27. Tišler M.: Organska kemija. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2013: 227-34
28. Menefatti R.: Green Chemistry – Aspects for the Knoevenagel Reaction. [internet] Dostopno na: <http://www.intechopen.com/books/green-chemistry-environmentally-benign-approaches/green-chemistry-aspects-for-knoevenagel-reaction-> [junij 2016]
29. Name reaction. [internet] Dostopno na: <http://www.name-reaction.com/knoevenagel-condensation> [junij 2016]
30. Snypa. [internet] Dostopno na: <http://snypa.co.uk/concept/synth/knoevenagel.php> [junij 2016]
31. Dewan S. K.: Pharmaceutical organic chemistry. Alpha Science International, Oxford, 2009: 22.5-22.8

32. Snypa. [internet] Dostopno na: <http://snypa.co.uk/concept/synth/michael.php> [junij 2016]
33. Pyrzyńska K. in Pekal A.: Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analyt Meth*, 17(5); 2013: 4288-95
34. Clayden J., Greeves N., Warren S. in Wothers P.: *Organic Chemistry*. Oxford University Press, New York, 2001: 1024
35. Capuzzo A., Occhipinti A. in Maffei M.E.: Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. *Nat Prod Res*, 28(24); 2014: 2321-23
36. Housam H., Warid K. in Zaid A., Estimating the antioxidant activity for natural antioxidants (tocochromanol) and synthetic one by DPPH. *Int J of Pharm and Pharma Sci* [internet], 6(5); 2014: 441-44. Dostopno na: <http://www.ijppsjournal.com/Vol6Issue5/9389.pdf> [junij 2016]