

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KONEČNIK

## **DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KONEČNIK

**SINTEZA 2-AMINOTIOFENOV IZ TRIACETONAMINA IN VREDNOTENJE  
NJIHOVIH ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI**

**SYNTHESIS OF 2-AMINOTHIOPHENES FROM TRIACETONAMINE AND  
EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm., za dosegljivost, strokovno pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge.*

*Posebna zahvala gre tudi mojim bližnjim, ki so mi stali ob strani, me vzpodbujali in mi na kakršenkoli način pomagali.*

## **Izjava**

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

Katja Konečnik

# VSEBINA

|   |     |
|---|-----|
| VSEBINA.....                                    | I   |
| KAZALO SLIK.....                                | II  |
| KAZALO PREGLEDNIC.....                          | III |
| POVZETEK .....                                  | IV  |
| ABSTRACT .....                                  | V   |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....                           | VI  |
| 1 UVOD .....                                    | 1   |
| 1.1 OKSIDATIVNI STRES .....                     | 1   |
| 1.2 RADIKALI IN REAKTIVNE ZVRSTI.....           | 2   |
| 1.2.1 Reaktivne kisikove spojine.....           | 3   |
| 1.2.2 Reaktivne dušikove spojine.....           | 5   |
| 1.3 ANTIOKSIDANTI .....                         | 6   |
| 1.3.1 Mehanizmi delovanja .....                 | 6   |
| 1.3.2 Razdelitev antioksidantov.....            | 7   |
| 1.4 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI..... | 8   |
| 1.4.1 Test DPPH.....                            | 9   |
| 1.5 SEKUNDARNI AMINI KOT ANTIOKSIDANTI.....     | 10  |
| 1.5.1 2-aminotiofeni .....                      | 10  |
| 1.5.2 Nitroksidi .....                          | 11  |
| 2 NAMEN DELA.....                               | 13  |
| 3 MATERIALI IN METODE .....                     | 14  |
| 3.1 REAGENTI IN TOPILA .....                    | 14  |
| 3.2 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATI.....          | 14  |
| 3.3 RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA .....        | 15  |
| 3.4 ANALIZINE METODE .....                      | 15  |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.4.1 | Kromatografske metode .....  | 15 |
| 3.4.2 | Spektroskopske metode .....  | 15 |
| 3.4.3 | Določevanje tališč.....  | 16 |
| 3.4.4 | Vrednotenje antioksidativnih lastnosti .....                       | 16 |
| 4     | EKSPERIMENTALNO DELO .....   | 17 |
| 4.1   | SINTEZA SPOJIN.....  | 17 |
| 4.2   | VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI.....                        | 25 |
| 4.2.1 | Priprava raztopin.....   | 25 |
| 4.2.2 | Določanje vrednosti EC <sub>50</sub> .....                         | 25 |
| 4.3   | EPR SPEKTROSKOPIJA NITROKSIDOV .....                               | 26 |
| 5     | REZULTATI IN RAZPRAVA .....  | 28 |
| 5.1   | RAZLAGA REAKCIJSKIH MEHANIZMOV .....                               | 28 |
| 5.1.1 | Gewaldova reakcija .....   | 28 |
| 5.1.2 | Tvorba amida z acetanhidridom .....                                | 29 |
| 5.1.3 | Oksidacija amina do nitroksida .....                               | 29 |
| 5.2   | REZULTATI VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI .....             | 30 |
| 5.3   | KOMENTAR REZULTATOV VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH<br>LASTNOSTI..... | 44 |
| 6     | SKLEP.....   | 46 |
| 7     | LITERATURA.....  | 47 |

## **KAZALO SLIK**

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Slika 1: | Reaktivne kisikove spojine.....   | 4  |
| Slika 2: | Reaktivne dušikove spojine.....   | 5  |
| Slika 3: | Radikal DPPH in njegova reducirana oblika DPPH-H .....  | 9  |
| Slika 4: | Najpogosteje zastopani nitroksidni radikali pirolinskega (a), pirolidinskega (b),<br>oksazolidinskega (c), imidazolidinskega (d) in piperidinskega (e) tipa ..... | 11 |

|  |    |
|--|----|
| Slika 5: Primer nanosa raztopin vzorcev in DPPH na mikrotitrsko ploščico .....                   | 26 |
| Slika 6: EPR spektri etanolnih raztopin nitroksidov <b>3, 4, 6 in 8</b> .....                    | 27 |
| Slika 7: Reakcijski mehanizem Gewaldove reakcije.....  | 28 |
| Slika 8: Reakcijski mehanizem tvorbe amida z acetanhidridom.....                                 | 29 |
| Slika 9: Mehanizem reakcije oksidacije sekundarnega amina do nitroksida .....                    | 30 |
| Slika 10: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 1 .....             | 31 |
| Slika 11: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 2 .....             | 33 |
| Slika 12: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 3 .....             | 34 |
| Slika 13: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 4 .....             | 35 |
| Slika 14: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 5 .....             | 37 |
| Slika 15: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 6 .....             | 38 |
| Slika 16: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 7 .....             | 39 |
| Slika 17: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 8 .....             | 41 |
| Slika 18: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije za $\alpha$ -tokoferol ...  | 42 |
| Slika 19: Prikaz vrednosti EC <sub>50</sub> za spojine <b>1 - 8</b> in $\alpha$ -tokoferol ..... | 43 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|   |    |
|---|----|
| Preglednica I: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 1 .....                        | 31 |
| Preglednica II: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 2 .....                       | 32 |
| Preglednica III: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 3.....                       | 34 |
| Preglednica IV: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 4.....                        | 35 |
| Preglednica V: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 5.....                         | 36 |
| Preglednica VI: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 6.....                        | 38 |
| Preglednica VII: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 7 .....                      | 39 |
| Preglednica VIII: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 8.....                      | 40 |
| Preglednica IX: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za $\alpha$ -tokoferol .....             | 41 |
| Preglednica X: Izračunane vrednosti EC <sub>50</sub> s standardnim odklonom za posamezno spojino .. | 43 |

## POVZETEK

V zadnjih desetletjih se vedno bolj zavedamo posledic oksidativnega stresa, ki je eden izmed glavnih vzrokov prezgodnjega staranja in številnih degenerativnih bolezni, vse od ateroskleroze, Alzheimerjeve bolezni ter do različnih vrst raka. Najpogostejši vzrok za nastanek oksidativnega stresa je prekomerna tvorba radikalov v telesu, ki jo lahko sprožijo številni dejavniki, kot so izpostavljenost ultravijoličnemu sevanju ter nevarnim kemikalijam, kajenje, prekomerno uživanje alkohola in razna virusna ter bakterijska obolenja. Za obrambo pred oksidativnim stresom je pomembno, da v telesu ohranimo ravnovesje med reaktivni spojinami in antioksidanti, ki varujejo celice pred oksidativnimi poškodbami. Iz tega razloga se številne znanstvene raziskave usmerjajo k iskanju novih potencialnih antioksidantov. Nedavno so se kot dobri antioksidanti izkazali tudi sekundarni amini, ki so odlični donorji vodika. V diplomski nalogi smo sintetizirali serijo derivatov 2-aminotiofenov iz triacetonamina po Gewaldovi reakciji, v nadaljnjih korakih pa smo jih s pomočjo meta-kloroperoksibenzojske kisline (MCPBA) oksidirali do stabilnih nitroksidnih radikalov. Osmim pripravljenim spojinam smo pomerili antioksidativno kapaciteto s spektrofotometričnim testom, ki temelji na spremljanju redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH), rezultate pa smo podali v obliki efektivne koncentracije  $EC_{50}$ . Pri meritvah absorbance smo uporabili tudi standard,  $\alpha$ -tokoferol, s katerim smo primerjali rezultate sintetiziranih spojin, z uporabo standarda pa smo preverili tudi ustreznost izbrane metode. Na podlagi rezultatov diplomskega dela lahko sklepamo, da je standard  $\alpha$ -tokoferol v našem primeru najboljši antioksidant ( $11,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ), sicer pa pet od osmih pripravljenih spojin, katerih vrednosti  $EC_{50}$  so v razponu od  $56,0 \pm 3,3$  do  $185,7 \pm 27,7 \mu\text{M}$ , izkazuje dobro antioksidativno delovanje. Dve izmed osmih spojin imata dosti nižjo antioksidativno kapaciteto, medtem ko ena spojina ne izkazuje antioksidativnih lastnosti pri najvišji testirani koncentraciji. Ugotovili smo tudi, da odnosa med antioksidativnim delovanjem in strukturo spojin v našem primeru ni.

**Ključne besede:** antioksidant, test DPPH, 2-aminotiofeni, Gewaldova reakcija, nitroksidni radikali

## ABSTRACT

In the last decades, we are becoming more aware of the consequences of oxidative stress which is one of the main causes for premature ageing and many degenerative diseases, such as atherosclerosis, Alzheimer's disease and some types of cancer. The most common cause of oxidative stress is the excessive formation of free radicals in the body which can be triggered by many factors, for instance, exposure to ultraviolet radiation and dangerous chemicals, smoking, alcohol consumption and various viral and bacterial diseases. In order to prevent oxidative stress, it is important to maintain a balance between reactive compounds and antioxidants which protect cells against oxidative damage. This is why numerous scientific studies are focused on finding new potential antioxidants. Recently, good antioxidants proved to be secondary amines, which are excellent hydrogen donors. In this thesis, we synthesized a series of derivatives of 2-aminothiophenes from triacetonamine with the help of the Gewald reaction which were then oxidized to stable nitroxide free radicals using meta-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA). The Antioxidant capacity of eight compounds was evaluated using a spectrophotometric test based on the monitoring of the reduction of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. The results were presented in the form of effective concentration  $EC_{50}$ . The results were compared to a standard  $\alpha$ -tocopherol, which we also used to verify the suitability of the chosen method. Based on the results of the thesis it can be concluded that the standard  $\alpha$ -tocopherol is the best antioxidant in our case ( $11,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ). Otherwise, five of the eight prepared compounds shows potent antioxidant activity, with  $EC_{50}$  values in the range from  $56,0 \pm 3,3$  to  $185,7 \pm 27,7 \mu\text{M}$ . Two of the eight compounds have a much lower antioxidant capacity, while one compound does not show antioxidant properties at the highest used concentration. Our observations also suggest that in our case there is no relation between antioxidant activity and the structure of the compounds.

**Key words:** antioxidant, DPPH assay, 2-aminothiophenes, Gewald reaction, nitroxide free radicals



## SEZNAM OKRAJŠAV

|                  |  |
|------------------|--|
| DMSO- $d_6$      | devterirani dimetilsulfoksid   |
| DNA              | deoksiribonukleinska kislina   |
| DPPH             | 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil   |
| DPPH-H           | 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin   |
| EC <sub>50</sub> | 50-odstotna efektivna koncentracija  |
| EPR              | elektronska paramagnetna resonanca   |
| FDA              | Zvezna agencija za hrano in zdravila ( <i>Food and Drug Administration</i> ) |
| IR               | infrardeča   |
| MCPBA            | meta-kloroperoksibenzojska kislina   |
| MS               | masna spektrometrija   |
| NMR              | jedrska magnetna resonanca   |
| NOS              | sintaze dušikovega oksida  |
| $^1\text{O}_2$   | singletni kisik  |
| $^3\text{O}_2$   | tripletni kisik  |
| OH $\cdot$       | hidroksilni radikal  |
| ONOO $^-$        | peroksinitrit  |
| R <sub>f</sub>   | retencijski faktor   |
| RNS              | reaktivne dušikove spojine ( <i>reactive nitrogen species</i> )              |
| ROS              | reaktivne kisikove spojine ( <i>reactive oxygen species</i> )                |
| SOD              | superoksid dismutaza   |
| TLC              | tankoplastna kromatografija  |
| TMS              | tetrametilsilan  |
| UV               | ultravijolično   |

# 1 UVOD

## 1.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je vrsta kemičnega stresa, ki je prisoten v živih organizmih in je posledica delovanja povečane količine potencialno škodljivih reaktivnih kisikovih zvrsti (*reactive oxygen species*, ROS). Izpostavljeni so mu vsi aerobni organizmi (1). Je posledica neravnovesja med antioksidanti in reaktivnimi zvrstmi (prooksidanti), ravnovesje pa lahko poruši tako povečana tvorba radikalov kot zmanjšana antioksidativna obramba (2, 3).

V fizioloških stanjih je ravnovesje med prooksidanti in antioksidanti nagnjeno rahlo na stran prooksidantov, to pa omogoča blag oksidativni stres. Takšno razmerje je pomembno, saj reaktivne zvrsti ne povzročajo samo škode, ampak so v organizmu vključene v številne pomembne procese (npr. redoks signaliziranje), poleg tega so pomemben del obrambe imunskega sistema pred patogeni (virusi, bakterije) in lahko aktivirajo tudi signale poti, ki celici omogočijo preživetje. Blag oksidativni stres naše celice navadno dobro prenašajo in je potreben za optimalno delovanje organizma, poleg tega ima lahko tudi pozitivne učinke na telo. Ob rahlo povišanem nivoju reaktivnih zvrsti se namreč poveča učinkovitost obrambnih mehanizmov, saj se preko redoks signaliziranja zviša raven izražanja encimov antioksidantov in encimov za popravilo DNA (3, 4).

Majhne količine ROS so v telesu prisotne v normalnih okoliščinah in grožnjo predstavljajo šele, ko njihove količine postanejo prevelike. Presežek radikalov v telesu predstavlja glavni vzrok za nastanek oksidativnega stresa. Vzrok za povečano količino radikalov so lahko tako zunanji kot notranji dejavniki. Med zunanje dejavnike štejemo različne vrste sevanja (UV in ionizirajoče sevanje), kemikalije (pesticidi), določena zdravila ter virusna in bakterijska obolenja, medtem ko so notranji dejavniki večinoma posledica bolezni (sladkorna bolezen, rak, debelost ...) ali intenzivne telesne obremenitve. Nastanek oksidativnega stresa pospešujejo tudi psihološki dejavniki (psiho-emocionalni stres) in pa hiter življenjski slog ter onesnaženost okolja, z njim pa so prav tako povezane nekatere škodljive navade, kot je kajenje, pitje alkohola in nepravilna prehrana (1, 2, 3).

Sam oksidativni stres nima tipične klinične slike in ne kaže simptomov, ki bi nakazovali na njegovo prisotnost v organizmu, a je kljub temu pomembno, da se njegove prisotnosti

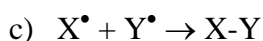
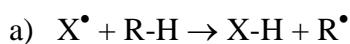
zavedamo in jo skušamo nadzorovati (1). ROS namreč poškodujejo biološke molekule, kot so proteini in povzročajo lipidno peroksidacijo ter oksidativne poškodbe DNA (2).

Tvorba radikalov v našem telesu z leti narašča, medtem ko se sposobnosti endogenih obrambnih mehanizmov manjšajo. Takšno neravnovesje vodi v poškodbe celičnih struktur in zaradi tega je oksidativni stres razlog za zgodnje staranje in pojav številnih bolezni, kot so ateroskleroza, možganska kap, kardiovaskularne bolezni, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, nekatere vrste raka in druge (1, 3).

## 1.2 RADIKALI IN REAKTIVNE ZVRSTI

Radikal je vsaka snov (atom, ion, molekula, kompleks itd.), ki ima v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron. Lastnosti radikala izvirajo iz njegove težnje, da si pridobi manjkajoči elektron in tvori elektronski par, zato je večina radikalov nestabilnih in visoko kemično reaktivnih. Lahko so akceptorji ali donorji elektrona in lahko delujejo kot oksidanti ali reducenti. Zaradi svoje velike reaktivnosti so navadno kratkoživi, saj hitro reagirajo in se pretvorijo v nadaljnje produkte. Radikali z nesparjenim elektronom na ogljiku, dušiku, kisiku ali kakem drugem atomu so obarvani, kar pomeni, da adsorbirajo svetlobo v vidnem delu spektra. So paramagnetne snovi, saj imajo efektivni magnetni moment, ki lahko interagira z zunanjim magnetnim poljem (5, 6).

Radikalske reakcije so hitre in zanje je značilna kaotičnost. Reaktiven radikal namreč reagira s spojino, ki jo sreča, ne glede na to, ali je ta spojina izhodna snov, produkt ali radikal. Zaradi tega radikali že v čisti snovi povzročijo nastanek zelo kompleksnih zmesi spojin. Poznamo tri glavne tipe radikalskih reakcij: a) radikal ( $X^\bullet$ ) odvzame vodikov atom, b) radikal ( $X^\bullet$ ) se adira na dvojno vez, c) radikal ( $X^\bullet$ ) reagira s sosednjim radikalom ( $Y^\bullet$ ) (6).



V primeru reakcije a) in b) (reakcija med radikalom in neradikalom) nastane nov radikal, ki nato vstopa v nadaljnje reakcije. Če pa se srečata dva radikala, se prosta elektrona združita v novo kovalentno vez in nastane neradikalni produkt, ki pa lahko ponovno reagira z drugimi radikali. Pomembne so predvsem reakcije med radikali in neradikali, saj

je v telesu večina molekul neradikalskih in lahko na ta način že en sam radikal sproži obsežno verižno reakcijo (1, 6).

Radikal nastane s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi v molekuli, za kar je potrebna energija, ki jo lahko prispevajo na primer fotoni UV svetlobe ali toplota. Nastajajo pa tudi pri enoelektronskih redoks reakcijah in pri ionizaciji snovi npr. z X-žarki (6).

Enoelektronski procesi so v našem organizmu pogosti in radikali so običajni intermediati v presnovi, poleg tega so pomemben del imunskega sistema, aktivatorji nekaterih encimov ter sodelujejo pri prenosu signalov. V celicah neprestano nastajajo manjše količine radikalov, njihov vir pa so različne encimske reakcije, ki potekajo v procesu dihalne verige in fagocitoze. Nastajajo pa lahko tudi v neencimskih reakcijah kisika z organskimi spojinami. Radikalom smo lahko izpostavljeni tudi preko zunanjih virov (sevanje, ozon, cigaretni dim, okoljski onesnaževalci, kemikalije). Kljub temu, da so radikali del normalnih metaboličnih procesov, ki so za človeško telo nujno potrebni, pa so v prevelikih količinah škodljivi, saj napadajo pomembne makromolekule v telesu, vse od lipidov, nukleinskih kislin in proteinov, kar vodi v poškodbo celic in porušenje homeostaze. Zaradi tega so začetniki številnih degenerativnih obolenj, različnih vrst raka in so vzrok staranja (5, 6).

### **1.2.1 Reaktivne kisikove spojine**

Reaktivne kisikove spojine izhajajo iz molekularnega kisika in jih razdelimo na radikalske in neradikalske vrste (1, Slika 1). Gre za visoko reaktivne zvrsti, ki so sposobne poškodovati biološko pomembne molekule, kot so DNA, proteini, ogljikovi hidrati in lipidi (5). Reaktivnost kisika izvira iz njegove elektronske strukture. Je biradikal in ima v svoji zunanji orbitali prisotna dva nesparjena elektrona z enako usmerjenima spinoma (govorimo o tripletnem kisiku:  $^3\text{O}_2$ ), zaradi česar sam ni zelo reaktivna molekula in lahko reagira s samo enim elektronom naenkrat. V naravi najdemo kisikove molekule predvsem v osnovnem tripletnem stanju, ki je v tem primeru energetsko najnižje. Če pa pride do obrata spina enega izmed elektronov, dobimo singletno stanje. Singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) pa je zelo močan oksidant, saj lahko elektrona z nasprotnima spinoma hitro reagirata z ostalimi elektronskimi pari. Nastane pri nekaterih kemičnih reakcijah in fotokemično iz tripletnega kisika (1, 7).

**Radikali:**

- Tripletni kisik  $^3\text{O}_2$
- Superoksidni radikal  $\text{O}_2^{\bullet-}$
- Hidroksilni radikal  $\text{OH}^{\bullet}$
- Hidroperoksilni radikal  $\text{HOO}^{\bullet}$
- Peroksilni radikal  $\text{ROO}^{\bullet}$
- Alkoksilni radikal  $\text{RO}^{\bullet}$
- Ozon  $\text{O}_3$

**Neradikali:**

- Singletni kisik  $^1\text{O}_2$
- Vodikov peroksid  $\text{H}_2\text{O}_2$
- Hidroperoksid  $\text{ROOH}$
- Hipoklorna kislina  $\text{HOCl}$
- Peroksinitrit  $\text{ONOO}^-$
- Ozon  $\text{O}_3$

*Slika 1: Reaktivne kisikove spojine*

Z redukcijo kisika pridobimo številne reaktivne intermediate. Eden izmed teh je superoksidni anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), ki je predhodnik večine ROS in mediator oksidativnih verižnih reakcij. Pri dismutaciji  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (ta lahko poteče spontano, pogosteje pa jo katalizira encim superoksid dismutaza (SOD)) nastaneta kisik ( $^3\text{O}_2$ ) in vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Slednji se lahko nato popolnoma reducira do vode ali pa delno reducira do hidroksilnega radikala ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), ki velja za enega najmočnejših oksidantov v naravi (7).  $\text{O}_2^{\bullet-}$  lahko reagira tudi z drugimi vrstami radikalov, kot je npr. dušikov oksid ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), produkt reakcije pa je peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), prav tako zelo močan oksidant, ki pa ni radikal.

Glavni intracelularni vir ROS v večini tkiv predstavlja dihalna veriga v mitohondriju, nastanejo pa preko elektronov, ki uidejo iz prenašalne verige (7, 8). Ti elektroni nato reagirajo z molekularnim kisikom (ga reducirajo), posledica tega pa je nastanek  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Število elektronov, ki uidejo iz dihalne verige, je odvisno od fiziološkega stanja organizma. ROS lahko pod določenimi pogoji proizvajajo tudi različne oksidaze (npr. ksantin oksidaza v primeru hipoksije), ki oksidirajo ogljikove hidrate, aldehide, aminokislino in nekatere druge spojine, majhne količine ROS pa nastajajo tudi med sintezo nekaterih hormonov (npr. adrenalina) (8). Pomemben nemitohondrijski vir nastanka radikalov je tudi Fentonova reakcija, v kateri pride do nastanka  $\text{OH}^{\bullet}$ . Povečano število ROS povzročajo tudi razne mikrobne infekcije, preobremenitev telesa, onesnaževalci okolja, toksini v cigaretnem dimu, alkohol, UV in ionizirajoče sevanje, razni pesticidi in ozon (3).

## 1.2.2 Reaktivne dušikove spojine

Reaktivne dušikove spojine (*reactive nitrogen species*, RNS) predstavljajo oksidanti, ki izhajajo iz dušikovega oksida ( $\text{NO}^\bullet$ ) (7, Slika 2). Dušikov oksid igra pomembno vlogo pri fiziološki regulaciji večine celic, vse od gladkomišičnih celic, kardiomiocitov, trombocitov in živčnih celic. Celične tarče RNS so predvsem lipidi, proteini in DNA, povišane ravni RNS pa vodijo v poškodbe celic in celično smrt (9).

$\text{NO}^\bullet$  je majhna in nenabita molekula z neparjenim elektronom, ki z lahkoto difundira preko membrane. V bioloških tkivih nastane iz aminokislina L-arginina in kisika, reakcijo pa katalizirajo sintaze dušikovega oksida (*nitric oxide synthase*, NOS). Igra pomembno vlogo pri celičnem signaliziranju, vazodilataciji in imunskem odzivu.  $\text{NO}^\bullet$  kot vazodilatator inhibira interakcije levkocitov z endotelijem, preprečuje agregacijo trombocitov in celično adhezijo ter kontrolira proliferacijo celic. Sinteza  $\text{NO}^\bullet$  se med vnetjem poveča, kar služi kot obrambni mehanizem proti mikroorganizmom, a prekomerna tvorba povzroča poškodbe tkiva.  $\text{NO}^\bullet$  z lahkoto difundira v tarčne celice, kjer interagira s proteini, nukleinskimi kisljinami in z ostalimi paramagnetnimi spojinami, vključno s  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  v prostetični skupini hem nekaterih proteinov in z drugimi reaktivni zvrstmi, kot je molekularni kisik in  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Avtooksidacija  $\text{NO}^\bullet$  privede do tvorbe nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ), prav tako pa se  $\text{NO}^\bullet$  zelo hitro oksidira v vaskularnem sistemu preko reakcije z oksihemoglobinom do stabilnega nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ). Zelo pomembna je reakcija  $\text{NO}^\bullet$  s  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , ki poteče zelo hitro, pri tem pa nastane toksičen  $\text{ONOO}^-$ , ki je prav tako močan oksidant in lahko napade številne biološke molekule. Mnoge citotoksične lastnosti  $\text{NO}^\bullet$  so dejansko posledica nastanka  $\text{ONOO}^-$  (10, 11).

### Radikali:

- Dušikov oksid  $\text{NO}^\bullet$
- Dušikov dioksid  $\text{NO}_2^\bullet$

### Neradikali:

- Didušikov trioksid  $\text{N}_2\text{O}_3$
- Didušikov tetraoksid  $\text{N}_2\text{O}_4$
- Peroksinitrit  $\text{ONOO}^-$
- Alkilperoksinitrit  $\text{ROONO}$
- Nitrozilni kation  $\text{NO}^+$
- Nitroksilni anion  $\text{NO}^-$
- Nitronijev anion  $\text{NO}_2^+$

Slika 2: Reaktivne dušikove spojine

### 1.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani možnost oksidativne poškodbe tarčne molekule. Gre za kemično zaščito, ki varuje celice pred izbruhom oksidativnega stresa, ker sprti odstranjuje možne vzroke nastanka le-tega oz. omejuje obseg oksidacij. Med funkcije antioksidantov štejemo tudi zmanjševanje DNA mutacij, malignih transformacij in ostalih posledic celičnih poškodb. Antioksidativni učinek pa je odvisen od vrste antioksidanta, mehanizma delovanja, od njegovega sodelovanjem z drugimi antioksidanti in v primeru vnosa zunanjih antioksidantov, še od njegove absorpcije v prebavilih, odmerka, pogostosti vnosa v telo, od presnove in izločanja iz telesa (12, 13).

Antioksidanti se uporabljajo tudi v prehrabnih izdelkih z namenom dosega daljšega roka uporabe, v kozmetiki za zaščito samih sestavin izdelka, podaljšanje roka uporabe in kot kozmetično aktivne sestavine, ki ščitijo kožo pred oksidativnimi poškodbami in staranjem. Uporabni so tudi v medicini, predvsem kot sredstva, ki zmanjšajo verjetnost za nastanek raka, za zdravljenje različnih bolezni jeter, nekateri pa naj bi se uporabljali tudi kot terapevtska sredstva za akutne poškodbe centralnega živčnega sistema, za upočasnitev nevrodegenerativne bolezni kot je Alzheimerjeva bolezen, za upočasnitev ateroskleroze in vseh ostalih stanj, ki so povezana z oksidativnimi poškodbami celic (14, 15).

#### 1.3.1 Mehanizmi delovanja

Antioksidanti lahko v osnovi delujejo na dva načina. **Primarni antioksidanti** prekinejo verižno reakcijo, pri čemer nastane manj reaktiven radikal, ki v večini primerov ni sposoben nadaljevati oksidacije. Delujejo kot reducenti, ki v reakcijah z radikali ali oksidanti nudijo vodikov atom ali elektron. Lahko inhibirajo lipidno peroksidacijo, lovijo ROS, kot je  $O_2^{\bullet-}$  ter radikale, ki začenjajo verižne reakcije, vse od hidroksilnega, alkoksilnega in peroksilnega radikala ter na ta način prekinejo verižno reakcijo. **Sekundarni (preventivni) antioksidanti** lahko delujejo kot kelatorji (vežejo kovinske ione bakra in železa, ter tako preprečijo, da bi ti katalizirali radikalske reakcije), lovilci singletnega kisika ali odstranjevalci ROS, lahko tudi inhibirajo oksidativne encime in absorbirajo UV sevanje. Pogosto lahko en sam antioksidant deluje po različnih mehanizmih delovanja. Na primer, propil-galat je fenolni antioksidant, ki ga uporabljamo predvsem v hrani, njegovi mehanizmi delovanja pa vključujejo prekinitev verižne reakcije, lovljenje radikalov in sposobnost vezave železovih ionov. Ob kombinaciji primarnih in

sekundarnih antioksidantov pa ti izkazujejo sinergistične učinke. Preko donacije vodikovega atoma lahko namreč regenerirajo primarne antioksidante, poleg tega pa jih lahko tudi stabilizirajo (12, 13, 16).

Obramba pred ROS in RNS pa ne sloni na samo enem samem antioksidantu, ampak so na voljo številne molekule, ki se povezujejo v **antioksidativno mrežo**. Ker je mesto nastanka  $\text{OH}^\bullet$  zelo nepredvidljivo, morajo biti antioksidanti prisotni v vseh predelih celice, tkiva ali telesa, da zagotovijo ustrezno zaščito. S tem namenom so se v procesu evolucije razvili antioksidanti z zelo različnimi strukturami in mehanizmi delovanja, ki jim omogočajo porazdeljevanje po vseh delih telesa in odstranjevanje reaktivnih spojin po različnih poteh. Zaradi neprestanih oksidacij, ki potekajo v telesu, bi za njihovo vzdrževanje potrebovali zelo veliko količino antioksidantov, kar bi bilo evolucijsko zelo neekonomično. Zaradi tega so se razvili antioksidanti, ki so obnovljivi in so povezani v antioksidativno mrežo, kjer lahko posamezni antioksidant obnovi (reducira) oksidirano spojino. Antioksidant namreč z oddajanjem elektrona oz. vodikovega atoma reducira radikal in pri tem sam postane potencialni oksidant. A zaradi mreže antioksidantov ne pride do reakcije med radikalom antioksidanta in celičnimi sestavinami, ker se to hitreje zgodi z drugim antioksidantom (12).

### 1.3.2 Razdelitev antioksidantov

Antioksidanti so strukturno zelo heterogena skupina snovi in jih zaradi tega v skupine razdelimo po različnih kriterijih: po izvoru, strukturi, fizikalno kemičnih lastnostih, mehanizmu delovanja in možnosti obnavljanja (12).

V glavnem antioksidante delimo po izvoru in sicer so ti lahko endogenega (telo jih samo proizvaja) ali eksogenega izvora (v telo jih vnašamo s hrano) (12). Med pomembnejše antioksidante **endogenega izvora** štejemo encime antioksidante, ki predstavljajo prvi obrambni mehanizem telesa, saj neposredno prispevajo k obrambi pred ROS. Sem štejemo katalazo, ki pretvarja vodikov peroksid v vodo in molekularni kisik, SOD, ki je odgovorna za pretvorbo superoksidnih anionov v kisik in vodikov peroksid, ki je substrat za katalazo ter glutathion peroksidazo, ki reducira perokside, s tem, da donira dva elektrona, z odstranjevanjem peroksidov pa preprečuje tudi Fentonovo reakcijo. Med ostale encime antioksidante štejemo tudi glutathion reduktazo in tioredoksin reduktazo. Zelo pomembna antioksidanta, ki pa nista encima, sta glutathion in koencim Q10. Glutathion ščiti celice pred



radikali, tako da donira elektron oz. vodikov atom, lahko pa tudi regenerira druge antioksidante, kot je askorbat. Koencim Q10 pa je prisoten v vseh celičnih membranah in ima pomembno vlogo v procesu dihalne verige, preprečuje tvorbo lipidnih peroksilnih radikalov, poleg tega pa ima tudi sposobnost regeneracije vitamina E. Med endogene neencimske antioksidante spadajo tudi nekateri proteini (transferin, albumin, bilirubin) in pa antioksidanti z nizko molekulsko maso, kot sta sečna in lipojska kislina (13, 16, 17).

Kljub temu, da so endogeni antioksidativni mehanizmi zelo učinkoviti, pa to vseeno ni dovolj za celokupno obrambo telesa pred radikali. Zaradi tega smo ljudje odvisni od različnih vrst antioksidantov, ki jih v telo vnašamo s hrano. Glavni predstavniki antioksidantov **eksogenega izvora** so vitamin C (askorbinska kislina) in E (tokoferoli in tokotrienoli), karotenoidi in fenolne spojine kot so npr. flavonoidi. Askorbinska kislina je najpomembnejši vodotopni antioksidant in hkrati kofaktor vsaj osmih encimov. Reagira z mnogimi predstavniki ROS in RNS, tako da reducira superoksidni anion, hidroperoksilne, hidroksilne, peroksilne in nitroksidne radikale, učinkovito lovi in duši singletni kisik ter regenerira tokoferilni radikal nazaj v vitamin E. Vitamin E je antioksidant v lipofilnih okoljih celice in je najpomembnejši zaviralec lipidne peroksidacije. Flavonoidi imajo prav tako veliko antioksidativnih lastnosti, so dušilci singletnega kisika, lovilci superoksidnega radikala, nekateri pa delujejo tudi kot kelatorji. Poleg tega lahko aktivirajo encime antioksidante, reducirajo tokoferilni radikal ter povečajo nivoje sečne kisline v telesu. Eksogene antioksidante pridobimo s prehrano, ki je bogata s sadjem, z zelenjavo, s polnozrnatimi izdelki, stročnicami in z omega-3 maščobnimi kislinami. Antioksidante lahko v telo vnesemo tudi s prehranskimi dopolnili, ki nam zagotavljajo hranilne snovi, kot so vitamini, minerali, vlakna, maščobne in aminokislino, če jih s samo uravnoteženo prehrano ne zaužijemo dovolj (12, 13, 17).

#### **1.4 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI**

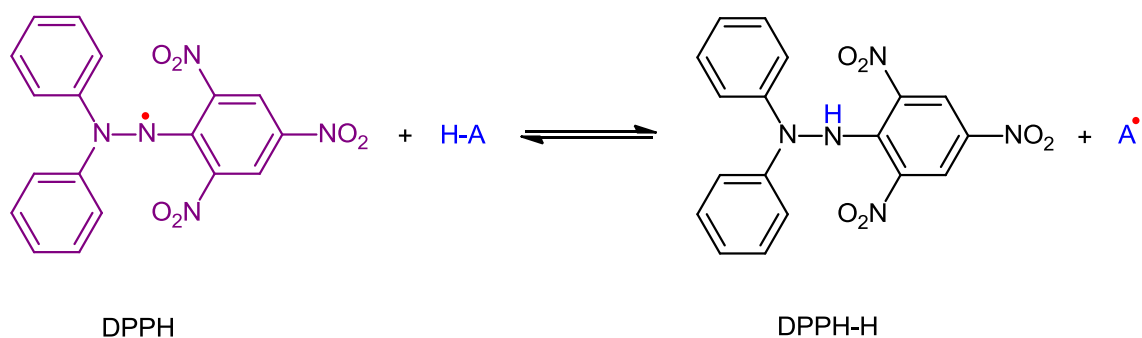
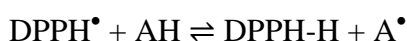
Oksidativni stres je vzrok nastanka potencialno škodljivih radikalov, ki igrajo pomembno vlogo pri patogenezi številnih bolezni, antioksidanti pa so ključnega pomena v boju proti tem radikalom. Pomembnost poznavanja vsebnosti in učinkovitosti antioksidantov na različnih področjih je privedla do razvoja številnih metod za ugotavljanje potenciala antioksidativnih sposobnosti. Mednje spadajo sposobnost antioksidanta za redukcijo železa (*Ferric reducing antioxidant power*, FRAP), kapaciteta absorpcije kisikovih radikalov (*Oxygen radical absorbance capacity*, ORAC), antioksidativna kapaciteta za redukcijo

bakra (*Cupric reducing antioxidant capacity*, CUPRAC), elektrokemijska ocena celokupne spodobnosti redukcije in pa uporaba radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH). Slednja velja za eno izmed najuporabnejših metod za določanje antioksidativne aktivnosti v posameznih spojinah, rastlinskih izvlečkih in hrani (18, 19).

### 1.4.1 Test DPPH

Test DPPH temelji na spremljanju redukcije radikala DPPH in velja za standardno kolorimetrično metodo, ki se uporablja za oceno antioksidativnih lastnosti čiste spojine (20).

DPPH je stabilen, komercialno dostopen organski dušikov radikal, ki reagira z donorji vodika/elektrona in ima absorpcijski maksimum pri  $\lambda = 515 - 520$  nm. Nesparjen elektron je delokaliziran po celotni molekuli. Delokalizacija omogoča stabilnost radikala, saj molekula ne dimerizira kot večina ostalih radikalov, poleg tega pa je razlog za močno vijolično obarvanost raztopine DPPH. Ob dodatku snovi, ki lahko prispeva vodikov atom (npr. antioksidanta), k raztopini DPPH, pride do redukcije radikala do stabilne, diamagnetne molekule 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH-H). To povzroči spremembo barve iz vijolične v svetlo rumeno, raztopina pa se razbarva sorazmerno s številom doniranih elektronov. Ob tem nastane nov radikal ( $A^\bullet$ ), ki nato vstopa v nadaljnje reakcije (18, 19, Slika 3). Spremembo barve se spremlja spektrofotometrično in je indikator antioksidativnih lastnosti spojine (20).



Slika 3: Radikal DPPH in njegova reducirana oblika DPPH-H

Gre za hitro, enostavno in cenovno ugodno metodo, ki jo je leta 1958 predstavil Marsden Blois na modelu aminokislina cisteina. Uporablja se lahko tako za trdne kot tekoče vzorce,

preučujemo pa lahko lastnosti tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (18). Obstaja več različic metode DPPH. Kot topilo se navadno uporablja metanol ali etanol, saj ostala topila (npr. aceton) dajejo nizke vrednosti obsega redukcije. Meritve se izvajajo pri sobni temperaturi, kar zmanjša tveganje za toplotno razgradnjo testnih spojin. Metode se med sabo razlikujejo glede na pH sistema (med 5,0 in 6,5), prvotne koncentracije DPPH (vrednost absorbance mora biti manj kot 1,0), reakcijskega časa in valovne dolžine, pri kateri izvajamo meritve absorbance ( $\lambda_{\max} = 515 - 520 \text{ nm}$ ). Sama metoda ima na splošno tudi nekaj omejitev, saj je raztopina DPPH občutljiva na nekatere Lewisove baze, vrste topil (za analizo lahko uporabljamo le organska topila), kisik in svetlobo, vse to pa lahko vpliva na vrednost izmerjene absorbance. Metoda prav tako ni primerna za merjenje antioksidativne aktivnosti plazme, saj se proteini oborijo v alkoholnem mediju (18, 21).

Rezultate navadno podamo z efektivno koncentracijo (vrednost  $EC_{50}$ ), ki je definirana kot koncentracija spojine (antioksidanta), ki povzroči padec absorbance raztopine DPPH za 50 %, kar opazimo kot razbarvanost raztopine. Na podlagi parametra lahko primerjamo antioksidativno aktivnost različnih spojin. Nižja, kot je vrednost  $EC_{50}$ , boljša je antioksidativna sposobnost spojine (19, 22).

## **1.5 SEKUNDARNI AMINI KOT ANTIOKSIDANTI**

Sekundarni amini delujejo kot primarni antioksidanti, saj so odlični donorji vodika. Sintetiziramo lahko produkte različnih oblik in s širokim razponom molekulske mase. So manj sterično ovirani kot fenoli, zaradi česar naj bi pogosto izkazovali večjo aktivnost, vendar se zaradi svoje občutljivosti na svetlobo hitreje razbarvajo, poleg tega pa so njihove odobritve s strani FDA omejene (23).

### **1.5.1 2-aminotiofeni**

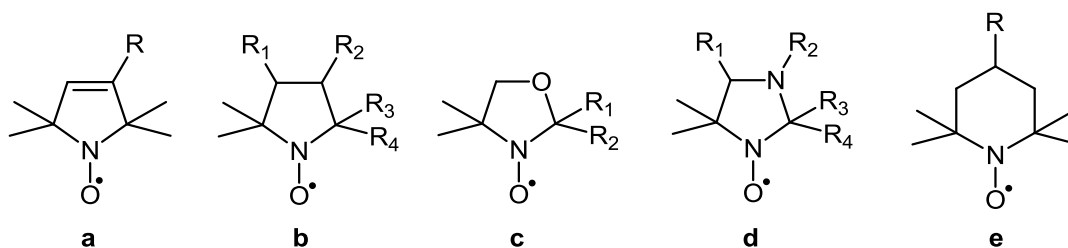
Derivati tiofena so pomembni heterocikli, ki jih najdemo v številnih biološko aktivnih spojinah in so zanimivi predvsem v razvoju zdravil in biodiagnostiki, saj je tiofenski obroč nekakšna zamenjava za fenolno skupino, ki je v veliki meri prisotna v aktivnih sestavinah zdravil. Potencialno so uporabni kot alosterični ojačevalci adenozijskih receptorjev in protitumorna sredstva. 2-aminotiofeni so sterično ovirani amini, ki jih pogosto pridobivamo iz 2,2,6,6-tetrametilpiperidina. Pomembni so na številnih področjih, uporabljajo se kot prekurzorji za spinske označevalce, učinkoviti pa so tudi kot

stabilizatorji. Nekatere spojine tega tipa imajo tudi fiziološke učinke in izkazujejo protitumorno aktivnost, so analgetiki, antipiretiki in antiholinergiki (24, 25, 26).

Polisubstituirane 2-aminotiofene z elektronakceptorskimi skupinami, kot so ciano skupina, etoksikarbonil, aminokarbonil na mestu 3- ali alkil, aril, hetaril skupinami na mestu 4- in 5-, navadno pripravimo z Gewaldovo reakcijo (24).

### 1.5.2 Nitroksidi

Ciklični nitroksidi so stabilni radikali, če na mestu  $\alpha$  v petčlenskem pirolidinskem, pirolinskem ali oksazolidinskem oz. šestčlenskem piperidinskem obroču ni protona (na mestu  $\alpha$  so metilne ali etilne skupine, Slika 4). Metilne skupine preprečujejo dismutacijo dveh radikalov, hkrati pa omejujejo dostop do reaktivnih substanc, kar zagotavlja stabilnost celotne molekule (27). Nitrokside najpogosteje sintetiziramo s procesom oksidacije sekundarnega amina ali hidroksilamina (28).



Slika 4: Najpogosteje zastopani nitroksidni radikali pirolinskega (a), pirolidinskega (b), oksazolidinskega (c), imidazolidinskega (d) in piperidinskega (e) tipa

Nitroksidi imajo značilnosti radikalov, kot je paramagnetizem in obarvanost. Lahko so rumene, oranžne, rdeče, turkizno modre ali vijolične barve, sama barva pa je odvisna od celotne strukture molekule. Zaradi svoje stabilnosti in paramagnetne narave so zelo uporabni kot spinski označevalci in so postali temelj metode spinskega označevanja, ki je zelo pomembna metoda EPR spektroskopije. Zaradi njihove stabilnosti in možnosti kemičnih modifikacij jih lahko selektivno in specifično vežemo na posamezne komponente ali v posamezna področja vzorca, ki ga tako z njihovo prisotnostjo označimo. Stabilni radikali so uporabni tudi v medicini, in sicer kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco in za ugotavljanje oksigenacije tkiv (6, 27).

V industriji polimerov služijo kot iniciatorji v procesu kontrolirane radikalne polimerizacije, ki omogoča izdelavo funkcionalnih in kompleksnih vinilnih polimerov

(PVC). Uporabljajo pa se tudi kot katalizatorji pri selektivnih oksidacijah višjih alkoholov, kar izkorišča predvsem industrija detergentov in naftna industrija. Upočasnjujejo procese staranja polimerov, gum in avtomobilskih barv (6, 28).

Ciklični nitroksidi predstavljajo širok spekter radikalov, ki imajo tudi antioksidativne lastnosti, saj delujejo kot mimetiki encima SOD in so sposobni katalizirati dismutacijo  $O_2^{\bullet-}$ , njihova reducirana oblika, hidroksilamin, pa lahko donira vodikov atom. Antioksidativno aktivnost izkazujejo tako *in vitro* kot *in vivo*, saj prehajajo membrane in tako zlahka zaidejo v intracelularne prostore, kar nam zagotovi koncentracijo v krvi, ki je primerljiva s tisto v *in vitro* študijah. S tem, ko sodelujejo v reakcijah redukcije/oksidacije, lahko modulirajo redoks stanje v celicah in imajo zaradi tega številne biološko pomembne učinke. Z oksidacijo ionov prehodnih kovin do višjega oksidacijskega stanja preprečujejo Fentonovo reakcijo, sposobni so inhibirati lipidno peroksidacijo, vplivajo na različne metabolne procese ter uravnavajo oksidativni stres. Vse te interakcije so lahko uporabne tako za terapevtske kot raziskovalne namene, tudi v smislu zaščite pred ionizirajočim sevanjem, preprečevanjem raka in nadzorom povišanega krvnega tlaka (27, 29, 30).

## 2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali serijo derivatov 2-aminotiofenov iz triacetonamina, sekundarne amine pa bomo oksidirali do stabilnih nitroksidnih radikalov. Spojine bomo identificirali z jedrsko magnetno resonanco (NMR), infrardečo (IR) spektroskopijo in masno spektroskopijo, radikale pa tudi z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR). Pri pripravljenih spojinah pričakujemo antioksidativne lastnosti, ki jih bomo vrednotili s spektrofotometrično metodo spremljanja redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH).

Rezultate bomo podali z efektivno koncentracijo  $EC_{50}$ , ki je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki povzroči padec absorbance raztopine DPPH za 50%. Na podlagi izračuna  $EC_{50}$  bomo nato ocenili učinkovitost sintetiziranih spojin kot potencialnih antioksidantov, rezultate pa bomo primerjali tudi s standardom  $\alpha$ -tokoferolom. Poskušali bomo ugotoviti, ali lahko iz strukture spojin napovemo njihovo antioksidativno delovanje.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 REAGENTI IN TOPILA**

Pri sintezi spojin v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros, Sigma, Fluka, ApolloScientific in Merck, brez predhodne obdelave.

#### **3.2 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATI**

Pri delu smo uporabili naslednje pripomočke:

- Polavtomatske pipete BRAND Transferpette®: 0,5 – 5 mL; Thermo SCIENTIFIC FINNPIPETTE® 100 – 1000 µL
- Nastavki za pipete, BRAND®
- 5 in 10 mL steklene penicilinke, neoLAB
- Mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinami (Techno Plastic Products)
- Parafilm M, BEMIS®
- Steklovina: 25 mL merilna bučka, steklena palčka, čaša
- Kovinska žlička (različni proizvajalci)
- Mikrocentrifugirke 1,5 mL, Eppendorf
- Osebna zaščitna sredstva

Pri delu smo uporabili naslednje aparate:

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

### 3.3 RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA

Za risanje strukturnih formul spojin, reakcij ter poimenovanje po IUPAC nomenklaturi smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 ter ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Za analizo meritev absorbanc, risanje grafov ter izračun vrednosti  $EC_{50}$  smo uporabili računalniški program MS Excel 2010.

Protokol za meritve na mikrotitrskih ploščah smo pripravili v programu Gen5 (BioTek).

### 3.4 ANALIZINE METODE

#### 3.4.1 Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

S TLC smo spremljali potek kemijskih reakcij, izolacije ter čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili plošče TLC Silica gel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijskem nosilcu. Mobilne faze so bile različne in so navedene v naslednjem poglavju pri sintezi posamezne spojine. Detekcija spojin na TLC ploščicah je potekala pod UV svetlobo ( $\lambda = 254$  nm in  $\lambda = 366$  nm), poleg tega pa smo uporabljali tudi različne orositvene reagente (bromkrezolno zeleno, fosfomolibdenova kislina, ninhidrin,  $FeCl_3$ , rodamin 6G, 2,4-dinitrofenilhidrazin), ki so bili pripravljene po standardnem postopku.

- **Kolonska kromatografija**

Produkte spojin smo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo, kjer smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04-0,063 mm proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so navedene v naslednjem poglavju pri sintezi posamezne spojine.

#### 3.4.2 Spektroskopske metode

- **Jedrsko magnetna resonanca (NMR)**

NMR spektre smo posneli na NMR spektrofotometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo posneli v devteriranih topilih  $CDCl_3$  ali



DMSO- $d_6$  z dodanim TMS, kot internim standardom pri 302 K. Spektre smo procesirali z računalniškim programom NMRnotebook Version 2.70 build 0.9 proizvajalca NMRtec.

- **Masna spektrometrija (MS)**

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru Advion expression<sup>L</sup> na FFA. Masni spektri visoke ločljivosti so bili posneti na masnem spektrometru VG-AnalyticalAutoSpec Q proizvajalca Micromass (Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- **Infrardeča (IR) spektroskopija**

IR-spektre smo posneli na spektrofotometru ThermoNicoletNexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo z uporabo tehnike oslABLJENE popolne odbojnosti (ATR). Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

- **Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)**

EPR spektre smo posneli na spektrofotometru MiniScope MS400 na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Meritve so bile opravljene pri frekvenci mikrovalov 9,3-9,55 GHz, atenuaciji mikrovalov 10 dB, modulacijski frekvenci 100 kHz in modulacijski amplitudi 1000 mG. Časovni obseg meritve je bil 60 s/posnetek, vsak spekter pa smo trikrat sešteli ter tako izboljšali razmerje med signalom in šumom. Priprava vzorcev za snemanje EPR spektrov je opisana v poglavju 4.3.

### **3.4.3 Določevanje tališč**

Spojnam, ki so bile pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, smo določili temperaturo tališča s pomočjo Kofflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Tališča niso korigirana.

### **3.4.4 Vrednotenje antioksidativnih lastnosti**

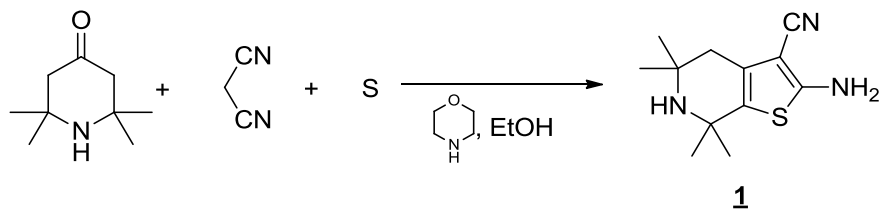
Antioksidativne lastnosti spojin smo vrednotili s pomočjo testa sposobnosti redukcije radikala DPPH. Za merjenje absorbanc preiskovanih raztopin smo uporabljali mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinami in mikrotitrski čitalec Synergy H4 Hybrid Reader s programsko opremo Gen5 (BioTek).

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 SINTEZA SPOJIN

Sinteza 2-amino-5,5,7,7-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-3-karbonitrila

(**1**)

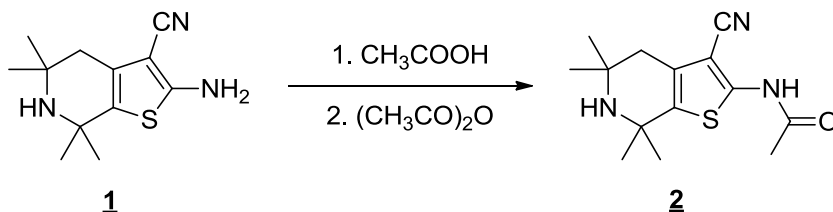


V 250 mL bučko smo natehtali 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-on (34,6 g; 200 mmol), malononitril (13,3 g; 200 mmol) in žveplo (6,4 g; 200 mmol) ter dodali etanol (88 mL) kot topilo. Med mešanjem smo dokapali morfolin (20 mL). Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli štiri ure pri 45 °C. Reakcijsko zmes smo ohladili, prenesli v čašo in dolili vodo (260 mL). Suspenzijo smo dobro premešali in pokrito čašo postavili na okensko polico (4 °C) čez noč. Naslednji dan smo odnučali sivo-rjavo oborino in jo posušili na zraku (**1**; 39,19 g).

#### Rezultati analize

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | Rjavi kristali  |
| <b>Izkoristek</b>  | 83,3 %  |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1) | 0,41  |
| <b>Tališče</b>   | 195 - 197 °C  |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)             | δ(ppm) = 1,23 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,40 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,34 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -); 4,72 (s, 2H, -NH <sub>2</sub> ). |
| <b>IR (ATR)</b>  | 3362, 3317, 2963, 2200, 1663, 1520, 1408, 1382, 1369, 1278, 1242, 1189, 1155 cm <sup>-1</sup> .   |
| <b>MS (ESI)</b>  | <i>m/z</i> = 234,23 (M - H) <sup>-</sup>  |

**Sinteza** *N*-(3-ciano-5,5,7,7-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il)acetamida (**2**)

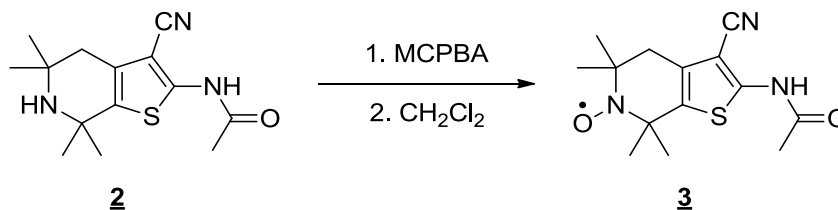


V 100 mL bučko smo natehtali spojino **1** (2,35 g; 10,0 mmol) in jo raztopili v diklorometanu (30 mL). Med mešanjem smo s kapalnikom počasi dokapali očetno kislino (0,86 mL; 15 mmol) v diklorometanu (10 mL) in mešali še pol ure. Nato smo odparili topilo na rotavaporju in k suhemu ostanku dodali acetanhidrid (10 mL). Reakcijsko zmes smo refluktirali 15 minut na oljni kopeli pri 156 °C. Nato smo jo ohladili na sobno temperaturo na ledeni kopeli in izpadli so majhni beli kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem. Oborino smo nato prenesli v čašo in jo raztopili v vodi (100 mL), ki smo ji dodali še tri kapljice očetne kisline. Ker se je vse raztopilo (rahlo rjava raztopina), filtracija ni bila potrebna. K raztopini smo za uravnavo pH dodali dve žlički Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Pri tem se je bistra raztopina zamotnila in takoj so izpadli beli kristali, ki smo jih odnučali in sprali z nekaj vode. Bele kristale smo sušili z membransko črpalko (**2**; 2,51 g).

**Rezultati analize**

|  |  |
|--|--|
| <b>Izgled</b>  | Beli kristali  |
| <b>Izkoristek</b>  | 90,5 %   |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1) | 0,46   |
| <b>Tališče</b>   | 172 - 175 °C   |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)             | δ(ppm) = 1,23 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,48 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,32 (s, 3H, -CO-CH <sub>3</sub> ); 2,48 (s, 2H,-CH <sub>2</sub> -); 9,07 (s, 1H, -NH-CO-). |
| <b>IR (ATR)</b>  | 3268, 3218, 2973, 2913, 2217, 1691, 1569, 1543, 1462, 1382, 1364, 1277, 1245, 1200, 1156, 1017 cm <sup>-1</sup> .  |
| <b>MS (ESI)</b>  | <i>m/z</i> = 276,2 (M - H) <sup>-</sup>  |

**Sinteza** *N*-(3-ciano-6-oksil-5,5,7,7-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il)acetamida (**3**)

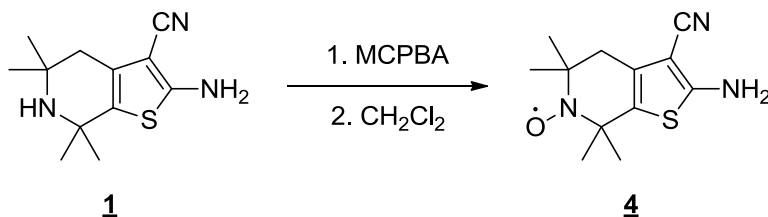


Spojino **2** (0,50 g; 1,80 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 mL) in ohladili na ledeni kopeli. Pri tem je spojina deloma izpadla zaradi presežne topnosti. 0,414 g meta-kloroperoksibenzojske kisline (MCPBA; 0,311 čiste; 1,80 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 mL) in jo počasi dokapali v reakcijsko zmes. Nato smo ledeno kopel umaknili in mešali še eno uro pri sobni temperaturi. Reakcijska zmes se je zbistrla in obarvala značilno oranžno. Raztopino smo prenesli v lij ločnik, jo spirali 12 × z NaHCO<sub>3</sub> in 1 × z NaCl, sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili na rotavaporju. Zaostala je fina oranžna pena, ki je počasi kristalizirala. Produkt smo čistili na koloni silikagela (50 g) z mobilno fazo diklorometan/metanol: 100/1 in zbrali oranžno obarvane frakcije v bučko, kjer smo topilo uparili na rotavaporju (**3**; 0,20 g).

**Rezultati analize**

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | Oranžni kristali  |
| <b>Izkoristek</b>  | 38,1 %  |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1) | 0,75  |
| <b>Tališče</b>   | 179 - 183 °C  |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)             | δ(ppm) = 2,35 (s, 3H, -CO-CH <sub>3</sub> ); 8,59 (s, 1H, -NH-CO-).<br>Ostali protoni zaradi bližine nesparjenega elektrona niso vidni.                           |
| <b>IR (ATR)</b>  | 3268, 3220, 3080, 2980, 2222, 1691, 1582, 1542, 1413, 1392, 1362, 1329, 1299, 1265, 1245, 1179, 1151, 1126, 1036, 1018 cm <sup>-1</sup> .                         |
| <b>MS (ESI)</b>  | <i>m/z</i> = 291,1 (M - H) <sup>-</sup>   |
| <b>HRMS (ESI)</b>  | <i>m/z</i> = izračunana vrednost za C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S: 292,1120 (M) <sup>+</sup> ,<br>izmerjena vrednost: 292,1112. |
| <b>EPR: a<sub>N</sub></b> (etanol)                                 | 1,551 mT  |

**Sinteza 2-amino-6-oksil-5,5,7,7-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-karbonitrila (4)**

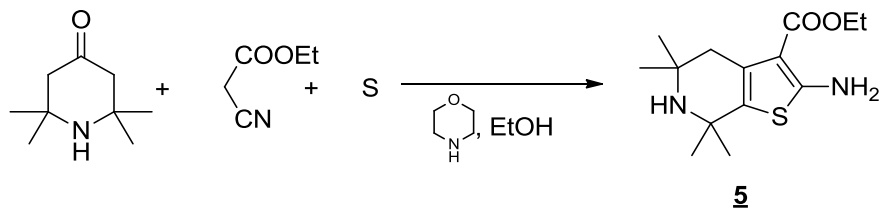


Spojino **1** (427 mg, 1,80 mmol) smo raztopili v diklorometanu (30 mL) in ohladili na ledeni kopeli. MCPBA (0,389 g; 2,25 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 mL) in jo nato med stalnim mešanjem na magnetnem mešalu počasi dokapali aminu. Ledeno kopel smo umaknili in mešali še eno uro pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, da se je zbistnila. Raztopino smo naslednji dan prenesli v lij ločnik, spirali 12 × z NaHCO<sub>3</sub>, sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili na rotavaporju. Produkt smo čistili na koloni silikagela (30 g) z mobilno fazo diklorometan/metanol: 100/1. Frakcije smo analizirali s TLC in ustrezne zbrali v bučko. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, produkt je kristaliziral kot fina pena (**4**; 195 mg).

**Rezultati analize**

|   |   |
|---|---|
| <b>Izgled</b>   | Temno oranžni kristali  |
| <b>Izkoristek</b>   | 43,27 %   |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1)                          | 0,74  |
| <b>Tališče</b>  | 117 - 119 °C  |
| <b><sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, po redukciji s Ph-NH-NH<sub>2</sub>)</b> | δ(ppm) = 1,13 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,31 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,37 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -); 6,65 (s, 2H, -NH <sub>2</sub> ); 7,64 (s, 1H, N-OH). |
| <b>IR (ATR)</b>   | 3315, 3206, 2977, 2932, 2203, 1624, 1519, 1465, 1416, 1379, 1361, 1270, 1250, 1178, 1146, 1124, 1084, 1048, 1007 cm <sup>-1</sup> .                                       |
| <b>MS (ESI)</b>   | <i>m/z</i> = 249,2 (M - H) <sup>-</sup>   |
| <b>HRMS (ESI)</b>   | <i>m/z</i> = izračunana vrednost za C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> OS: 251,1092 (MH) <sup>+</sup> , izmerjena vrednost: 251,1093.                         |
| <b>EPR: a<sub>N</sub></b> (etanol)  | 1,561 mT  |

**Sinteza etil 2-amino-5,5,7,7-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-karboksilata (5)**

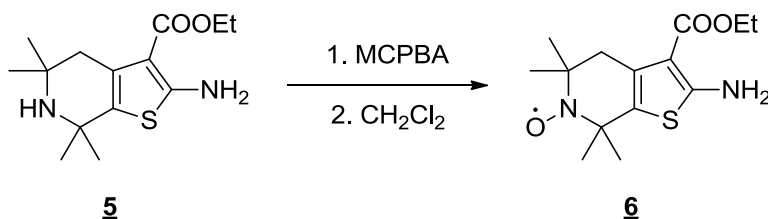


V 250 mL bučko smo natehtali triacetonamin (34,6 g; 200 mmol), etilcianoacetat (22,6 g; 200 mmol) in žveplo (6,4 g; 200 mmol), dodali etanol (50 mL) in med mešanjem dokapali morfolin. Reakcijsko zmes smo štiri ure mešali na oljni kopeli pri 45 °C ter jo nato ohladili, prelili v čašo in dodali vodo (260 mL). Zmes smo intenzivno mešali še 5 minut, nato pa smo pokrito čašo postavili na okensko polico čez noč (+2 °C). Spojina ni takoj izpadla, ampak sta se ločili vodna in oljna faza. Naslednji dan smo skoraj popolnoma prosojno vodno fazo previdno odlili, deloma olje - deloma kristali pa so dokončno kristalizirali. Kristale smo nato sušili na zraku (5; 48,3 g).

**Rezultati analize**

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | Oranžno-rdeči kristali  |
| <b>Izkoristek</b>  | 85,6 %  |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1) | 0,39  |
| <b>Tališče</b>   | 115 - 119 °C  |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)             | δ(ppm) = 1,22 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,36 (t, 3H, J = 7,1 Hz, -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,40 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,62 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -); 4,29 (q, 2H, J = 7,1 Hz, -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 5,99 (s, 2H, -NH <sub>2</sub> ). |
| <b>IR (ATR)</b>  | 3381, 3285, 2967, 1649, 1600, 1578, 1493, 1460, 1444, 1406, 1377, 1364, 1345, 1289, 1262, 1168, 1147, 1124, 1085, 1023, 1008 cm <sup>-1</sup> .   |
| <b>MS (ESI)</b>  | m/z = 283,0 (M - H) <sup>-</sup>  |

**Sinteza etil 2-amino-6-oksil-5,5,7,7-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-3-karboksilata (**6**)**

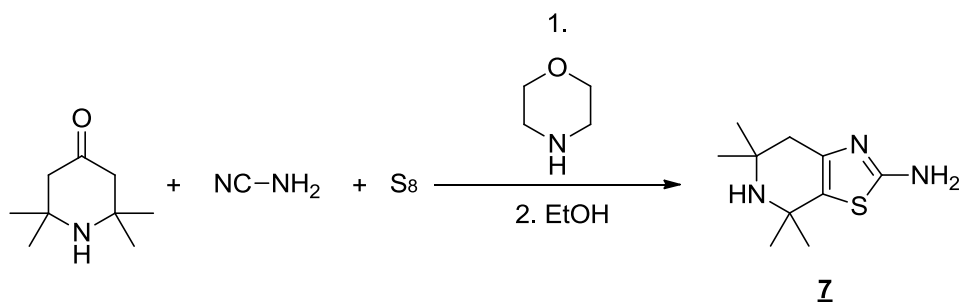


506 mg spojine **5** (1,80 mmol) smo raztopili v diklorometanu (30 mL) in ohladili na ledeni kopeli. 517,5 mg MCPBA (0,389 g; 2,25 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 mL) in jo nato med stalnim mešanjem reakcijske zmesi na magnetnem mešalu počasi dokapali aminu. Ledeno kopel smo umaknili in mešali še eno uro pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, da se je zbistnila. Raztopino smo naslednji dan prenesli v lij ločnik, spirali 12 × z NaHCO<sub>3</sub>, sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili na rotavaporju. Produkt smo čistili na koloni silikagela (30 g) z mobilno fazo diklorometan/metanol: 100/1. Frakcije smo analizirali s TLC in ustrezne zbrali v bučko. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Ko je izhlapelo, je ostalo oranžno olje (**6**; 314 mg).

**Rezultati analize**

|   |   |
|---|---|
| <b>Izgled</b>   | Oranžno olje  |
| <b>Izkoristek</b>   | 58,66 %   |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1)                              | 0,79  |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz, po redukciji s Ph-NH-NH <sub>2</sub> ) | δ(ppm) = 1,11 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,25 (t, 3H, J = 7,1 Hz, -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,31 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,64 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -); 4,16 (q, 2H, J = 7,1 Hz, -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 7,27 (s, 2H, -NH <sub>2</sub> ); 7,53 (s, 1H, N-OH). |
| <b>IR</b> (ATR)   | 3419, 3313, 2976, 2933, 1668, 1581, 1488, 1465, 1417, 1360, 1341, 1303, 1250, 1170, 1114, 1085, 1022 cm <sup>-1</sup> .   |
| <b>MS</b> (ESI)   | m/z = 320,2 (M + Na) <sup>+</sup>   |
| <b>HRMS</b> (ESI)   | m/z = izračunana vrednost za C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S: 299,1429 (M+2) <sup>+</sup> , izmerjena vrednost: 299,1433.   |
| <b>EPR</b> : a <sub>N</sub> (etanol)  | 1,574 mT  |

## Sinteza 4,4,6,6-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotiazolo[5,4-c]piridin-2-amina (**7**)



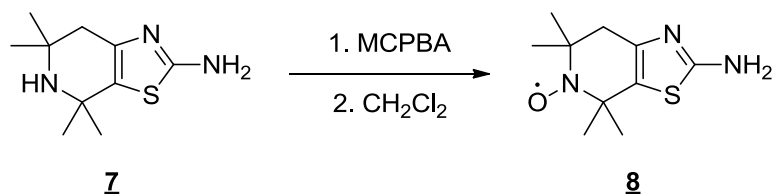
V 250 mL bučko smo natehtali triacetonamin (15,5 g; 100 mmol), cianamid (4,20 g; 100 mmol) in žveplo (3,2 g; 100 mmol), dodali etanol (20 mL) in med mešanjem dokapali morfolin. Reakcijsko zmes smo mešali še tri ure na oljni kopeli pri 40 °C, nato pa smo jo ohladili na sobno temperaturo in dodali vodo (150 mL). Ob intenzivnem mešanju na ledeni kopeli smo dodali še 37 % HCl<sub>(aq)</sub> do pH 1 tako, da se skoraj vse raztopi. Nato smo oborino odfiltrirali in filtrat (rjavo-rdeče barve) 3 × sprali v 100 mL etra. Vodno fazo smo nato naalkalili z NaOH do pH 7, nato pa smo dodali nekaj žlic K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> do pH 11-12, da se je pojavil bel precipitat. Oborino smo odnučali in jo sušili na zraku (**7**; 10,1 g).

### Rezultati analize

|  |  |
|--|--|
| <b>Izgled</b>  | Rdeči kristali   |
| <b>Izkoristek</b>  | 47,9 %   |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1) | 0,13   |
| <b>Tališče</b>   | 184 - 188 °C   |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)             | 1,25 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,43 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,45 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -); 4,81 (s, 2H, -NH <sub>2</sub> ). |
| <b>IR (ATR)</b>  | 3211, 3030, 3001, 2965, 2935, 1638, 1575, 1514, 1376, 1364, 1302, 1267, 1247, 1198, 1155, 1091, 1067, 1017, 1003 cm <sup>-1</sup> .          |
| <b>MS (ESI)</b>  | <i>m/z</i> = 212,1 (M + H) <sup>+</sup>  |



### Sinteza 2-amino-4,4,6,6-tetrametil-4,5,6,7-tetrahidrotiazolo[5,4-c]piridin-5-oksil (**8**)



380,4 mg spojine **7** (1,80 mmol) smo raztopili v diklorometanu (30 mL) in ohladili na ledeni kopeli. 517,5 mg MCPBA (0,389 g; 2,25 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 mL) in jo nato med stalnim mešanjem na magnetnem mešalu počasi dokapali aminu. Ledeno kopel smo umaknili in mešali še eno uro pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi, da se je zbistrila. Raztopino smo naslednji dan prenesli v lij ločnik, spirali 12 × z NaHCO<sub>3</sub>, sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in topilo uparili na rotavaporju. Produkt smo čistili na koloni silikagela (30 g) z mobilno fazo diklorometan/metanol: 50/1. Frakcije smo analizirali s TLC in ustrezne zbrali v bučko. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, produkt je kristaliziral kot fina pena (**8**; 211 mg).

#### Rezultati analize

|   |   |
|---|---|
| <b>Izgled</b>   | Oranžni kristali  |
| <b>Izkoristek</b>   | 51,76 %   |
| <b>R<sub>f</sub></b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH : 9/1)                          | 0,47  |
| <b>Tališče</b>  | 150 - 154 °C  |
| <b><sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, po redukciji s Ph-NH-NH<sub>2</sub>)</b> | δ(ppm) = 1,12 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 1,31 (s, 6H, 2 × -CH <sub>3</sub> ); 2,41 (s, 2H, -CH <sub>2</sub> -); 6,71 (s, 2H, -NH <sub>2</sub> ); 7,54 (s, 1H, N-OH). |
| <b>IR (ATR)</b>   | 3343, 3111, 2979, 2935, 1637, 1599, 1536, 1463, 1438, 1394, 1376, 1357, 1325, 1280, 1244, 1219, 1179, 1148, 1126, 1076, 1045, 1012 cm <sup>-1</sup> .                     |
| <b>MS (ESI)</b>   | <i>m/z</i> = 227,1 (M) <sup>+</sup>   |
| <b>HRMS (ESI)</b>   | <i>m/z</i> = izračunana vrednost za C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> OS: 227,1092 (MH) <sup>+</sup> , izmerjena vrednost: 227,1090.                         |
| <b>EPR: a<sub>N</sub></b> (etanol)  | a <sub>N</sub> (etanol) = 1,573 mT  |

## **4.2 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI**

### **4.2.1 Priprava raztopin**

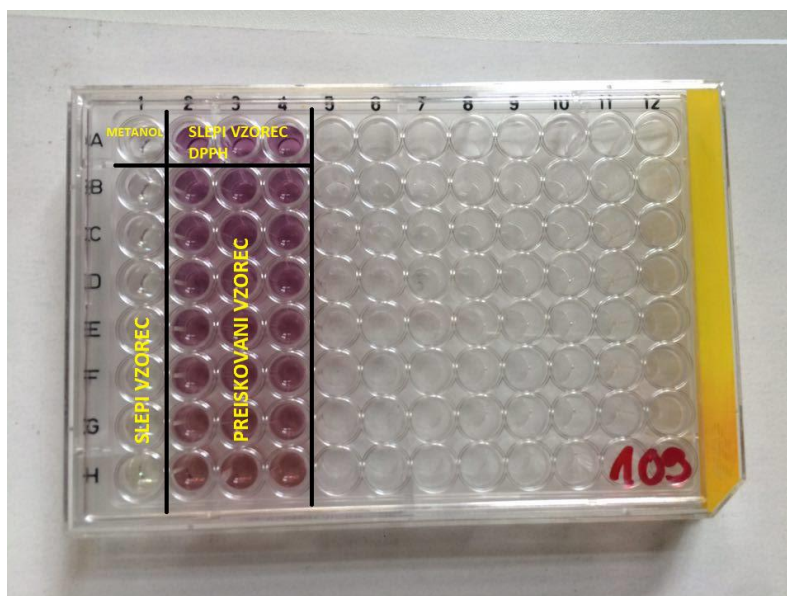
Za pripravo raztopin naših spojin, raztopine standarda ( $\alpha$ -tokoferola) in DPPH smo kot topilo uporabili metanol, ker so vse spojine v njem dobro topne. Kjer se kristali spojin niso takoj raztopili, smo si pomagali s soniciranjem v ultrazvočni kadički, pripravljene raztopine pa so bile bistre.

Pripravili smo osnovno raztopino DPPH, katere koncentracija je znašala 700  $\mu$ M. Raztopino smo pripravljali vsakodnevno, hranili pa smo jo v hladilniku, zaščiten pred svetlobo, saj radikal v njej ni dolgo stabilen. Osnovno raztopino smo  $5 \times$  redčili in na ta način pripravili delovno raztopino DPPH s koncentracijo 140  $\mu$ M. Delovno raztopino smo nato uporabili za nadaljnja testiranja, njena koncentracija v testni raztopini pa je znašala 70  $\mu$ M, saj smo jo mešali z vzorcem v razmerju 1:1.

Osnovne raztopine (1,0 - 1,6 mM) vseh osmih spojin in osnovno raztopino standarda smo pripravili po enakem postopku kot raztopino DPPH. Te smo nato redčili tako, da smo dobili za vsako spojino po sedem vzorcev različnih koncentracij (1,6 mM - 25  $\mu$ M), ki smo jih nato uporabili za meritve, njihove koncentracije pa so v testni raztopini bile za polovico nižje.

### **4.2.2 Določanje vrednosti EC<sub>50</sub>**

Vzorci različnih koncentracij smo nanесли na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami. Na eni mikrotitrski ploščici lahko hkrati izvajamo meritve v treh alikvotih (testiramo lahko tri različne spojine v največ sedmih različnih koncentracijah). Slika 5 prikazuje nanos ene spojine v sedmih različnih koncentracijah.



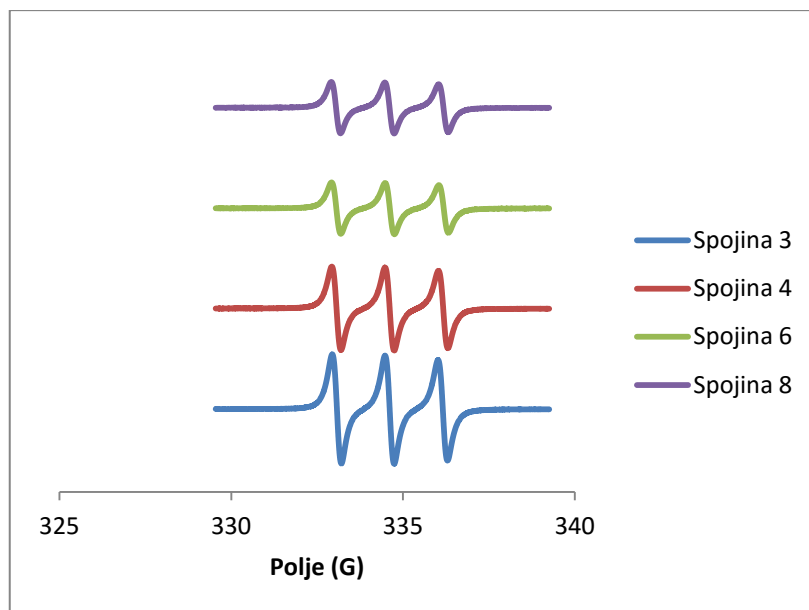
Slika 5: Primer nanosa raztopin vzorcev in DPPH na mikrotitrsko ploščico

V vsako vdolbinico gre po 300  $\mu\text{L}$  raztopine. Preiskovani vzorec je sestavljen iz 150  $\mu\text{L}$  preiskovane spojine, kateri smo dodali 150  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH. Na ploščico smo nanegli tudi slepi vzorec (150  $\mu\text{L}$  preiskovane spojine + 150  $\mu\text{L}$  metanola), saj čitalec ozadja ne odšteje samodejno, in pa slepi vzorec DPPH (150  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH + 150  $\mu\text{L}$  metanola). Primerno pripravljene ploščice s testnimi raztopinami smo nato inkubirali 90 minut pri sobni temperaturi in zaščitene pred svetlobo, nato pa smo s pomočjo mikrotitrskega čitalca pomerili absorbance (absorbanco smo merili pri 517 nm). Pridobljene podatke smo nato uvozili v program Excel. Absorbance slepega vzorca smo odšteli od povprečja absorbanc preiskovanega vzorca, nato pa smo izrisali graf odvisnosti % DPPH od koncentracije testirane spojine. Eksperimentalnim točkam smo prilegali premico. Iz grafa smo dobili enačbo premice, ki smo jo potrebovali za izračun vrednosti  $\text{EC}_{50}$ .

Po enakem postopku smo izmerili tudi antioksidativno delovanje standarda  $\alpha$ -tokoferola.

### 4.3 EPR SPEKTROSKOPIJA NITROKSIDOV

Pripravili smo raztopine nitroksidov (spojine **3**, **4**, **6** in **8**) v etanolu. V penicilinko smo približno natančno natehtali od 1 do 2 mg posameznega nitroksida ter dodali toliko etanola, da smo dobili 1 mM osnovne raztopine nitroksidov. Z raztopino smo napolnili stekleno kapilaro (1 mm notranjega premera). Danim raztopinam smo nato pomerili EPR spektre (Slika 6).



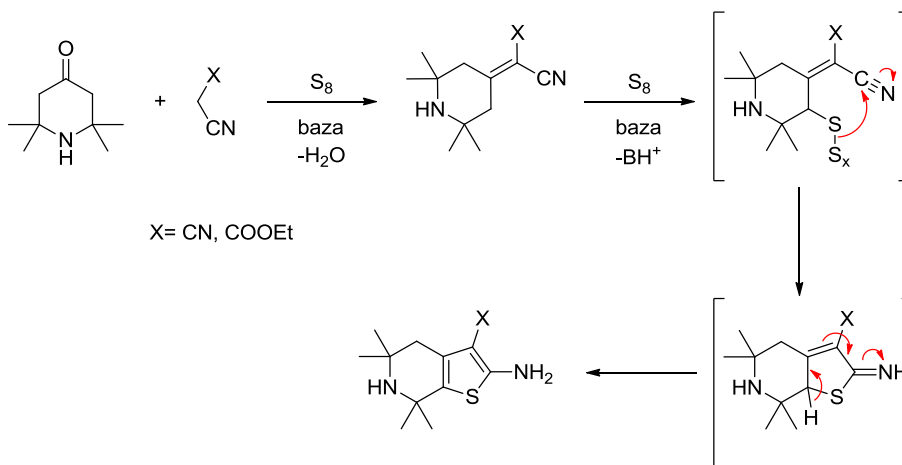
*Slika 6: EPR spektri etanolnih raztopin nitroksidov 3, 4, 6 in 8*

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 RAZLAGA REAKCIJSKIH MEHANIZMOV

#### 5.1.1 Gewaldova reakcija

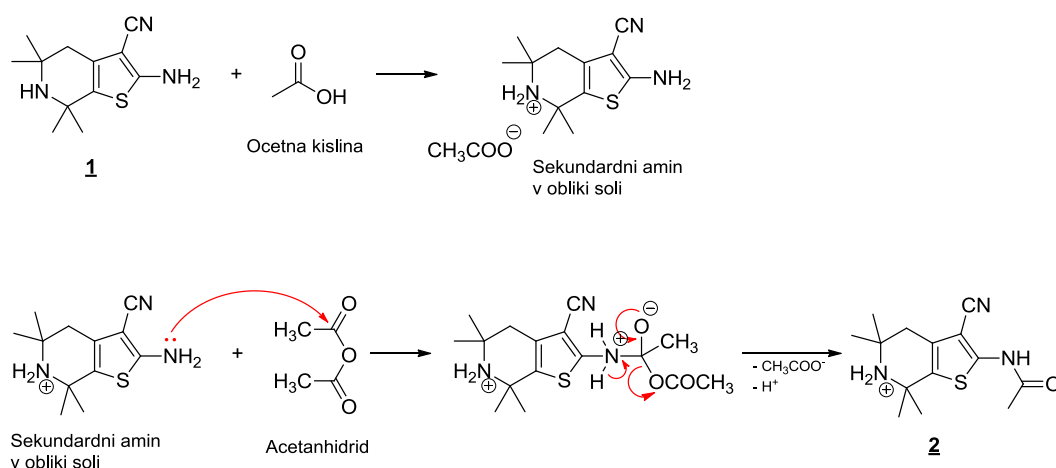
Spojine **1**, **5** in **7** smo pripravili po Gewaldovi reakciji. Reakcijo je v šestdesetih letih prejšnjega stoletja predstavil Karl Gewald. Gre za kondenzacijo ketonov ali aldehydov z aktiviranimi acetonitrili in elementarnim žveplom v prisotnosti primerne baze, reakcija pa poteče v treh osnovnih korakih: kondenzacija, adicija žvepla in zaprtje obroča (ciklizacija). Biciklične 2-aminotiofene smo pripravili iz 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (ali triacetonamina), kjer v reakciji z malononitrilom ali etilcianoacetatom preko Knoevenagelove kondenzacije v prvem koraku nastane  $\alpha,\beta$ -nenasičen nitril, nato pa sledi reakcija z žveplom. Aktivirano žveplo se adira na  $\alpha,\beta$ -nenasičen nitril, pred samo adicijo žvepla pa se mora iz metilne skupine na  $\alpha,\beta$ -nenasičenem nitrilu odcepiti proton. Za aktivacijo žvepla in deprotonacijo je potrebna prisotnost baze (v našem primeru je to morfolin). Pri adiciji pride do reakcije elementarnega žvepla z aminom, pri tem pa nastane polisulfidni anion, ki se obnaša kot nukleofil. Nukleofilni napad žvepla na trojno vez v ciano skupini pa povzroči spontano ciklizacijo (Slika 7). Kot topilo smo uporabili etanol, saj naj bi polarna topila izboljšala kondenzacijo reakcijskega intermediata ( $\alpha,\beta$ -nenasičenega nitrila) z žveplom. Izkoristek sinteze spojin **1** (83,3 %) in **5** (85,6 %) je bil dober. Pri podobni ciklokondenzaciji triacetonamina s cianamidom smo prav tako dobili ustrezen aminotiazol (**7**), izkoristek reakcije pa je v tem primeru bil nekoliko nižji, a še vedno zmeren (47,9 %) (24, 26, 31).



Slika 7: Reakcijski mehanizem Gewaldove reakcije

### 5.1.2 Tvorba amida z acetanhidridom

Spojino **2** smo sintetizirali iz spojine **1** z acetiliranjem z acetanhidridom, izkoristek reakcije pa je bil dober (90,5 %). Spojina **1** ima v svoji strukturi dva amina, ki sta zaradi neveznega elektronskega para dobra nukleofila. Ker pa je sekundarni alifatski amin boljši nukleofil kot primarni aromatski amin, smo najprej pripravili sol z uporabo očetne kisline (bolj bazičen je sekundarni alifatski amin). V naslednjem koraku sledi acetiliranje in ker sekundarni amin ostane v obliki soli, amonijev ion ni več nukleofil. Kot nukleofil reagira samo amino skupina na aromatskem obroču, ki se najprej adira na karbonylni skupino acetanhidrida. Gre za nukleofilno adicijo, kateri sledi eliminacija, odcepi se proton in acetat oz. očetna kislina (produkt hidrolize acetanhidrida), pri tem pa nastane amid **2** (32, 33, Slika 8).

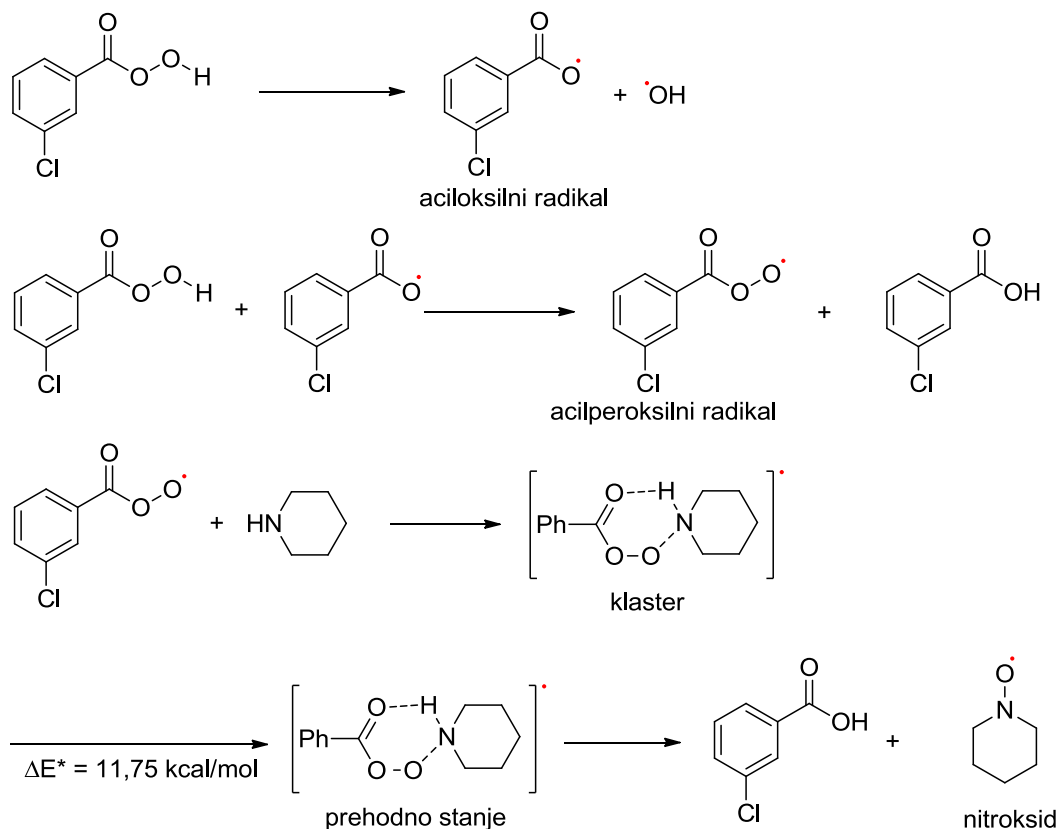


Slika 8: Reakcijski mehanizem tvorbe amida z acetanhidridom

### 5.1.3 Oksidacija amina do nitroksida

Nitroksidne radikale (**3**, **4**, **6** in **8**) smo pripravili z oksidacijo sterično oviranih sekundarnih aminov, kjer smo kot oksidant uporabili meta-kloroperoksibenzojsko kislino (MCPBA). V prvem koraku poteče homolitska cepitev peroksi vezi v kislini, pri tem nastaneta dva primarna radikala. S tem, ko primarni aciloksilni radikal odvzame vodikov atom iz -OOH skupine peroksi kisline, pride do nastanka acilperoksilnega radikala. V reakciji sekundarnega amina z acilperoksilnim radikalom pride do spontanega nastanka klastra. Iz klastra nastane prehodno stanje, kjer je približno polovica populacije neparjenih elektronov iz peroksilnega radikala že lokalizirana na dušikovem atomu sekundarnega amina. Tvorba nitroksidnega radikala nato poteče v dveh korakih: najprej pride do prenosa

terminalnega kisika iz peroksilnega radikala na dušikov atom sekundarnega amina (tvorba N-O vezi), temu pa sledi še prenos vodikovega atoma iz N-H skupine amina na kisikov atom peroksi kisline. Gre za proces z nizko aktivacijsko energijo (34, Slika 9). Izkoristki naših reakcij niso bili optimalni, a so vseeno zmerni, saj se gibljejo okoli 50 %. Nekoliko slabši izkoristek smo dobili le pri spojini **3** (38,1 %).



Slika 9: Mehanizem reakcije oksidacije sekundarnega amina do nitroksida

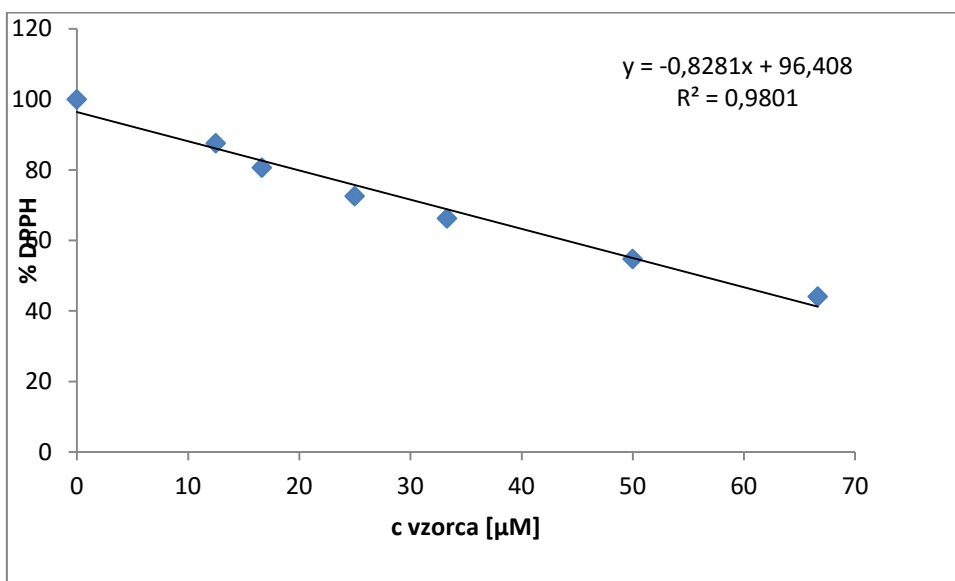
## 5.2 REZULTATI VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

Po sintezi aminotiofenov in nitroksidov smo vrednotili njihove antioksidativne lastnosti z DPPH testom. Spodnje preglednice prikazujejo koncentracije spojin, ki smo jih uporabili, njihove izmerjene absorbance in odstotek preostalega DPPH po 90 minutah inkubacije (Preglednice 1-9). Deleže DPPH v odvisnosti od koncentracije posamezne spojine smo prikazali v obliki grafov (Slike 10-18), s pomočjo katerih smo nato izračunali vrednosti  $EC_{50}$ .

## Spojina 1

Preglednica I: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 1

| c spojine <u>1</u> [ $\mu\text{M}$ ] | c DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|--------------------------------------|--------------------------|------------|--------|
| 0                                    | 70                       | 0,428667   | 99,9   |
| 12,5                                 | 70                       | 0,375333   | 87,6   |
| 16,65                                | 70                       | 0,345667   | 80,6   |
| 25                                   | 70                       | 0,311      | 72,6   |
| 33,3                                 | 70                       | 0,284      | 66,3   |
| 50                                   | 70                       | 0,234667   | 54,7   |
| 66,65                                | 70                       | 0,189      | 44,1   |



Slika 10: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 1

### Izračun vrednosti $EC_{50}$ :

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,8281x + 96,408$

Iz enačbe umeritvene premice izpostavimo  $x$ , ki predstavlja koncentracijo, za  $y$  pa vstavimo vrednost 50, ki predstavlja delež nezreagirane DPPH.



$$x = \frac{96,408 - 50}{0,8281} = 56,04154 \mu M$$

S pomočjo Excelove funkcije STEYX izračunamo standardno napako. Dobili smo vrednost STEYX = 2,967579.

Nato izračunamo še standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{96,408 - 50 - 2,967579}{0,8281} = 52,45794$$

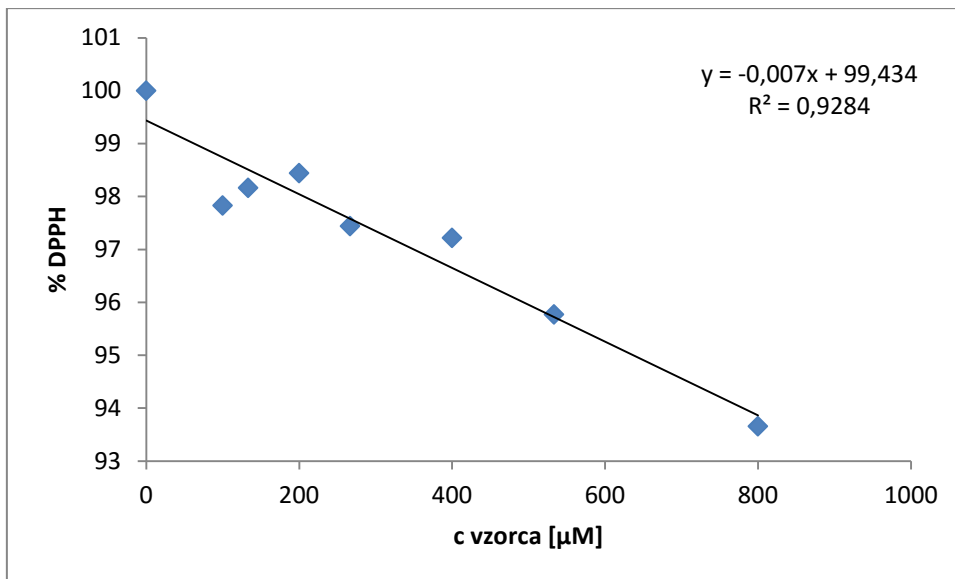
$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 56,04154 - 52,45794 = 3,5836$$

Rezultat podamo kot vrednost  $EC_{50}$  skupaj s standardnim odklonom:  $EC_{50} \pm SD = 56,0 \pm 3,6 \mu M$ .

## **Spojina 2**

*Preglednica II: Rezultati meritev absorbanca pri DPPH testu za spojino 2*

| c spojine 2 [ $\mu M$ ] | c DPPH [ $\mu M$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|-------------------------|--------------------|------------|--------|
| 0                       | 70                 | 0,599      | 100    |
| 100                     | 70                 | 0,586      | 97,8   |
| 133,35                  | 70                 | 0,588      | 98,2   |
| 200                     | 70                 | 0,589667   | 98,4   |
| 266,65                  | 70                 | 0,583667   | 97,4   |
| 400                     | 70                 | 0,582333   | 97,2   |
| 533,35                  | 70                 | 0,573667   | 95,8   |
| 800                     | 70                 | 0,561      | 93,7   |



Slika 11: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 2

Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>:

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,007x + 99,434$

$$x = \frac{99,434 - 50}{0,007} = 7062,0 \mu\text{M}$$

$$\text{STEYX} = 0,549233$$

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{99,434 - 50 - 0,549233}{0,007} = 6983,538$$

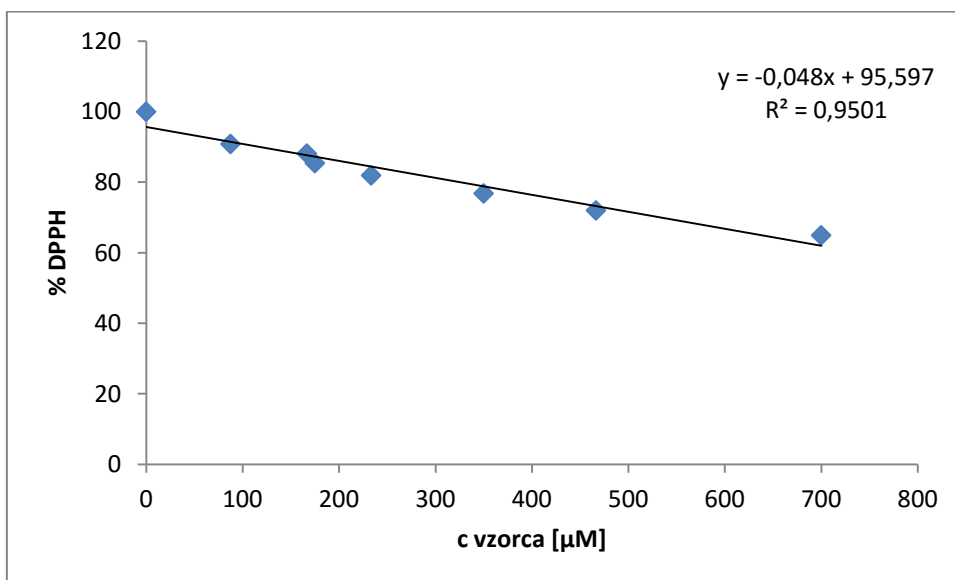
$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 7062 - 6983,538 = 78,46182$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 7062,0 \pm 78,5 \mu\text{M}$ .

### Spojina 3

Preglednica III: Rezultati meritev absorbanca pri DPPH testu za spojino 3

| c spojine 3 [μM] | c DPPH [μM] | Absorbanca | % DPPH |
|------------------|-------------|------------|--------|
| 0                | 70          | 0,539333   | 100    |
| 87,5             | 70          | 0,49       | 90,9   |
| 166,7            | 70          | 0,475333   | 88,1   |
| 175              | 70          | 0,460667   | 85,4   |
| 233,35           | 70          | 0,442      | 82,0   |
| 350              | 70          | 0,414333   | 76,8   |
| 466,5            | 70          | 0,388333   | 72,0   |
| 700              | 70          | 0,350333   | 65,0   |



Slika 12: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 3

Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>:

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,048x + 95,597$

$$x = \frac{95,597 - 50}{0,048} = 949,9375 \mu M$$

STEYX = 2,683944

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{95,597 - 50 - 2,683944}{0,048} = 894,022$$

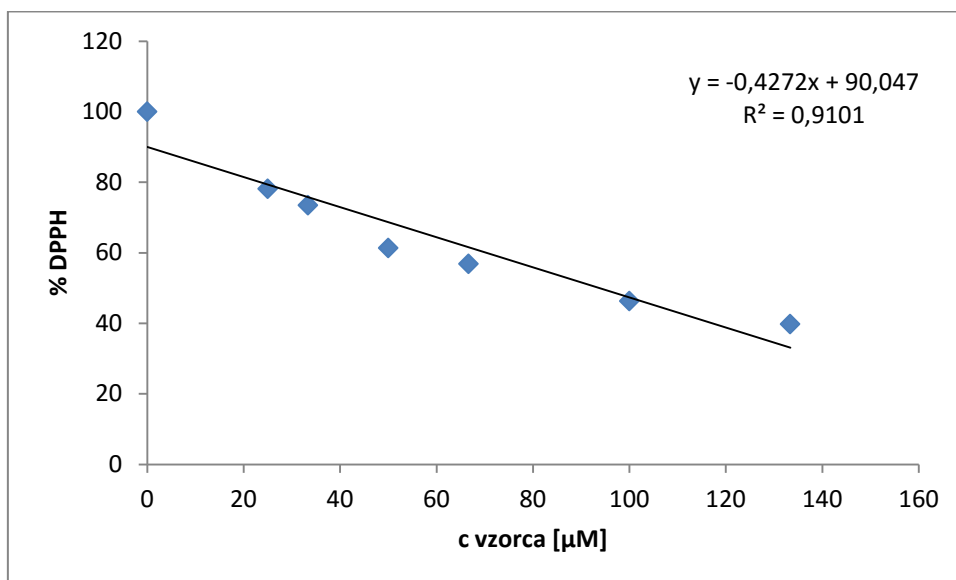
$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 949,9375 - 894,022 = 55,9155$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 949,9 \pm 55,9 \mu\text{M}$ .

### **Spojina 4**

*Preglednica IV: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 4*

| c spojine 4 [ $\mu\text{M}$ ] | c DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|-------------------------------|--------------------------|------------|--------|
| 0                             | 70                       | 0,571667   | 99,9   |
| 25                            | 70                       | 0,446667   | 78,1   |
| 33,35                         | 70                       | 0,42       | 73,5   |
| 50                            | 70                       | 0,350667   | 61,3   |
| 66,65                         | 70                       | 0,325      | 56,9   |
| 100                           | 70                       | 0,264667   | 46,3   |
| 133,35                        | 70                       | 0,227333   | 39,8   |



Slika 13: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 4

### Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>:

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,4272x + 90,047$

$$x = \frac{90,047 - 50}{0,4272} = 93,74298 \mu M$$

$$STEYX = 6,753586$$

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{90,047 - 50 - 6,753586}{0,4272} = 77,93402$$

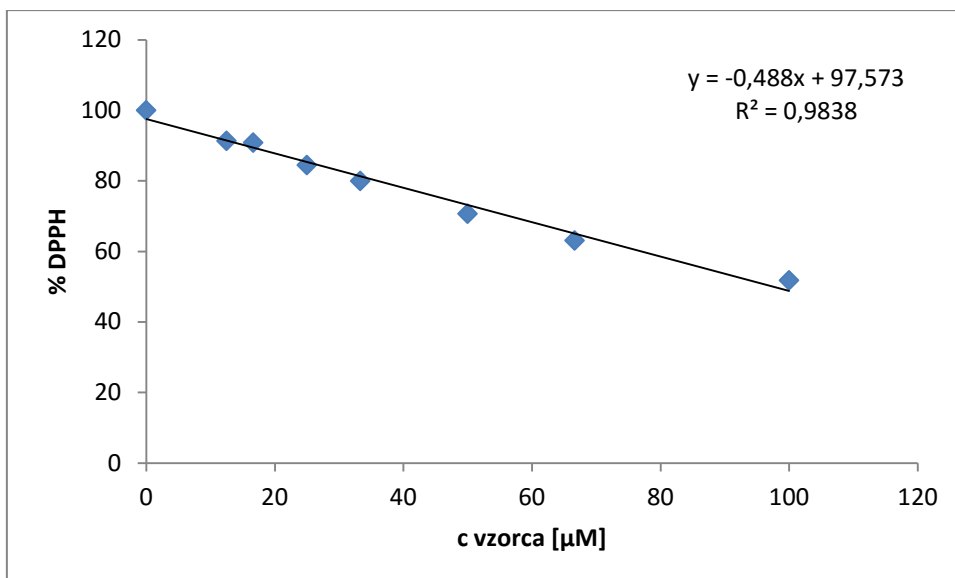
$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 93,74298 - 77,93402 = 15,80896$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 93,7 \pm 15,8 \mu M$ .

### **Spojina 5**

*Preglednica V: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 5*

| c spojine 5 [μM] | c DPPH [μM] | Absorbanca | % DPPH |
|------------------|-------------|------------|--------|
| 0                | 70          | 0,466      | 100    |
| 12,5             | 70          | 0,425667   | 91,3   |
| 16,65            | 70          | 0,423333   | 90,8   |
| 25               | 70          | 0,393667   | 84,5   |
| 33,3             | 70          | 0,372667   | 80,0   |
| 50               | 70          | 0,329333   | 70,7   |
| 66,65            | 70          | 0,294      | 63,1   |
| 100              | 70          | 0,241333   | 51,8   |



Slika 14: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 5

Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>:

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,488x + 97,573$

$$x = \frac{97,573 - 50}{0,488} = 97,48566 \mu M$$

$$STEYX = 2,223391$$

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{97,573 - 50 - 2,223391}{0,488} = 92,92953$$

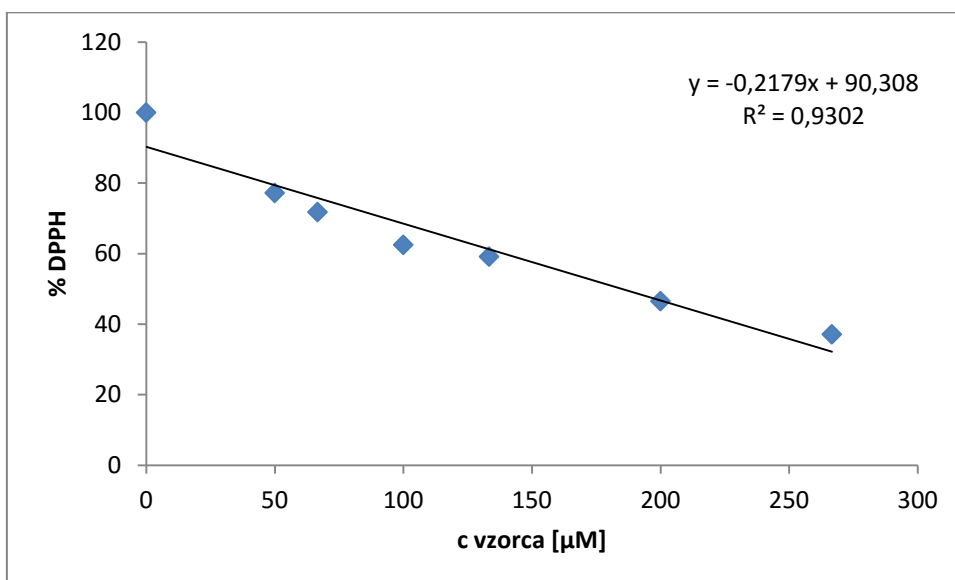
$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 97,48566 - 92,92953 = 4,556129$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 97,5 \pm 4,6 \mu M$ .

## Spojina 6

Preglednica VI: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 6

| c spojine <u>6</u> [ $\mu\text{M}$ ] | c DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|--------------------------------------|--------------------------|------------|--------|
| 0                                    | 70                       | 0,570333   | 100    |
| 50                                   | 70                       | 0,440333   | 77,2   |
| 66,65                                | 70                       | 0,409333   | 71,8   |
| 100                                  | 70                       | 0,356333   | 62,5   |
| 133,35                               | 70                       | 0,337333   | 59,1   |
| 200                                  | 70                       | 0,265333   | 46,5   |
| 266,65                               | 70                       | 0,211667   | 37,1   |



Slika 15: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 6

Izračun vrednosti  $\text{EC}_{50}$ :

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,2179x + 90,308$

$$x = \frac{90,308 - 50}{0,2179} = 184,9839 \mu\text{M}$$

STEYX = 5,999251

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC50 - SD = \frac{90,308 - 50 - 5,999251}{0,2179} = 157,4518$$

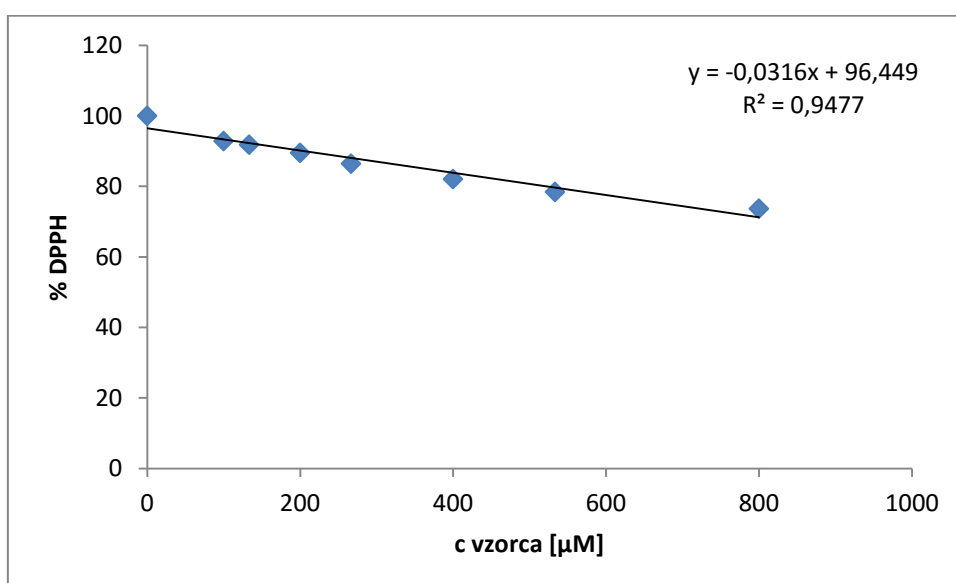
$$SD = EC50 - (EC50 - SD) = 184,9839 - 157,4518 = 27,53213$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 185,0 \pm 27,5 \mu\text{M}$ .

### **Spojina 7**

Preglednica VII: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za spojino 7

| c spojine <u>7</u> [ $\mu\text{M}$ ] | c DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|--------------------------------------|--------------------------|------------|--------|
| 0                                    | 70                       | 0,619333   | 100    |
| 100                                  | 70                       | 0,575      | 92,8   |
| 133,35                               | 70                       | 0,568667   | 91,8   |
| 200                                  | 70                       | 0,554333   | 89,5   |
| 266,65                               | 70                       | 0,535333   | 86,4   |
| 400                                  | 70                       | 0,508333   | 82,1   |
| 533,35                               | 70                       | 0,485667   | 78,4   |
| 800                                  | 70                       | 0,456333   | 73,7   |



Slika 16: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 7



Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>:

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,0316x + 96,449$

$$x = \frac{96,449 - 50}{0,0316} = 1469,905 \mu M$$

STEYX = 2,104848

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{96,449 - 50 - 2,104848}{0,0316} = 1403,296$$

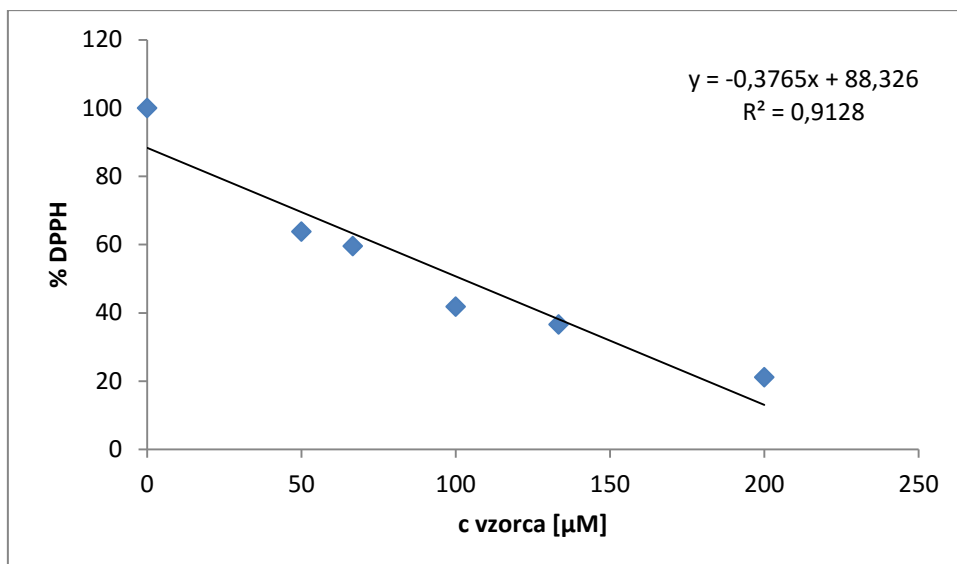
$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 1469,905 - 1403,296 = 66,60912$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 1469,9 \pm 66,6 \mu M$ .

### **Spojina 8**

*Preglednica VIII: Rezultati meritev absorbanca pri DPPH testu za spojino 8*

| c spojine 8 [ $\mu M$ ] | c DPPH [ $\mu M$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|-------------------------|--------------------|------------|--------|
| 0                       | 70                 | 0,511      | 100    |
| 50                      | 70                 | 0,326      | 63,8   |
| 66,65                   | 70                 | 0,304333   | 59,6   |
| 100                     | 70                 | 0,213667   | 41,8   |
| 133,35                  | 70                 | 0,187      | 36,6   |
| 200                     | 70                 | 0,108      | 21,1   |



Slika 17: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **8**

Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>:

Enačba umeritvene premice:  $y = -0,3765x + 88,326$

$$x = \frac{88,326 - 50}{0,3765} = 101,7955 \mu M$$

STEYX = 9,068656

Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{88,326 - 50 - 9,068656}{0,3765} = 77,70875$$

$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 101,7955 - 77,70875 = 24,08674$$

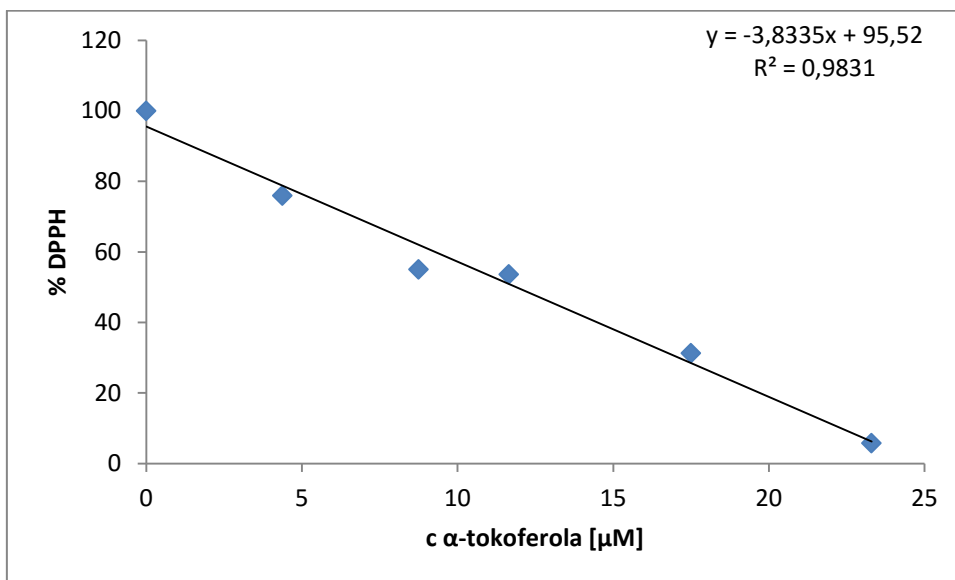
Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 101,8 \pm 24,1 \mu M$ .

### Standard $\alpha$ -tokoferol

Preglednica IX: Rezultati meritev absorbanca pri DPPH testu za  $\alpha$ -tokoferol

| c $\alpha$ -tokoferola [µM] | c DPPH [µM] | Absorbanca | % DPPH |
|-----------------------------|-------------|------------|--------|
| 0                           | 70          | 0,495333   | 100    |
| 4,375                       | 70          | 0,376333   | 76,0   |
| 8,75                        | 70          | 0,272667   | 55,0   |

|       |    |          |      |
|-------|----|----------|------|
| 11,65 | 70 | 0,265667 | 53,6 |
| 17,5  | 70 | 0,155    | 31,3 |
| 23,3  | 70 | 0,028667 | 5,8  |



Slika 18: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije za α-tokoferol

Izračun vrednosti  $EC_{50}$ :

Enačba umeritvene premice:  $y = -3,8335x + 95,52$

$$x = \frac{95,52 - 50}{3,8335} = 11,87427 \mu M$$

$$STEYX = 4,791028$$

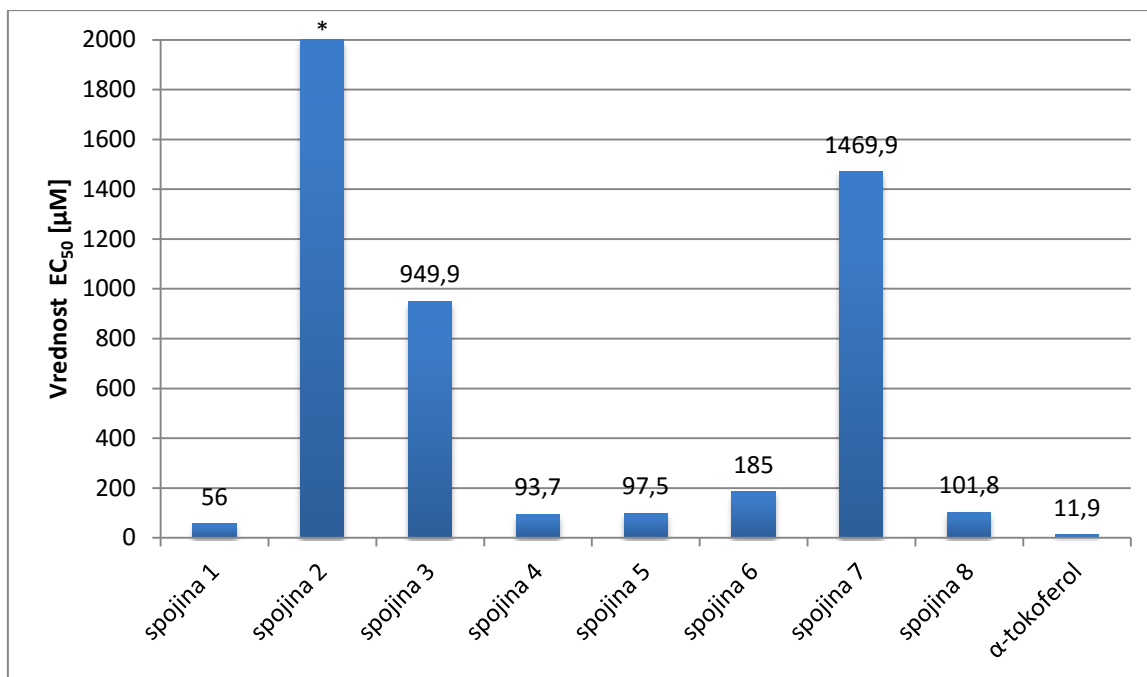
Standardni odklon (SD) na x-osi:

$$EC_{50} - SD = \frac{95,52 - 50 - 4,791028}{3,8335} = 10,62449$$

$$SD = EC_{50} - (EC_{50} - SD) = 11,87427 - 10,62449 = 1,249779$$

Rezultat:  $EC_{50} \pm SD = 11,9 \pm 1,2 \mu M$ .

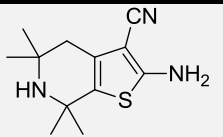
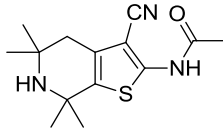
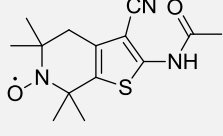
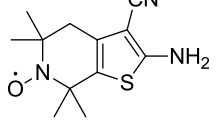
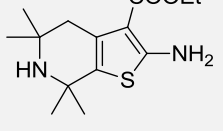
Iz enačb umeritvenih premic za posamezno spojino smo izračunali vrednosti  $EC_{50}$  skupaj s standardnim odklonom. Rezultati so prikazani v preglednici X in grafu na sliki 19.

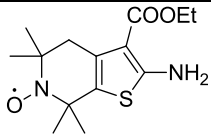
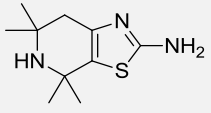
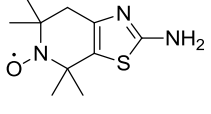
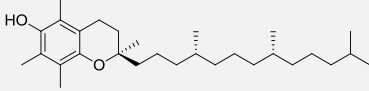


Slika 19: Prikaz vrednosti EC<sub>50</sub> za spojine 1 - 8 in α-tokoferol

\*Spojina 2 pri najvišji uporabljeni koncentraciji (800 µM) ne izkazuje antioksidativnega delovanja

Preglednica X: Izračunane vrednosti EC<sub>50</sub> s standardnim odklonom za posamezno spojino

| Spojina  | EC <sub>50</sub> ± SD [µM]  |
|----------|---|
| <u>1</u> |  56,0 ± 3,6    |
| <u>2</u> |  7062,0 ± 78,5 |
| <u>3</u> |  949,9 ± 55,9  |
| <u>4</u> |  93,7 ± 15,8   |
| <u>5</u> |  97,5 ± 4,6    |

|                                      |   |               |
|--------------------------------------|---|---------------|
| <u>6</u>                             |  | 185,0 ± 27,5  |
| <u>7</u>                             |  | 1469,9 ± 66,6 |
| <u>8</u>                             |  | 101,8 ± 24,1  |
| <b><math>\alpha</math>-tokoferol</b> |  | 11,9 ± 1,2    |

### 5.3 KOMENTAR REZULTATOV VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

Pripravljenim derivatom 2-aminotiofena (1, 2, 5, 7), nitroksidnim radikalom (3, 4, 6, 8) in standardu  $\alpha$ -tokoferolu smo pomerili antioksidativno kapaciteto z metodo redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (test DPPH), tako da smo vzorcem iz enačb regresijskih premic določili vrednosti učinkovitih koncentracij  $EC_{50}$ . Zanimalo nas je, ali bodo sintetizirane spojine učinkovale kot antioksidanti ter ali lahko iz strukture antioksidantov napovemo njihovo antioksidativno kapaciteto (odnos med strukturo in antioksidativnim delovanjem).

Standard za določanje učinkovitih koncentracij  $EC_{50}$  uporabljamo za zagotovitev ustreznosti izbrane metode. Pri testu DPPH se kot standarda pogosto uporabljata askorbinska kislina in  $\alpha$ -tokoferol, katerega smo uporabili tudi mi (18). Vrednost  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol je znašala  $11,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$ , kar kaže na to, da je zelo dober antioksidant. V literaturi se vrednosti  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol navadno gibljejo okoli  $20 \mu\text{M}$ , a so lahko tudi nižje in se med seboj dosti razlikujejo, zato lahko sklepamo, da naša vrednost ne odstopa bistveno (20).

Test DPPH se je izkazal za primerno metodo določanja antioksidativnega delovanja spojin, sam postopek pa je relativno hiter in enostaven. Med delom je kljub temu verjetno prišlo do nekaj eksperimentalnih napak, ki so posledica manjše natančnosti, na primer pri tehtanju spojin, rokovanju s pipeto (za nanašanje raztopin na mikrotitrsko ploščico bi bilo bolje uporabiti avtomatsko multikanalno pipeto)... Slučajne napake ovrednotimo tako, da

izvedemo testiranje v več ponovitvah in računamo odstopanja med meritvami, zaradi česar so rezultati vrednosti  $EC_{50}$  podani skupaj s standardnim odklonom.

Absorbance spojin smo najprej pomerili pri približno enakih koncentracijah vzorcev (od 200  $\mu\text{M}$  navzdol), saj smo glede na strukture pričakovali podobne rezultate. Pokazalo se je, da nekatere spojine pri takšnih koncentracijah ne izkazujejo antioksidativnih lastnosti, zato smo pri teh spojinah uporabili višje koncentracije (do 1,6 mM). Kot najboljši antioksidant se je izkazal standard,  $\alpha$ -tokoferol ( $EC_{50} = 11,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ), med pripravljenimi spojinami pa spojina **1** ( $EC_{50} = 56,0 \pm 3,6 \mu\text{M}$ ). Sledila je spojina **4** ( $EC_{50} = 93,7 \pm 15,8 \mu\text{M}$ ), ki je nitroksidni radikal, ki smo ga pripravili z oksidacijo spojine **1**. Kot dobri antioksidanti so se izkazale tudi spojine **5** ( $EC_{50} = 97,5 \pm 4,6 \mu\text{M}$ ), **6** ( $EC_{50} = 185,0 \pm 27,5 \mu\text{M}$ ) in **8** ( $EC_{50} = 101,8 \pm 24,1 \mu\text{M}$ ), medtem ko sta spojini **3** ( $EC_{50} = 949,9 \pm 55,9 \mu\text{M}$ ) in **7** ( $EC_{50} = 1469,9 \pm 66,6 \mu\text{M}$ ) imeli že dosti nižjo antioksidativno kapaciteto, spojina **2** pa ni izkazovala antioksidativnega delovanja pri najvišji uporabljeni koncentraciji. Spojine z visokimi učinkovitimi koncentracijami (**2** in **7**) so izkazovale dosti boljše antioksidativno delovanje po njihovi oksidaciji do stabilnih nitroksidov (spojini **3** in **8**), a pri ostalih spojinah (**4** in **6**) te povezave ni bilo. Poleg tega so se nekatere vrednosti  $EC_{50}$  kljub zelo podobni strukturi pripravljenih spojin zelo razlikovale med sabo (na primer spojini **1** in **2**). Zaradi vsega tega lahko sklepamo, da odnosa med antioksidativnim delovanjem in strukturo spojin v našem primeru ni mogoče napovedati.

## 6 SKLEP

Sekundarni amini so se v preteklih raziskavah izkazali kot dobri antioksidanti, saj delujejo kot donorji vodika. Zaradi možnosti sinteze produktov različnih oblik in širokega razpona molekulske mase so aktualni pri razvoju novih spojin z antioksidativnim delovanjem. Nitroksidni radikali pa so na področju antioksidantov zanimivi predvsem zaradi njihove superoksid dismutazne aktivnosti.

V diplomski nalogi smo z Gewaldovo reakcijo sintetizirali serijo derivatov 2-aminotiofena, te pa smo nato s pomočjo MCPBA oksidirali do stabilnih nitroksidnih radikalov. Izkoristek reakcije pri sintezi večine aminotiofenov je bil dober (nad 70 %), medtem ko so bili izkoristki ostalih reakcij nekoliko nižji, a še vedno zmerni izkoristki, ki so se gibali okoli 50 %. Pripravljene spojine smo identificirali z različnimi kromatografskimi in spektroskopskimi metodami, kot so NMR, IR spektroskopija, MS in EPR. Za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti sintetiziranih spojin smo uporabili test DPPH. Gre za metodo spremljanja redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila, kar lahko opazimo kot spremembo barve iz vijolične v svetlo rumeno. Rezultate smo podali kot vrednost  $EC_{50}$ , ter na podlagi le-teh ugotavljali učinkovitost spojin kot antioksidantov. Nižja, kot je vrednost  $EC_{50}$ , boljše je antioksidativno delovanje spojine.  $EC_{50}$  smo pomerili tudi standardu  $\alpha$ -tokoferolu, s čimer smo preverili ustreznost izbrane metode, ki se je izkazala za primerno. Ugotovili smo, da pet izmed osmih pripravljenih spojin izkazuje dobro antioksidativno delovanje. Kot najboljši antioksidant se je izkazala spojina **1**, po vrsti pa ji sledijo spojine **4**, **5**, **8** in **6**. Nekoliko manj učinkoviti sta spojini **3** in **7**, spojina **2** pa ne izkazuje antioksidativnega delovanja pri najvišji uporabljeni koncentraciji. Ugotovili smo tudi, da antioksidativne kapacitete ne moremo napovedati iz strukture spojin, da pa bi trditev popolnoma potrdili, bi potrebovali večjo serijo analogov.

Ustreznost rezultatov bi lahko preverili še z uporabo drugih metod za ugotavljanje antioksidativnega delovanja, s tem pa bi tudi izboljšali celotno študijo. Sicer pa sintetizirani 2-aminotiofeni in nitroksidni radikali, ki izkazujejo antioksidativno delovanje, predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje načrtovanje novih potencialnih antioksidantov.

## 7 LITERATURA

1. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393-406.
2. Yoshikawa T, Naito Y: What is Oxidative Stress. *Journal of the Japan Medical Association* 2002; 45: 271-276.
3. Poljsak B, Šuput D, Milisav I: Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 1-11.
4. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. *Farm Vestn* 2015; 66: 127-132.
5. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4: 118-126.
6. Pečar S: Radikali v našem okolju. *Kemija v šoli* 2006; 18 (2): 26-30.
7. Turrens J F: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2003; 552 (2): 335-344.
8. Lushcak V I: Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biologica Interactions* 2014; 224: 164-175.
9. Martinez M C, Andriantsitohaina R: Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2008; 11 (3): 669-702.
10. Dhawan V: Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. *Studies on Respiratory Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*; 27-47.
11. Van der Vliet A, Eiserich J P, Halliwell B, Cross C E: Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite. *J Biol Chem* 1997; 272 (12): 7617-7625.
12. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, 2015; 138-177.
13. 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.
14. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N: Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research* 2013; 7 (9): 828-835.



15. [http://www.happi.com/issues/2013-12/view\\_features/the-role-of-antioxidants-in-dermatological-cosmetic-formulas](http://www.happi.com/issues/2013-12/view_features/the-role-of-antioxidants-in-dermatological-cosmetic-formulas), dostopano: julij 2016.
16. Noori S: An Overview of Oxidative Stress and Antioxidants Defensive System. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 2012; 1 (8): 1-9.
17. Carocho M, Ferreira I: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 51: 15-25.
18. Kedare S B, Singh R P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48: 412-422.
19. Chen Z, Bertin R, Frolidi G: EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem* 2013; 138: 414-420
20. 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.
21. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology* 1997; 30 (6): 609-615.
22. Olugbami J O, Gbadegesin M A, Odunola O A: In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*. *Pharmacognosy Res* 2015; 7: 49-56
23. <http://adhesives.specialchem.com/selection-guide/antioxidants-for-adhesives/primary-antioxidants#amines>, dostopano: julij 2016.
24. Puterová Z, Krutošíková A, Végh D: Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. *ARKIVOC Online Journal of Organic Chemistry* 2010; 10: 209-246.
25. Puterová Z, Krutošíková A, Végh D: Applications substituted 2-aminothiophenes in drug design. *Nova Biotechnologia* 2009; 9: 167-173.
26. Sensfuss U, Habicher W D: 2-Aminothiophenes from Triacetoneamine: A Convenient Way to Novel Sterically Hindered Piperidine Derivatives. *Heteroatom Chem* 1998; 9 (6): 529-535.
27. Soule B P, Hyodo F, Matsumoto K, Simone N L, Cook J A, Krishna M C, Mitchell J B: The Chemistry and Biology of Nitroxide Compounds. *Free Radic Biol Med* 2007; 42 (11): 1632-1650.

28. Tabaczar S, Talar M, Gwoździński K: Nitroxides as antioxidants - possibilities of their application in chemoprevention and radioprotection. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; 65: 46-54.
29. Nicolas J, Guillaneuf Y: Living Radical Polymerization: Nitroxide-Mediated Polymerization. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* 2015; 1133-1148.
30. Hahn S M, Krishna M, Samuni A, DeGraff W, Cuscela D O, Johnstone P, Mitchell J B: Potential Use of Nitroxides in Radiation Oncology. *Cancer Res* 1994; 54: 2006-2010.
31. Barnes D M, Haight A, Hameury T, McLaughlin M, Mei J, Tedrow J, Toma J: New conditions for the synthesis of thiophenes via the Knoevenagel/Gewald Reaction sequence. Application to the synthesis of multitargeted kinase inhibitor. *Tetrahedron* 2006; 62: 11311-11319.
32. [http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Organic\\_Chemistry/Anhydrides/Reactivity\\_of\\_Anhydrides/Acid\\_Anhydrides\\_React\\_with\\_Amines\\_to\\_Form\\_Amides](http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Organic_Chemistry/Anhydrides/Reactivity_of_Anhydrides/Acid_Anhydrides_React_with_Amines_to_Form_Amides), dostopano: julij 2016.
33. [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva\\_FK/2010/Vaje\\_ppt/04-vaja\\_Paracetamol.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Vaje_ppt/04-vaja_Paracetamol.pdf), dostopano: julij 2016.
34. Shi H C, Li Y: Formation of nitroxide radicals from secondary amines and peracids: peroxy radical oxidation pathway derived from electron spin resonance detection and density functional theory calculation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 2007; 271: 32-41.