

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA ŠKULJ

**SINTEZA IN VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE
IZBRANIH KINAZOLINONOV**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE CAPACITY
OF SELECTED QUINAZOLINONES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za Farmacevtsko kemijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za vso strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Posebno se zahvaljujem svoji družini in fantu za podporo na svoji študijski poti, da ste verjeli vame in mi stali ob strani. Hvala!

IZJAVA

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

Zala Škulj

Ljubljana, 2018

Predsednik komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Članica komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1 Reaktivne zvrsti	1
1.1.2 Nastanek reaktivnih zvrsti	2
1.1.2 Tipi radikalskih reakcij	3
1.1.3 Posledice oksidativnega stresa	4
1.1.4 Pozitivni učinki reaktivnih zvrsti	7
1.1.5 Določevanje oksidativnega stresa	7
1.2 ANTIOKSIDANTI	8
1.2.1 (Poli)fenoli	9
1.2.2 Kinazolini in kinazolinoni	10
1.3 METODE ZA VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI	12
1.3.1 DPPH test	14
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 TOPILA IN REAGENTI	17
3.1.1 Topila in reagenti za sintezo 2-kinazolinonov	17
3.1.2 Topila in reagenti za DPPH test	17
3.2 SPOJINE	18
3.3 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA	19
3.4 ANALIZNE METODE IN PROGRAMSKA OPREMA	20
3.4.1 Poimenovanje in risanje spojin	20
3.4.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)	20
3.4.3 Določevanje tališč	20
3.4.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)	20
3.4.5 Infrardeča spektroskopija (IR)	21
3.4.6 Masna spektrometrija (MS)	21

3.4.7	DPPH test	21
4.	EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1	SPLOŠNI POSTOPEK ZA SINTEZO 2-KINAZOLINONOV	22
4.2	VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE.....	27
4.2.1	Priprava vzorcev	27
4.2.2	Priprava DPPH	27
4.2.3	DPPH test	28
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
5.1	KOMENTAR SINTEZE 2-KINAZOLINONOV	30
5.2	REZULTATI DPPH TESTA.....	31
5.3	KOMENTAR REZULTATOV DPPH TESTA.....	45
6.	SKLEP.....	51
7.	LITERATURA.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema katalitičnega odstranjevanja superoksidnega radikala (15).....	8
Slika 2: Struktura kinazolina (20).....	10
Slika 3: Struktura 4-kinazolinona (19)	11
Slika 4: 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) molekula (prirejeno po (25)).....	15
Slika 5: Reakcija DPPH z antioksidantom (H-A)	15
Slika 6: Reakcijska shema sinteze 2-kinazolinonov.....	16
Slika 7: Reakcijska shema sinteze spojine 1	22
Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 2	23
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 3	24
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 4	25
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 5	26
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 6	26
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 7	27
Slika 14: Primer nanašanja razredčin vzorcev in DDPH na mikrotitrsko ploščico.....	29
Slika 15: Sinteza 2-kinazolinonov (prirejeno po (21))	30
Slika 16: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 1 po 60 minutah.....	32
Slika 17: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 2 po 60 minutah.....	33
Slika 18: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 3 po 60 minutah.....	34
Slika 19: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 4 po 60 minutah.....	35
Slika 20: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 8 po 60 minutah.....	36
Slika 21: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 9 po 60 minutah.....	37
Slika 22: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 10 po 60 minutah.....	38
Slika 23: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 11 po 60 minutah.....	39
Slika 24: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 12 po 60 minutah.....	40
Slika 25: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 13 po 60 minutah.....	42
Slika 26: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 14 po 60 minutah.....	43
Slika 27: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije α -tokoferola po 60 minutah	44
Slika 28: Prikaz vrednosti EC ₅₀ za testirane spojine po 60 minutah	45
Slika 29: Prikaz redukcije dveh molekul DPPH s spojino 3	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razdelitev kisikovih reaktivnih zvrsti (ROS) (2).....	2
Preglednica II: Kinazolini in kinazolinoni kot zdravilne učinkovine ter njihovo delovanje (18)	11
Preglednica III: Spektrofotometrične metode za določevanje antioksidativnih lastnosti ter principi delovanja (11, 23).....	13
Preglednica IV: Elektrokemične metode za določevanje antioksidativnih lastnosti ter principi delovanja (11, 23).....	13
Preglednica V: Kromatografske metode za določevanje antioksidativnih lastnosti ter principi delovanja (11, 23).....	14
Preglednica VI: Topila in reagenti za sintezo.....	17
Preglednica VII: Topila in reagenti za DPPH test.....	17
Preglednica VIII: Prikaz analiziranih spojin	18
Preglednica IX: Prikaz reakcijskih zmesi za določevanje EC ₂₀	28
Preglednica X: Rezultati meritev absorbanc spojine 1	32
Preglednica XI: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 1	32
Preglednica XII: Rezultati meritev absorbanc spojine 2	33
Preglednica XIII: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 2	34
Preglednica XIV: Rezultati meritev absorbanc spojine 3.....	34
Preglednica XV: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 3	35
Preglednica XVI: Rezultati meritev absorbanc spojine 4.....	35
Preglednica XVII: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 4	36
Preglednica XVIII: Rezultati meritev absorbanc spojine 8	36
Preglednica XIX: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 8	37
Preglednica XX: Rezultati meritev absorbanc spojine 9	37
Preglednica XXI: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 9	38
Preglednica XXII: Rezultati meritev absorbanc spojine 10	38

Preglednica XXIII: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 10	39
Preglednica XXIV: Rezultati meritev absorbanc spojine 11	39
Preglednica XXV: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 11	40
Preglednica XXVI: Rezultati meritev absorbanc spojine 12.....	40
Preglednica XXVII: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 12	41
Preglednica XXVIII: Rezultati meritev absorbanc spojine 13	41
Preglednica XXIX: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 13	42
Preglednica XXX: Rezultati meritev absorbanc spojine 14	42
Preglednica XXXI: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za spojino 14	43
Preglednica XXXII: Rezultati meritev absorbanc α -tokoferola	43
Preglednica XXXIII: Prikaz regresijskih premic in EC ₅₀ v določeni časovni točki za α -tokoferol	44

POVZETEK

Antioksidanti so katere koli snovi, ki upočasnijo, odstranijo ali preprečijo nastanek reaktivnih zvrsti in oksidativnih poškodb molekul. Reaktivne zvrsti, ki nastajajo tako endogeno kot eksogeno, so vpletene v nastanek številnih bolezni, zato so raziskave za učinkovitejše in varnejše antioksidante izrednega pomena.

Namen magistrske naloge je sinteza različnih analogov kinazolinonov, ki jih bomo ovrednotili z DPPH testom. Ugotavljali bomo, kako število in prisotnost različnih skupin vplivata na antioksidativno kapaciteto spojin.

S postopkom aerobne oksidativne ciklizacije v DMSO, ki je izredno uporaben postopek, saj ni potrebe po uporabi dodatnih reagentov, smo pripravili različne kinazolinone, ki so na mestu 2 substituirani s polifenoli. Nato smo z DPPH testom, ki temelji na uporabi stabilnega radikala 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila (DPPH), ovrednotili antioksidativno kapaciteto spojin. DPPH sprejme vodikov atom iz antioksidanta, kar privede do redukcije 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila v 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin (DPPH-H). Pri redukciji se vijolična barva DPPH molekule spremeni v rumeno, kar se spektrofotometrično odraža s padcem absorbance pri 517 nm. Rezultate se najpogosteje izrazi kot koncentracijo antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50% začetne koncentracije DPPH (EC_{50}).

Ugotovili smo, da na antioksidativno kapaciteto vpliva tako število kot tudi položaj hidroksilnih skupin. Največjo antioksidativno kapaciteto izkazujeta derivata z dvema prostima hidroksilnima skupinama, saj lahko donirata 2 vodikova atoma in s tem nevtralizirata 2 molekuli DPPH. Derivata z eno hidroksilno skupino ne delujeta kot antioksidanta. Ugotovili smo, da prisotnost ene metoksi skupine zveča antioksidativno kapaciteto, prisotnost dveh metoksi skupin pa nekoliko zmanjša antioksidativno kapaciteto. Prav tako smo ugotovili, da zamenjava fenilnega obroča s stirilom zveča antioksidativno kapaciteto, zamenjava metoksi skupine z etoksi skupino pa antioksidativno kapaciteto le malenkost zveča.

Derivata z dvema hidroksilnima skupinama, ki imata veliko antioksidativno kapaciteto, sta potencialno zanimiva za rabo v medicini in farmaciji, vendar pa bi bilo treba opraviti še dodatne *in vitro* ali tudi *in vivo* teste za nadaljnje ugotavljanje antioksidativnih lastnosti.

Ključne besede: antioksidanti, radikali, DPPH, kinazolinoni

ABSTRACT

Antioxidants are all compounds that decelerate, remove or prevent emergence of reactive species and oxidation injuries of molecules. The reactive species that are created in an endogenous or exogenous way are involved in the emergence of many diseases. This is why the researches for more effective and safe antioxidants are of great importance.

The purpose of this thesis is the synthesis of different quinazolinones, which will be evaluated with DPPH test. We will evaluate how the antioxidative capacity of the tested compounds is effected by the number and presence of different groups.

With aerobic oxidative cyclization in DMSO we prepared different quinazolinones which are substituted with polyphenols on the position 2. Since the protocol does not use any other additives and generates only water as a by-product, the aerobic oxidative cyclization is a very useful method. With DPPH test, which is based on the use of stable radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), we evaluated the antioxidative capacity. DPPH molecule removes hydrogen atom from the potential antioxidant which leads to reduction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl into 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH-H). Reduction causes colour alternation from violet to yellow and the fall of absorption at 517 nm which can be detected with spectrophotometry. The results are usually represented as concentration of antioxidant necessary for reduction of initial DPPH concentration by 50% (EC₅₀ value).

We discovered that the number and the position of hydroxide groups affect the antioxidative capacity. Derivatives with two hydroxide groups have the greatest antioxidant capacity as they donate two hydrogen atoms and can therefore neutralise two molecules of DPPH. Derivatives with one hydroxide group show no antioxidative activities. We discovered that the presence of one methoxy group increases the antioxidative capacity, while presence of two methoxy groups somewhat decreases it. We also discovered that the replacement of phenyl with styryl increases the antioxidative capacity and the replacement of methoxy group with ethoxy group increases antioxidative capacity a little bit.

Derivatives with two hydroxide groups that have the greatest antioxidant capacity are interesting for the use in medicine and pharmacy; however more *in vitro* and *in vivo* tests must be done for further evaluation of antioxidative properties.

Key words: antioxidants, radicals, DPPH, quinazolinones

SEZNAM OKRAJŠAV

8-OHdG	8-okso-gvanozin
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
ATP	adenozin trifosfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
DPPH-H	1,1-difenil-2-pikril-hidrazin
EC ₅₀	efektivna koncentracija
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
GSH	glutation
IR	infrardeča spektroskopija
LDL	lipoproteini z nizko gostoto
MMP	matriks metaloproteinaze
MS	masna spektrometrija
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NMR	jedrska magnetna resonanca
NOS	NO sintaza
TLC	tankoplastna kromatografija

UVOD

1.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je stanje, o katerem govorimo, ko je porušeno ravnovesje med nastankom in med odstranjevanjem reaktivnih zvrsti in poškodb, ki jih le-te povzročajo (1). Nastane lahko zaradi zmanjšanih količin razpoložljivega nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NAD(P)H) in zmanjšanega obnavljanja mreže antioksidantov, zaradi povečanega nastanka reaktivnih zvrsti ali zaradi pomanjkanja posameznih predstavnikov antioksidantov (2).

1.1.1 Reaktivne zvrsti

Radikal je lahko vsaka snov, ki ima v svoji strukturi vsaj en nesparjen valenčni elektron, vendar pa med reaktivne zvrsti spadajo tako radikali kot tudi ostale spojine, kot sta npr. vodikov peroksid in ozon (3). Radikalom je skupno, da so visoko reaktivni, zato je njihova življenjska doba kratka (nekaj milisekund do nekaj sekund) in lahko oksidirajo katero koli molekulo v telesu (4, 5). Visoka reaktivnost izhaja iz težnje elektrona po nastanku elektronskega para. Možnost delokalizacije nesparjenega elektrona poveča stabilnost radikala, stabilnost pa se lahko poveča tudi v primeru, če je nesparjeni elektron sterično oviran. Tipična lastnost radikalov je njihova obarvanost, saj v vidnem delu spektra absorbirajo svetlobo (4).

Radikali so paramagnetne snovi. Elektron je osnovni delec z nabojem in s spinom, kroženje naboja pa ustvarja magnetno polje. Tako ima zaradi spina vsak elektron magnetni moment. Efektivni magnetni moment elektronskega para z nasprotnima spinoma v isti orbitali je enak nič, zato tako snov imenujemo diamagnetna snov. Ker imajo radikali vsaj en nesparjen elektron, imajo zato efektivni magnetni moment. Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) izkorišča to lastnost radikalov za identifikacijo in kvantifikacijo radikalov (4).

Reaktivne zvrsti lahko razdelimo na različne načine. Glede na atom, kjer je nesparjen elektron, poznamo kisikove, dušikove, žveplove, ogljikove in klorove reaktivne zvrsti. Kisikove reaktivne zvrsti so prikazane v preglednici I. Glede na stabilnost lahko reaktivne zvrsti razdelimo na nestabilne, katerih življenjska doba je nekaj mikrosekund do ene

sekunde, na metastabilne, katerih življenja doba je do nekaj ur ter na stabilne reaktivne zvrsti, ki so stabilne daljši čas. Glede na vrsto redoks reakcij poznamo reduktivne in oksidativne reaktivne zvrsti, glede na število nesparjenih elektronov pa monoradikalne, biradikalne in poliradikale (2).

Preglednica I: Razdelitev kisikovih reaktivnih zvrsti (ROS) (2)

RADIKALSKA VRSTA			
superoksidni anion	$O_2^{\bullet-}$	aroksilni radikal	ArO^{\bullet}
hidroksilni radikal	OH^{\bullet}	semikinonski radikal	UQ^{\bullet}
hidroperoksilni radikal	O_2H^{\bullet}	tripletni kisik	3O_2
alkoksilni radikal	RO^{\bullet}	ozon	O_3
peroksilni radikal	ROO^{\bullet}		
NERADIKALSKA VRSTA			
singletni kisik	1O_2	peroksid	$ROOR'$
vodikov peroksid	H_2O_2	hipoklorna kislina	$HOCl$
hidroperoksid	$ROOH$		

1.1.2. Nastanek reaktivnih zvrsti

Reaktivne zvrsti nastajajo endogeno in eksogeno. Endogeno v telesu nastajajo že med normalnimi fiziološkimi procesi (2). Mitohondrij je glavni celični organel, ki je odgovoren za njihov nastanek (6). Na notranji membrani mitohondrija poteka sinteza adenozin trifosfata (ATP), pri čemer nastajata CO_2 in voda. Nastanek ATP molekule omogočajo 4 kompleksi, preko katerih se prenašajo elektroni, vendar pa se na kompleksu I in III elektroni lahko prenesejo tudi na kisik, pri čemer nastane superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$). Iz superoksidnega radikala lahko nadalje nastaneta vodikov peroksid in hidroksilni radikal (OH^{\bullet}). Superoksidni radikal pa lahko reagira z dušikovim oksidom do peroksinitrita ($ONOO^-$), ki je močan oksidant (2). Peroksinitrit se protonira do peroksiduškove kisline ($ONOOH$), ki izomerizira v dušikovo(V) kislino ali pa se homolitsko razcepi na hidroksilni radikal in dušikov dioksid (NO_2^{\bullet}), ki lahko sprožita lipidno peroksidacijo, nitrirata in oksidirata proteine ter aktivirata matriks metaloproteinaze (MMP) (7).

Hidroksilni radikal je najbolj reaktivni kisikov radikal, ki reagira izjemno hitro in nastane v številnih reakcijah med drugimi tudi preko Fentonove ter Haber-Weissove reakcije v prisotnosti železovih ali bakrovih ionov (8).

- Fentonova reakcija: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{HO}^-$
- Haber-Weissova reakcija: $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{O}_2 + \text{HO}^-$ (8)

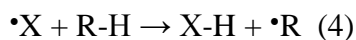
Pri počivanju in kontrakciji skeletnih mišic nastajajo reaktivne zvrsti v nizkih koncentracijah, saj se na ta način ohranjata normalen ton in krčenje mišic (2, 6). Vendar pa pri prekomerni in dolgotrajni fizični obremenitvi nastajajo reaktivne zvrsti v višjih koncentracijah, saj se z večjo porabo kisika, večja tudi količina superoksida, kar lahko povzroči slabljenje in izčrpanost mišic (9). Reaktivne zvrsti lahko endogeno nastajajo tudi zaradi metabolizma ksenobiotikov (ciklosporin, gentamicin, bleomicin itd.) in hrane, pesticidov, težkih kovin (Fe, Cd, Hg, As, Pb), stresa, alkohola, lokalne ishemije ter kroničnega vnetja (6, 10).

Reaktivne zvrsti lahko nastanejo s homolitsko ali heterolitsko cepitvijo kovalentne vezi v molekuli, za kar je potrebna energija, kot na primer sončna svetloba in ionizirajoče sevanje (4). Reaktivne zvrsti pa lahko nastajajo tudi zaradi ostalih dejavnikov, kot so patogeni in kajenje ter zaradi različnih okoljskih vplivov, kot so vročina, mraz, onesnaženost zraka ter vdihovanje ozona (6, 10).

1.1.2 Tipi radikalskih reakcij

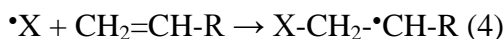
Radikali lahko reagirajo s katerokoli spojino, ki jo srečajo. Reakcije so običajno izredno hitre, isti radikal pa lahko reagira z različnimi spojinami, zato nastanejo različni produkti (2). Poznamo 5 tipov radikalskih reakcij:

1. Pritegnitev vodikovega atoma:



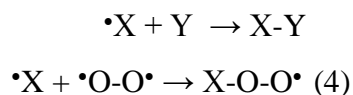
R-H je lahko deoksiribonukleinska kislina (DNA), protein, lipid itd. Nastane nov radikal, ki na isti način reagira naprej. Ta tip reakcije je značilen za reaktivne radikale, manj reaktivni radikali, kot je na primer superoksid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), pa tega ne zmorejo (2).

2. Adicija radikala na dvojno vez:



V celici so temu tipu radikalskih reakcij izpostavljene predvsem nenasičene maščobne kisline v membrani. Nastane nov radikal, ki lahko ponovno reagira dalje (2).

3. Reakcija dveh radikalov:



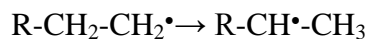
Iz dveh različnih ali dveh enakih radikalov nastane kovalentna vez v novi neradikalski spojini. Samo v primeru reakcije monoradikala z biradikalom nastane nov radikal (2).

4. Reakcija dismutacije (disproporcionacija):



Pri tem tipu radikalne reakcije iz dveh istih radikalov nastaneta dve neradikalski spojini (2).

5. Reakcija izomerizacije:



Za to reakcijo je značilen premik nesparjenega elektrona znotraj molekule, saj je nov radikal glede na prvotnega stabilnejši (2).

1.1.3 Posledice oksidativnega stresa

Reaktivne zvrsti reagirajo hitro in s katerokoli spojino. Največje posledice oksidativnega stresa so poškodbe DNA, lipidov in proteinov, saj tovrstne poškodbe vodijo v okrnjeno celično delovanje in preživetje celice, ali pa sprožijo celični odziv preko generiranja sekundarnih reaktivnih zvrsti, kar vodi v nekrozo ali apoptozo celice (8). Tako so z oksidativnim stresom povezane številne bolezni, kot so diabetes, avtoimunske in neurodegenerativne bolezni, astma, melanom, ateroskleroza itd. Oksidativni stres vpliva tudi na nastanek kroničnega vnetja (6).

Ko reaktivne zvrsti poškodujejo proteine, nastanejo proteini s spremenjeno strukturo in funkcijo, kar spodbudi imunski odgovor, ki lahko vodi v nastanek protiteles in avtoimunske bolezni. Prav tako reaktivne zvrsti povzročajo staranje, saj se z leti večja oksidativni stres, zaradi povečanih količin radikalov in/ali zmanjšane antioksidativne zaščite (6).

Reaktivne zvrsti lahko poškodujejo DNA, kar lahko vodi v nastanek raka. Povzročijo različne strukturne spremembe DNA, kot so izguba sladkorja in baz, križno premreženje, strganje vezi itd. Hidrolizirane DNA baze so najpogostejši produkti DNA oksidacije, ena

najbolj pogostih poškodb DNA, ki lahko vodi v mutacijo, je oksidacija gvanozina do 8-okso-gvanozina (8-OHdG), ki je marker za oksidativni stres v tkivih (10).

Centralni živčni sistem je izjemno občutljiv na poškodbe, ki jih povzročajo reaktivne zvrsti. Vzrokov za nastanek nevrodegenerativnih bolezni v povezavi z reaktivnimi zvrstmi je več. V možganih zaradi večje porabe kisika v mitohondrijih nastane več reaktivnih zvrsti. Pri pacientih s Parkinsonovo boleznijo so med drugim ugotovili tudi zvišane vrednosti prooksidativnega železa, preko katerega nastaja hidroksilni radikal. Nadalje so raziskovalci odkrili, da pri metabolizmu dopamina, monoamin oksidaza B povzroči nastanek visokih koncentracij H_2O_2 , superoksidnega in hidroksilnega radikala. Tako so možgani nenehno izpostavljeni visokim koncentracijam reaktivnih zvrsti, ki povzročijo odmiranje nevronov, zmanjša se masa možganov, ekstracelularno se akumulirajo fibrile, možgani pa so zaradi visoke vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin tudi v veliki meri izpostavljeni lipidni peroksidaciji. Tovrstni dogodki pogosto privedejo do nastanka nevrodegenerativnih bolezni (3).

V zadnjih letih raziskovalci oksidativni stres povezujejo z nastankom številnih kardiovaskularnih bolezni. Reaktivne zvrsti, ki jih generirajo makrofagi, oksidirajo cirkulirajoče lipoproteine z nizko gostoto (LDL), kar vodi v nastanek penastih celic in akumulacije lipidov. Posledica tega procesa je aterosklerotični plak, nepravilno delovanje endotelija in vazokonstrikcija žile (3, 10).

Oksidativni stres je vpleten še v številne druge bolezni, med drugimi tudi ledvične bolezni (glomerulonefritis, uremija, proteinurija itd.). Nastanek reaktivnih zvrsti namreč zveča rekrutiranje vnetnih celic in provnetnih citokinov, ki povzročijo vnetje. Nekatera zdravila, kot so gentamicin, bleomicin, takrolimus itd., delujejo kot nefrotoksini, saj zvišajo reaktivne zvrsti preko lipidne peroksidacije. Težke (Cd, Hg, Pb in As) in prehodne kovine (Fe, Cu, Co in Cr) prav tako delujejo kot povzročitelji oksidativnega stresa in so odgovorne za številne oblike nefropatij in tudi za nekatere vrste raka (10).

Pri proučevanju staranja so nastale številne teorije, med drugimi tudi mitohondrijska teorija. Le-ta temelji na tem, da je mitohondrij kot glavni vir radikalov povzročitelj staranja. Obstaja namreč korelacija med kronološkim staranjem in med količino reaktivnih zvrsti in oksidativnim stresom. Poleg tega delovanje mitohondrija z leti usiha, z oksidativnim stresom pa so povezane tudi številne starostno pogojene bolezni. Vendar pa

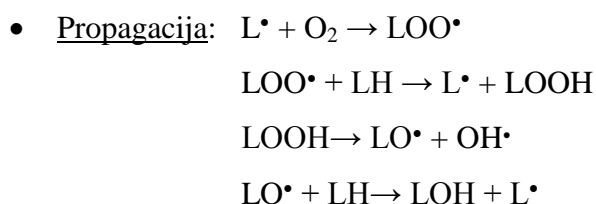
so pri tej teoriji mnenja deljena, saj obstajajo tudi številni dokazi, ki teoriji nasprotujejo (1).

Membrane celic in celičnih organelov vsebujejo lipide, med drugimi tudi polinenasičene maščobne kisline, ki so zaradi prisotnosti dveh ali več dvojnih vezi izjemno občutljive na prisotnost reaktivnih zvrsti. Potreben je namreč le en radikal, ki sproži verižno radikalsko reakcijo, v kateri lahko nastane nešteto radikalskih in neradikalskih produktov (8).

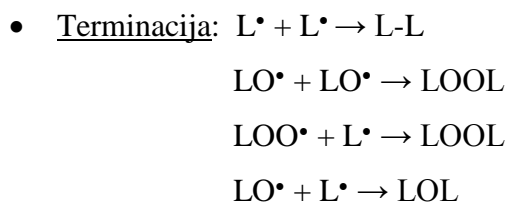
Verižna radikalska reakcija, ki jo povzročijo reaktivne zvrsti, poteka v treh stopnjah:



Za stopnjo iniciacije je značilna sprožitev nastanka radikalov. To stopnjo lahko sproži katera koli reaktivna zvrst, ki ima sposobnost odvzema vodikovega atoma. LH je lahko katera koli molekula, v primeru lipidne peroksidacije je to lipid. Nastane nov lipidni radikal (L^{\bullet}), ki hitro reagira dalje (11).



V tej stopnji radikal reagira s kisikom, nastane peroksilni radikal (LOO^{\bullet}). Le-ta dalje reagira z novim lipidom, nastane lipidni hidroperoksid ($LOOH$), ki lahko razpade na številne komponente, kot so alkoholi, aldehidi, ketoni in radikali (8, 11). V primeru lipidne peroksidacije lahko en radikal, ki sproži iniciacijo, v stopnji propagacije povzroči oksidacijo do 400 lipidnih molekul, preden nastopi stopnja terminacije (12).



Za terminacijo je značilen nastanek neradikalskih produktov, ko se koncentracija radikalov zviša do te mere, da radikali reagirajo med seboj. Do terminacije lahko pride tudi, ko radikali reagirajo z antioksidanti v številne neradikalne produkte (8, 11).

1.1.4 Pozitivni učinki reaktivnih zvrsti

Reaktivne zvrsti pa nimajo samo negativnih lastnosti. Pomembne so pri številnih fizioloških procesih, kot so fosforilacija proteinov, pri imunskem sistemu, aktivaciji transkripcijskih faktorjev itd. (10).

Imunski sistem je odvisen od zadostne količine reaktivnih zvrsti in njihove prisotnosti v celicah (10). Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza v fagocitih, predvsem nevtrofilcih, makrofagih in monocitih proizvaja reaktivne zvrsti, ki v telesu služijo kot obramba proti tujkom (6). Ljudje z granulomatozno boleznijo ne morejo proizvajati superoksidnega radikala zaradi motenj v NADPH oksidaznem sistemu, zato so nagnjeni k številnim ponavljajočim se okužbam. Reaktivne zvrsti pa nastajajo tudi v ostalih celicah, ki niso granulociti, kot so fibroblasti, endotelijske celice, gladke mišične celice, miociti in ščitnično tkivo (10). Reaktivne zvrsti sodelujejo tudi pri celičnem signaliziranju. Tako je na primer vodikov peroksid udeležen pri signaliziranju citokinov, aktivatorja proteina-1, inzulina ter ravnega faktorja (6). Dušikov oksid, ki nastaja iz arginina s pomočjo encima NO sintaz (NOS), je pomemben pri uravnavanju krvnega tlaka, redoks signaliziranju, vnetju in pri imunski obrambi (2, 6).

1.1.5 Določevanje oksidativnega stresa

Za določanje oksidativnega stresa uporabljajo različne metode, s katerimi analizirajo posamezne reaktivne zvrsti, ali merijo različne produkte oksidacije. Najpogostejše metode, ki se uporabljajo za ugotavljanje oksidativnega stresa, so elektronska paramagnetna resonanca (EPR), določanje malondialdehida in ostalih reaktivnih elektrofilov kot sekundarnih produktov lipidne peroksidacije, določanje hidroperoksidov s Fentonovo reakcijo in kromogenom, določanje vsebnosti lipidnih peroksidov in izoprostanov, kemiluminiscenca za spremljanje sproščanja radikalov iz celic itd. (13).

1.2 ANTIOKSIDANTI

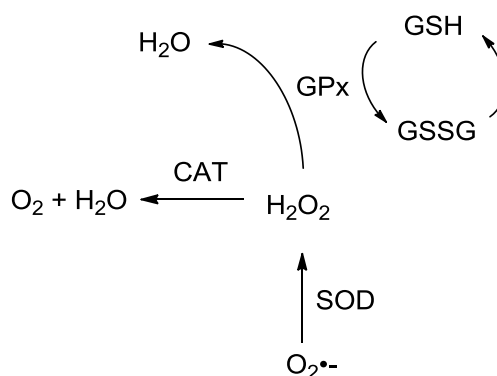
Zaradi že omenjenih škodljivih učinkov reaktivnih zvrsti je skozi evolucijo telo razvilo obrambni sistem, mrežo antioksidanov, ki vključuje tako encimske kot neencimske antioksidante, ki delujejo sinergistično (3). Antioksidanti so snovi, ki upočasnijo, odstranijo ali preprečijo nastanek oksidativnih poškodb molekul (2). Ker antioksidanti igrajo pomembno vlogo v zaščitnem mehanizmu proti reaktivnim zvrstem in so učinkoviti v preprečevanju in zdravljenju različnih bolezni, so raziskave v smeri novih, še učinkovitejših in varnejših antioksidantov izrednega pomena (10, 14).

Antioksidante lahko razdelimo na različne načine. Glede na izvor ločimo endogene (katalaza, superoksid dismutaza, albumin itd.) in eksogene (vitamin E in C, karotenoidi itd.). Razdelimo jih lahko glede na fizikalno-kemijske lastnosti, torej na lipofilne (vitamin E) ali hidrofilne (vitamin C) antioksidante. Lahko so obnovljivi, torej tisti, ki se lahko regenerirajo (vitamin C in E, lipojska kislina), ali pa se žrtvujejo v reakcijah z reaktivnimi zvrstmi (likopen, sečna kislina) (2).

Glede na mehanizme delovanja bi antioksidante lahko razdelili na:

- Katalitični odstranjevalci radikalov

Superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) in peroksidaze (GPx) so eni izmed najbolj pomembnih encimov v telesu, ki katalizirajo pretvorbo reaktivnih zvrsti v manj reaktivne spojine. Slika 1 prikazuje povezavo encimov pri odstranjevanju superoksidnega radikala. SOD katalizira pretvorbo dveh superoksidnih radikalov do kisika in vodikovega peroksida, ki ga nato CAT pretvori v vodo in kisik. Drugi način odstranjevanja vodikovega peroksida pa je preko GPx, ki vodikov peroksid pretvori v vodo s pomočjo prehajanja glutationa (GSH) med oksidirano in reducirano obliko (2).



Slika 1: Shema katalitičnega odstranjevanja superoksidnega radikala (15)

- Lovilci radikalov oziroma reducenti

Reagirajo z radikali in jih tako pretvorijo v manj reaktivne ali nereaktivne produkte, sami pa pri tem pridobijo lastnosti radikalov, vendar niso sposobni nadaljnje oksidacije. V to skupino spadajo vitamin C in E, β -karoten, glutation itd. (5).

- Kelatorji kovin

Delujejo posredno, saj kovalentno vežejo pro-oksidante (bakrovi in železovi ioni, hem), s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost in tako preprečijo katalizo radikalskih reakcij in nastanek radikalov. Kelatorji kovin so transferin, haptoglobin, hemopeksini, albumin itd. (5).

Našteti mehanizmi delovanja pa niso edini, saj je antioksidativna mreža izredno kompleksna. Vanjo spadajo tako vitamini, maščobe, lipidi, aminokisliline, tioli, peptidi, proteini, encimi, različne spojine rastlinskega izvora kot tudi minerali in različni metaboliti (2). V grobem bi lahko antioksidativni obrambni mehanizem razdelili na tri nivoje: primarni, sekundarni in terciarni. Primarni obrambni mehanizem je tisti, ki preprečuje nastanek radikalov, sekundarni pa nevtralizira že nastale radikale. Terciarni obrambni mehanizem skrbi za popravilo radikalskih poškodb. Torej v primeru, ko pride do poškodb z radikali, se vključijo popravljalni mehanizmi. Ti mehanizmi delujejo na encime, ki identificirajo in odstranijo oksidirani del, ter nato sintetizirajo novi del in ga vključijo nazaj v molekulo. Med tovrstne popravljalne mehanizme sodijo hidrolaze, transferaze in polimeraze (5).

V primeru, ko spremenimo pH, ali pa, ko je oksidirani produkt oziroma antioksidant, ki je oddal elektron ali vodik, v visokih koncentracijah, se lahko smer reakcije obrne in oksidirani produkt deluje prooksidativno (2). Prav tako lahko vnos večjih količin ene vrste antioksidanta v telesu zavre sintezo endogenih antioksidantov (13).

1.2.1 (Poli)fenoli

Med (poli)fenole spadajo vse spojine, ki imajo eno ali več hidroksilnih (-OH) skupin na benzenovem obroču (2). V sadju in zelenjavi se sintetizirajo različne polifenolne spojine z namenom zaščite rastline pred različnimi poškodbami in napadi (16).

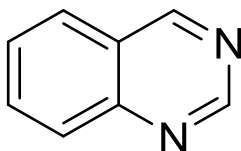
(Poli)fenoli imajo številne biološke učinke. V prvi vrsti delujejo kot antioksidanti, saj kelirajo kovinske ione in so lovilci radikalov. Aktivirajo celične odzive poti, ki sprožijo ekspresijo genov za antioksidativne encime, šaperone in proteine, ki promovirajo preživetje. Tako zvišajo antioksidativne in znižajo prooksidativne encime (7). Izkazujejo tudi protirakavo delovanje z zmanjšanjem metilacije DNA in sprememb histonov ter s spremembami ekspresije transkripcijskih faktorjev. Zmanjšajo hipertrofijo, fibrozo ter apoptozo celic. (Poli)fenolom pripisujejo tudi zniževanje krvnega tlaka in izboljšanje delovanja ventriklov v srcu. Imajo tudi protivnetno, protimikrobno in protiglivično delovanje (7, 17).

Vendar pa lahko delujejo tudi kot prooksidanti v visokih koncentracijah, pri visokem pH-ju in temperaturi ali v prisotnosti kovin. Nastane lahko vodikov peroksid, aroksilni radikal in nadalje superoksidni radikal ali pa sprožijo oksidativni stres z nastankom hidroksilnih radikalov preko prehodnih kovin in Fentonove reakcije. Prooksidativni polifenoli tako delujejo citotoksično z induciranjem apoptoze preko različnih poti. Tako na primer antocianini, pigmenti v rdečem vinu in jagodičevju, povzročijo apoptozo v rakavih celicah z generiranjem visokih koncentracij reaktivnih zvrsti, saj so prehodne kovine v rakavih celicah bolj pogoste kot v normalnih celicah (10).

1.2.2 Kinazolini in kinazolinoni

Leta 1869 je Griess z reakcijo cianogena ((CN)₂) in antranilne kisline naredil prvi kinazolinski derivat 2-ciano-3,4-dihidro-4-oksokinazolin, imenovan bicianoamid benzoil. Kemijske lastnosti kinazolinov je leta 1957 preučil Williamson, sledil mu je Lindquist leta 1959 ter leta 1963 Armarego (18).

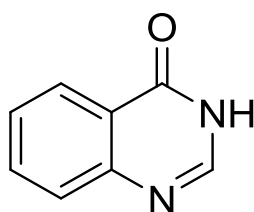
Kinazolini so sestavljeni iz dveh aromatskih obročev, iz benzenovega in pirimidinskega obroča, ki imata oba po 6 atomov (slika 2). So rumeno obarvane spojine in se običajno nahajajo v obliki kristalov (19).



Slika 2: Struktura kinazolina (20)

Kinazolini so stabilni v mrzlih razredčenih kislinah in alkalnih raztopinah, vendar pa razpadejo, če le-te raztopine zavrejo. Različno substituirane kinazoline lahko pridobimo s hidrolizo, oksidacijo, redukcijo, nukleofilno in elektrofilno substitucijo (nitracijo), alkilacijo ali adicijo (18). Lastnosti substituiranih kinazolinov so odvisne od narave substituentov in njihove lokacije, torej če se le-ti nahajajo na pirimidinskem obroču ali benzenovem obroču (18).

Ko v pirimidinski obroč kinazolina uvedemo karbonilno skupino, dobimo kinazolinon. Obstajata dve strukturi izomeri kinazolinonov, 2-kinazolinon in 4-kinazolinon (slika 3), slednja je tudi pogostejša (19).



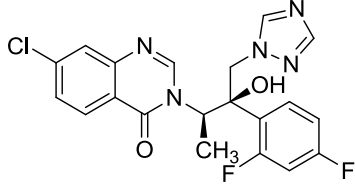
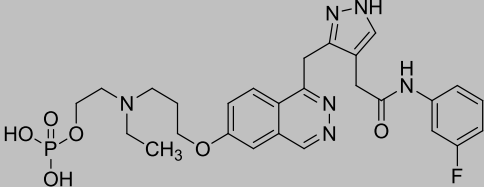
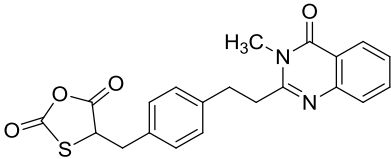
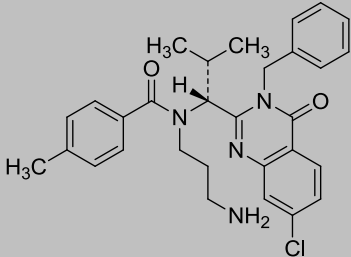
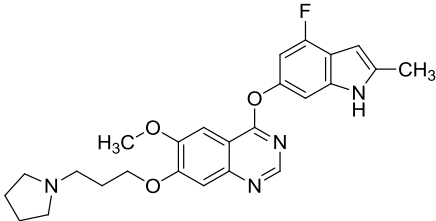
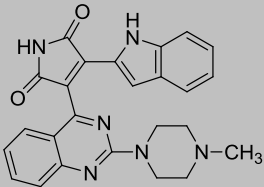
Slika 3: Struktura 4-kinazolinona (19)

Kinazolinoni so izredno pomembne strukturne komponente, ki jih najdemo v biološko in farmakološko aktivnih snoveh ter naravnih materialih (21). Številni naravni alkaloidi, ki jih najdemo v rastlinah, živalih in mikroorganizmih, vsebujejo kinazolinonske skupine, na primer febrifugin, luotonin F, tiabutazin itd. (14).

Substituirani derivati kinazolinonov imajo širok razpon bioaktivnih lastnosti, kot so delovanje proti raku, malariji, mikrobom, glivam, virusom, vnetju, tuberkulozi in praživalim, delujejo tudi kot diuretiki, mišični relaksanti, antidepresivi itd. (14, 18). Nekatero dobro poznane učinkovine so prikazane v preglednici II. Kinazoline in kinazolinone uporabljamo tudi kot reagente za kemijske sinteze, med drugim pa izkazujejo tudi antioksidativno delovanje (17, 18).

Preglednica II: Kinazolini in kinazolinoni kot zdravilne učinkovine ter njihovo delovanje (18)

UČINKOVINA	STRUKTURA	DELOVANJE
Afatinib		Inhibitor tirozin kinaze

Albakonazol		Protiglivično delovanje
Barasertib		Zdravljenje akutne mieloične levkemije
Balaglitazon		Antidiabetik, zmanjšuje lipide v krvi
Ispinesib		Zdravljenje solidnih tumorjev
Cediranib		Zdravljenje hematoloških rakov ter metastaz v jetrih
Sotrastaurin		Luskavica, ulcerozni kolitis

1.3 METODE ZA VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

Vrednotenje antioksidantov je izrednega pomena zaradi njihove široke uporabe v medicini, hrani in kozmetiki (22). Metode za ugotavljanje antioksidativnih lastnosti spojin temeljijo

na različnih principih. Tako lahko ločimo spektrofotometrične, elektrokemične in kromatografske metode, ki so prikazane v preglednicah III, IV in V (11).

Preglednica III: Spektrofotometrične metode za določevanje antioksidativnih lastnosti ter principi delovanja (11, 23)

SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE	
METODA	PRINCIP
DPPH	Kolorimetrično: antioksidant reagira z 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikalom
ABTS	Kolorimetrično: antioksidant reagira z 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS) radikalom
FRAP (ferric reducing antioxidant parameter)	Kolorimetrično: antioksidant reducira kompleks feri (Fe^{3+}) ion s 2,4,6-tri(2-bridil)-1,3,5-triazin molekulo v fero (Fe^{2+})
CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity)	Kolorimetrično: antioksidant reducira Cu^{2+} v Cu^{1+}
ORAC (oxygen radical absorbance capacity)	Flouescenca: antioksidant reagira s peroksilnimi radikali, ki nastanejo iz 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida
HORAC (hydroxyl radical antioxidant capacity assay)	Flouescenca: antioksidant reagira s hidroksilnimi radikali, ki nastanejo preko Fentonove reakcije (preko Cu^{2+})
TRAP (total radical trapping antioxidant parameter)	Kemiluminiscenca: antioksidant reducira radikale, ki nastanejo pri toplotnem razpadu 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida

Preglednica IV: Elektrokemične metode za določevanje antioksidativnih lastnosti ter principi delovanja (11, 23)

ELEKTROKEMIČNE METODE	
METODA	PRINCIP
Ciklična voltametrij	Oksidacija/redukcija antioksidanta: merjenje toka pri

	spreminjanju napetosti
Amperometrija	Oksidacija/redukcija antioksidanta: merjenje intenzitete toka, ki potuje med delovno in referenčno elektrodo
Bioamperometrija	Antioksidant reagira z reverzibilnim redoks parom: merjenje toka med 2 delovnima elektrodama z majhno razliko v potencialu

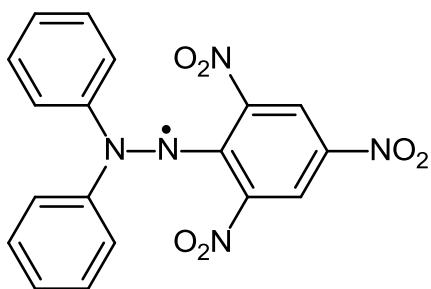
Preglednica V: Kromatografske metode za določevanje antioksidativnih lastnosti ter principi delovanja (11, 23)

KROMATOGRAFSKE METODE	
METODA	PRINCIP
Plinska kromatografija	Ločitev komponent v vzorcu glede na porazdelitve med tekočo stacionarno fazo in plinsko mobilno fazo, antioksidativno kapaciteto se nadalje določuje z drugimi metodami
Visokotlačna tekočinska kromatografija sklopljena z detekcijo antioksidanta v realnem času	Ločitev komponent v vzorcu glede na porazdelitev med trdo stacionarno fazo in tekočo mobilno fazo, nato uporaba detektorja z nizom diod in ABTS radikalom kot reagentom za pokolonsko derivatizacijo

1.3.1 DPPH test

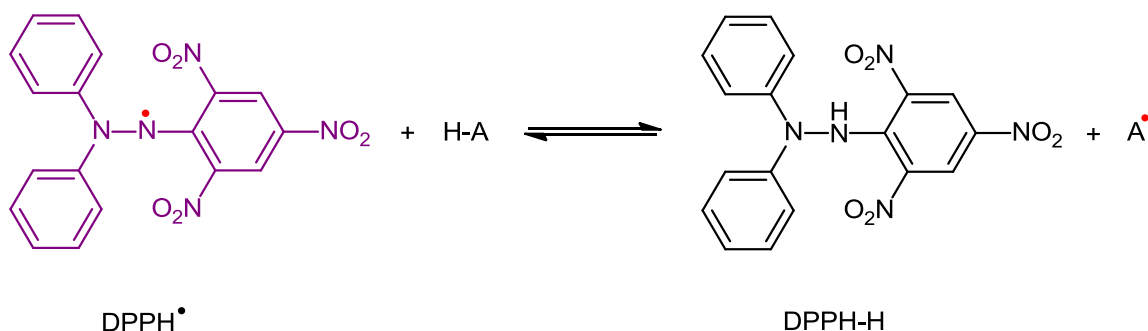
DPPH test je test, s pomočjo katerega ovrednotimo antioksidativno kapaciteto spojin in njihovo zmožnost redukcije radikalov. Spada med standardne rutinske metode in temelji na kolorimetričnem principu. Test je uvedel Blois leta 1958, ko je prvič prikazal prenos vodikovega atoma iz molekule cisteina na DPPH radikal (22).

DPPH je radikal z enim nesparjenim valenčnim elektronom pri dušikovem mostu in ima podobne lastnosti kot peroksilni radikal (22, 24). Delokalizacija nesparjenega elektrona omogoča, da je DPPH v raztopini stabilen. DPPH ne dimerizira kot večino ostalih radikalov, zaradi delokalizacije pa je značilne vijolične barve. V metanolu absorbira pri 517 nm (11).



Slika 4: 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) molekula (prirejeno po (25))

DPPH test temelji na redukcijsko-oksidacijski reakciji med antioksidantom in DPPH. Antioksidant deluje kot reducent, pri čemer odda vodikov atom, DPPH pa deluje kot oksidant, ki sprejme vodikov atom in se pri tem reducira 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH[•]) v 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin (DPPH-H) (slika 5). Pri redukciji se vijolična barva DPPH molekule spremeni v rumeno, kar se spektrofotometrično odraža s padcem absorbance pri 517 nm (5). Absorbanca je linearno odvisna s koncentracijo antioksidanta (11).



Slika 5: Reakcija DPPH z antioksidantom (H-A)

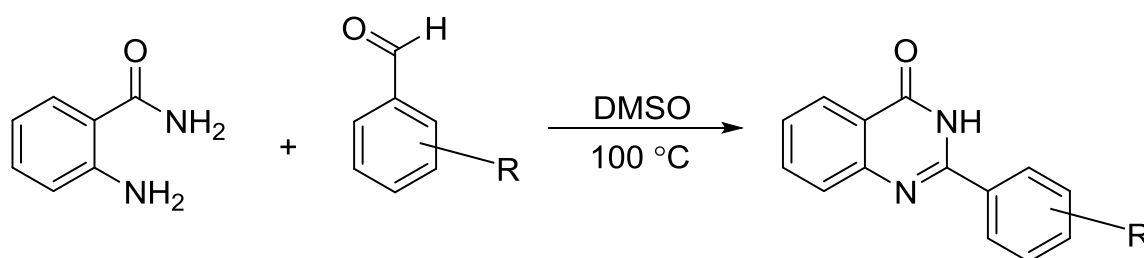
Test se pogosto uporablja za vrednotenje vsebnosti antioksidantov v rastlinah, kot so zelišča, zelenjava, olja itd. Izvaja se lahko v različnih topilih, kot so etanol, voda in aceton, metanol, voda in drugi alkoholi ali benzen. V principu je test enostaven, vendar pa zaradi uporabe stabilnega DPPH radikala številni antioksidanti z njim ne reagirajo ali reagirajo z drugačno kinetiko. Poleg tega lahko pri določenih pogojih pride do obrata reakcije, pri čemer bo zopet nastal DPPH[•] (22).

Pri testu se uporabljajo različne koncentracije antioksidanta, rezultate pa najpogosteje izrazimo kot efektivna koncentracija (EC₅₀). EC₅₀ je koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50% začetne koncentracije DPPH radikala. Nižja, kot je vrednost EC₅₀, boljšo antioksidativno kapaciteto ima spojina (24).

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je sinteza različnih analogov kinazolinonov, ki jih bomo ovrednotili z DPPH testom ter ugotavljali, kako struktura spojin vpliva na antioksidativno kapaciteto. Zaradi škodljivih učinkov reaktivnih zvrsti in z njimi povezanimi boleznimi je prizadevanje za nove, učinkovitejše in varnejše antioksidante izjemno pomembno. Kinazolinoni so zaradi številnih bioloških učinkov izredno zanimivi za farmacevtsko uporabo, med drugimi pa izkazujejo tudi antioksidativne lastnosti (18).

S tem namenom bomo v okviru magistrske naloge sintetizirali nekaj analogov kinazolinonov, ki so na mestu 2 substituirani s (poli)fenoli. Sintetizirane spojine bomo pripravili z reakcijo med antranilamidom in različnimi benzaldehidi (slika 6). Uporabili bomo naslednje benzaldehyde: benzaldehyd, 2,4-dihidroksibenzaldehyd, 3,4-dihidroksibenzaldehyd, 2,5-dihidroksibenzaldehyd, 2,3,4-trihidroksibenzaldehyd, salicilaldehyd ter 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehyd. Sintetizirane spojine bomo identificirali s spektroskopskimi metodami (NMR, IR in MS).



Slika 6: Reakcijska shema sinteze 2-kinazolinonov

Sintetiziranim spojinam **1-7**, spojinam **8-14** in α -tokoferolu bomo določili antioksidativno kapaciteto s pomočjo metode redukcije 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila (DPPH). Ugotavljali bomo, kako strukturne spremembe spojin vplivajo na antioksidativno kapaciteto. Zanima nas, ali spojine delujejo kot antioksidanti ter kako število in prisotnost različnih skupin, kot so hidroksilne, metoksi in etoksi skupine ter zamenjava fenila s stirilom, vplivajo na antioksidativno kapaciteto spojin.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 TOPILA IN REAGENTI

3.1.1 Topila in reagenti za sintezo 2-kinazolinonov

Preglednica VI: Topila in reagenti za sintezo

Ime	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Proizvajalec
Antranilamid	C ₇ H ₈ N ₂ O	136,15	ALDRICH
Benzaldehid	C ₇ H ₈ O	106,13	Kemika
2,4-Dihidroksibenzaldehid	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	Acros organics
3,4-Dihidroksibenzaldehid	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	Acros organics
2,5-Dihidroksibenzaldehid	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	Acros organics
2,3,4-Trihidroksibenzaldehid	C ₇ H ₆ O ₄	154,12	Acros organics
Salicilaldehid	C ₇ H ₆ O ₂	122,12	Merck
2-Hidroksi-5-metoksibenzaldehid	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	TCI
Dimetil sulfoksid	C ₂ H ₆ SO	78,13	Merck

Deionizirana voda, ki smo jo uporabili pri sintezi, je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo.

3.1.2 Topila in reagenti za DPPH test

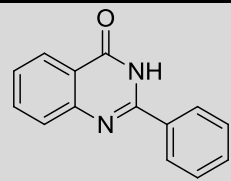
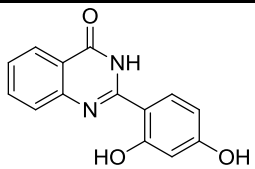
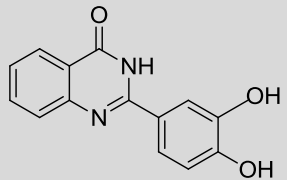
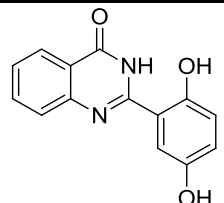
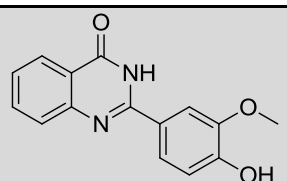
Preglednica VII: Topila in reagenti za DPPH test

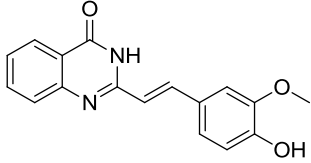
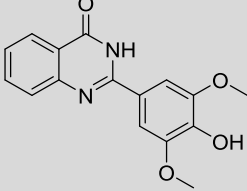
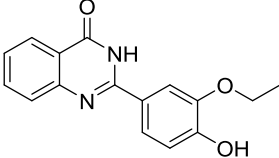
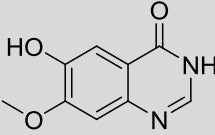
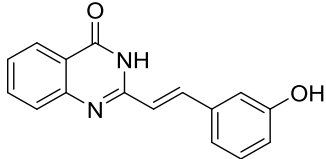
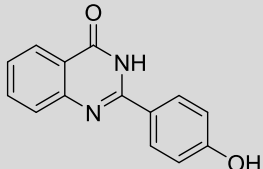
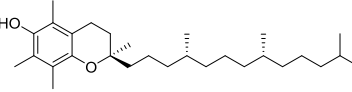
Ime	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Proizvajalec
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394,32	ALDRICH
Metanol	CH ₃ OH	32,04	CARLO ERBA

3.2 SPOJINE

V magistrski nalogi smo za DPPH test uporabili 12 spojin. Spojine **1-4** smo sintetizirali sami, spojine **8-14** pa so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Kot standard smo uporabili α -tokoferol, proizvajalca Acros organics. Pri sobni temperaturi se nahaja v obliki rumenega olja. Spojinam **1-4** in **8-14** ter α -tokoferolu smo določili koncentracije, ki so potrebne za redukcijo 50% začetne vrednosti DPPH (EC_{50}).

Preglednica VIII: Prikaz analiziranih spojin

Spojina	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	Mol. masa (g/mol)	Kemijska struktura
1	2-fenilkinazolin-4(3H)-on	$C_{14}H_{10}N_2O$	222,25	
2	2-(2,4-dihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-on	$C_{14}H_{10}N_2O_3$	254,25	
3	2-(3,4-dihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-on	$C_{14}H_{10}N_2O_3$	254,25	
4	2-(2,5-dihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-on	$C_{14}H_{10}N_2O_3$	254,25	
8	2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)kinazolin-4(3H)-on	$C_{15}H_{12}N_2O_3$	268,27	

9	(<i>E</i>)-2-(4-hidroksi-3-metoksistiril)kinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	294,30	
10	2-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₄	298,30	
11	2-(3-etoksi-4-hidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	282,30	
12	6-hidroksi-7-metoksikinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	192,17	
13	(<i>E</i>)-2-(3-hidroksistiril)kinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	264,28	
14	2-(4-hidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	238,25	
α -tokoferol	(2 <i>R</i>)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-(4,8,12-trimetiltridecil)]-6-kromanol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430,72	

3.3 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

Pri delu smo uporabili naslednje aparature in laboratorijsko opremo:

- analitsko tehtnico AG 245 proizvajalca Mettler Toledo (Švica),
- precizno tehtnico PB403 proizvajalca Mettler Toledo (Švica),
- polavtomatske pipete BRAND Transferpette®: 0,5 - 5 mL, Thermo SCIENTIFIC
- FINNPIPETTE® F2 100 - 1000 μ L, Eppendorf Research 20 - 200 μ L,

- nastavke za pipete BRAND Transferpette®,
- 5 mL penicilinke neoLAB,
- mikrotitrne plošče Techno Plastic Products® (96 vdolbinic),
- ultrazvočno kopel Sonis 3 proizvajalca ISKRA Pio d.o.o.,
- rotavapor Büchi 461 WaterBath,
- UV svetilka Camag,
- magnetno mešalo Ika,
- čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader proizvajalca BioTek.
- laboratorijsko steklovino različnih proizvajalcev,
- osebna zaščitna sredstva.

3.4 ANALIZNE METODE IN PROGRAMSKA OPREMA

3.4.1 Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje spojin in risanje reakcijskih shem ter kemijskih struktur smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca Cambridge Soft.

3.4.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)

TLC analizo smo uporabili za sledenje poteka kemijskih reakcij in določevanje čistosti posameznih frakcij. Uporabili smo kromatografske ploščice z 0,20 mm plastjo silikagela na aluminijastem nosilcu (Merck, TLC Silica gel 60 F₂₅₄). Za mobilno fazo smo uporabili diklorometan in metanol v razmerju 15:1. Spojine smo nato detektirali s pomočjo UV svetilke Camag pri valovni dolžini 254 nm.

3.4.3 Določevanje tališč

Tališča sintetiziranih spojin smo določili s Kofflerjevim talilnim mikroskopom proizvajalca Leica z ogrevalno mizico na Fakulteti za farmacijo. Tališča niso korigirana.

3.4.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR spektre smo posneli s pomočjo spektrometra Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za Farmacijo. Za topilo smo uporabili devteriran DMSO-d₆. Kot interni standard je bil uporabljen tetrametilsilan (TMS). Spektre smo posneli pri 400 MHz in jih analizirali s programom NMRnotebook (NMRTEC).

3.4.5 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre sintetiziranih spojin smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet FT-IR na Fakulteti za farmacijo s tehniko popolnega odboja (ATR). Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2 (28).

3.4.6 Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre so posneli na masnem spektrometru Q-TOF Premier z ESI metodo ionizacije proizvajalca Micromass, Waters (Manchester, Velika Britanija) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.4.7 DPPH test

Vrednotenje antioksidativne kapacitete spojin smo izvedli s pomočjo DPPH testa (5,6). Za merjenje absorbanca različnih koncentracij preiskovanih spojin smo uporabili mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami. Absorbance smo izmerili z mikrotitrskim čitalcem Synergy H4 Hybrid Reader proizvajalca BioTek, protokol za meritve pa smo pripravili v programu Gen5. Analizo meritev absorbanca in risanje grafov smo naredili s pomočjo računalniškega programa MS Excel 2010. V programu Excel smo za vsako spojino izračunali enačbo regresijske premice, vrednost EC_{50} ter standardno napako.

- **Regresijska premica**

Linearno regresijsko premico smo izračunali po enačbi 1.

$$y=k*x+n, \text{ (enačba 1)}$$

kjer je:

y...absorbanca,

x...koncentracija,

k...naklon regresijske premice,

n...odmik regresijske premice na ordinati.

- **Standardna napaka**

Za izračun standardne napake (SN) smo uporabili funkcijo STEXY (enačba 2) v programu Excel (Microsoft Office 2010).

$$SN^2 = \frac{1}{n-2} \left[\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right], \text{ (enačba 2 (29))}$$

kjer je:

n...velikost vzorca,

y...matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk,

\bar{y} ...srednja vrednost y,

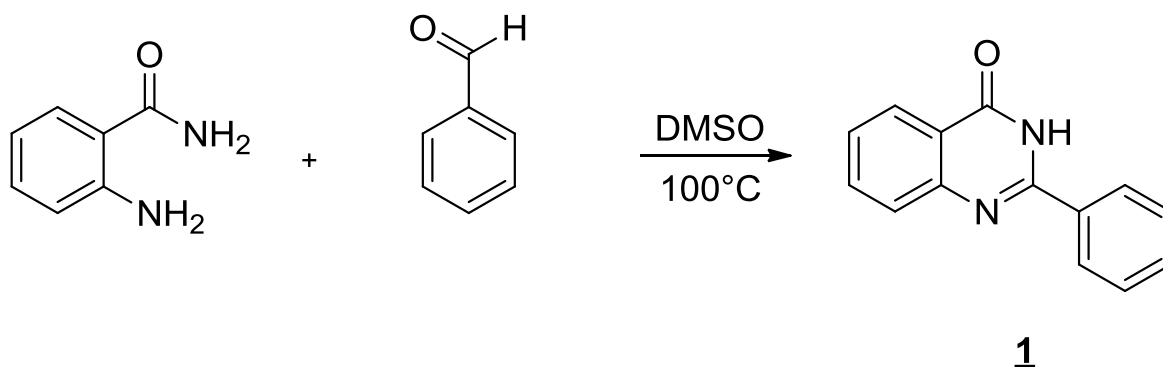
x...matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SPLOŠNI POSTOPEK ZA SINTEZO 2-KINAZOLINONOV

1 ekvivalent antranilamida in 1,2 ekvivalenta ustreznega benzaldehida raztopimo v 5 mL DMSO. V reakcijsko zmes dodamo magnet in zmes med mešanjem segrevamo na oljni kopeli 24 ur pri 100 °C. Po 24 urah reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in dodamo 100 mL prečiščene vode. Spojina se obori, saj ni topna v vodi. Precipitat izoliramo s filtracijo s presesavanjem, spiramo s prečiščeno vodo in metanolom. Z rotavaporjem pri povišani temperaturi (50 °C) in znižanem tlaku odparimo vodo in metanol. Identiteto produkta potrdimo z NMR, IR in MS analizo.

- **Sinteza 2-fenilkinazolin-4(3H)-ona (**1**) (1)**



Slika 7: Reakcijska shema sinteze spojine **1**

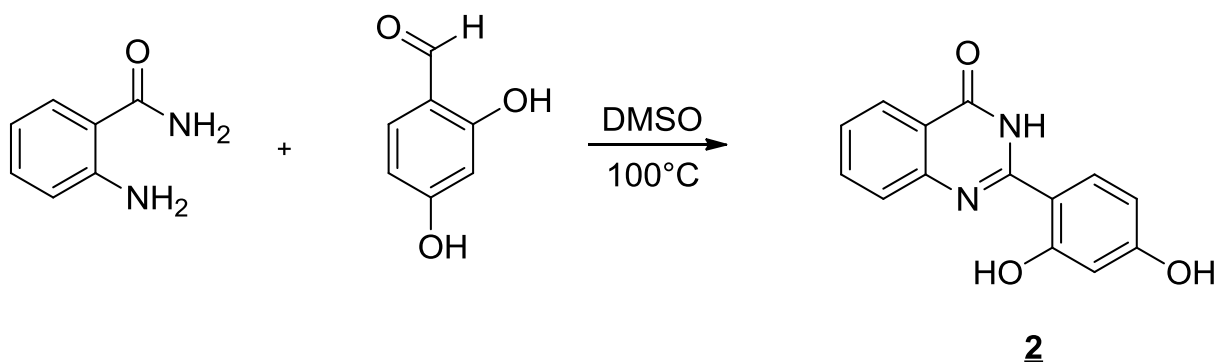
Spojino **1** smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in benzaldehida (122,45 μ L ; 1,2 mmol; 1,2 eq) (1). Spojina **1** je bila dovolj čista, da smo jo lahko uporabili za vrednotenje antioksidativne kapacitete brez dodatnega čiščenja.

Rezultati analize

	Izgled: beli igličasti kristali Izkoristek: 81% Tališče: 214 – 217 °C
¹ H NMR	δ (ppm) = 7,52 – 7,61 (m, 4H, H-Ar); 7,75 – 7,77 (m, 1H, H-

(DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	Ar); 7,83 – 7,87 (m, 1H, H-Ar); 8,16 – 8,21 (m, 3H, H-Ar); 12,57 (s, 1H, -NH-CO-)
¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	δ(ppm) = 120,93 (C-Ar); 125,84 (C-Ar); 126,61 (C-Ar); 127,49 (C-Ar); 127,74 (2C, C-Ar); 128,61 (2C, C-Ar); 131,4 (C-Ar); 132,67 (C-Ar); 134,63 (C-Ar); 148,70 (C-Ar); 152,31 (C-Ar); 162,24 (-CO-NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3063, 1661, 1599, 1557, 1474, 1336, 1290, 1190, 1143, 1102, 1024, 940, 822, 765, 687, 617, 536
MS (ESI)	<i>m/z</i> = 220,95 [M-H] ⁻
TLC	R _f (diklorometan/metanol = 15/1): 0,76

• **Sinteza 2-(2,4-dihidroksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (2)**



Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 2

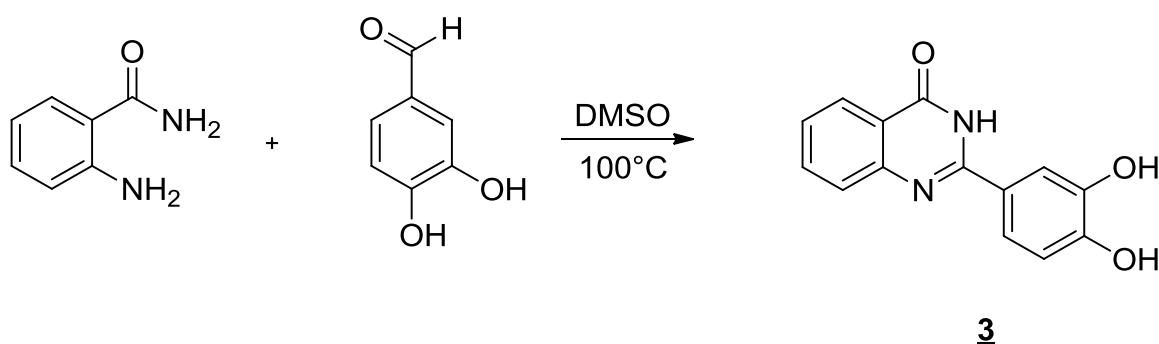
Spojino 2 smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in 2,4-dihidroksibenzaldehida (165,74 mg; 1,2 mmol; 1,2 eq). Spojina 2 je bila dovolj čista, da smo jo lahko uporabili za vrednotenje antioksidativne kapacitete brez dodatnega čiščenja.

Rezultati analize

	Izgled: rumeno beli kristali Izkoristek: 45% Tališče: 286 – 289 °C
¹ H NMR	δ(ppm) = 6,35 – 6,40 (m, 2H, H-Ar); 7,46 – 7,50 (m, 1H, H-

(DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	Ar); 7,66 – 7,68 (m, 1H, H-Ar); 7,80 – 7,84 (m, 1H, H-Ar); 8,10 – 8,13 (m, 2H, H-Ar); 10,28 (s, 1H, -OH); 12,27 (s, 1H, -NH-CO-); 14,24 (s, 1H, -OH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3195, 1670, 1605, 1525, 1441, 1334, 1287, 1230, 1179, 1148, 1067, 1018, 979, 949, 823, 761, 684, 622
MS (ESI)	m/z = 252,93 [M-H] ⁻
TLC	R _f (diklorometan/metanol = 15/1): 0,30

• **Sinteza 2-(3,4-dihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (3)**



Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine **3**

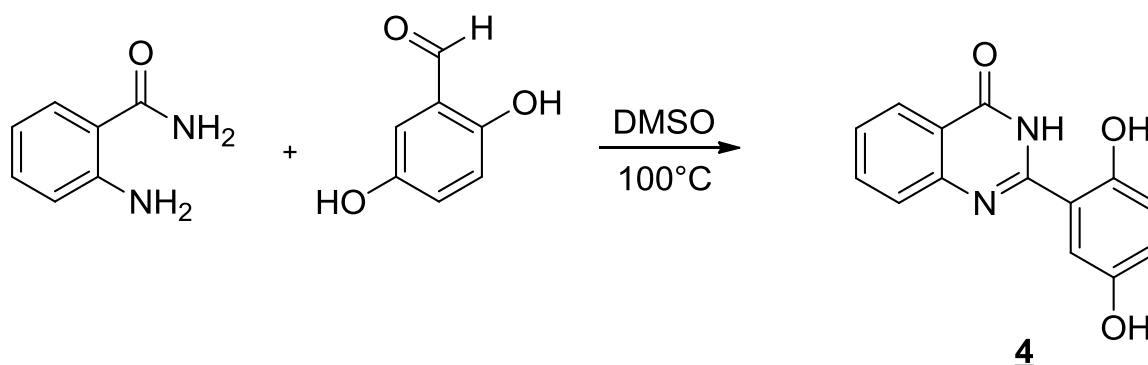
Spojino **3** smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in 3,4-dihidroksibenzaldehida (165,74 mg; 1,2 mmol; 1,2 eq). Spojina **3** je bila dovolj čista, da smo jo lahko uporabili za vrednotenje antioksidativne kapacitete brez dodatnega čiščenja.

Rezultati analize

	Izgled: rumeno beli kristali Izkoristek: 68% Tališče: 272 – 275 °C
¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	δ (ppm) = 6,84 – 6,86 (m, 1H, H-Ar); 7,44 – 7,48 (m, 1H, H-Ar); 7,55 – 7,58 (m, 1H, H-Ar); 7,66 – 7,70 (m, 2H, H-Ar); 7,78 – 7,80 (m, 1H, H-Ar); 8,11 – 8,13 (m, 1H, H-Ar); 9,34 (s, 1H, -OH); 9,69 (s, 1H, -OH); 12,25 (s, 1H, -NH-CO-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3455, 3035, 1643, 1602, 1528, 1468, 1403, 1290,

	1249, 1199, 1149, 1116, 1078, 978, 859, 770, 686, 645, 585, 525
MS (ESI)	$m/z = 252,92 [M-H]^-$
TLC	Rf (diklorometan/metanol = 15/1): 0,16

• **Sinteza 2-(2,5-dihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (4)**



Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine **4**

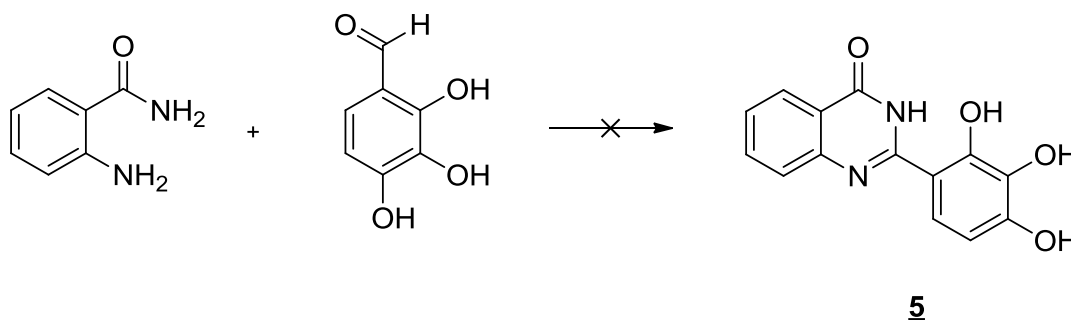
Spojino **4** smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in 2,5-dihidroksibenzaldehida (165,74 mg; 1,2 mmol; 1,2 eq). Spojina **4** je bila dovolj čista, da smo jo lahko uporabili za vrednotenje antioksidativne kapacitete brez dodatnega čiščenja.

Rezultati analize

	<p>Izgled: rjavi kristali</p> <p>Izkoristek: 56%</p> <p>Tališče: 293 – 296 °C</p>
¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	<p>δ(ppm) = 6,85 – 6,95 (m, 2H, H-Ar); 7,51 – 7,56 (m, 1H, H-Ar); 7,63 – 7,63 (m, 1H, H-Ar); 7,73 – 7,75 (m, 1H, H-Ar); 7,83 – 7,87 (m, 1H, H-Ar); 8,14 – 8,16 (m, 1H, H-Ar); 9,12 (s, 1H, -OH); 12,32 (s, 1H, -OH); 12,65 (s, 1H, -NH-CO-)</p>
IR (ATR)	<p>v [cm⁻¹] = 3198, 3093, 1609, 1561, 1509, 1480, 1368, 1326, 1302, 1251, 1200, 1124, 979, 917, 873, 816, 767, 678, 621, 526</p>

MS (ESI)	$m/z = 252,9 [M-H]^-$
TLC	Rf (diklorometan/metanol = 15/1): 0,26

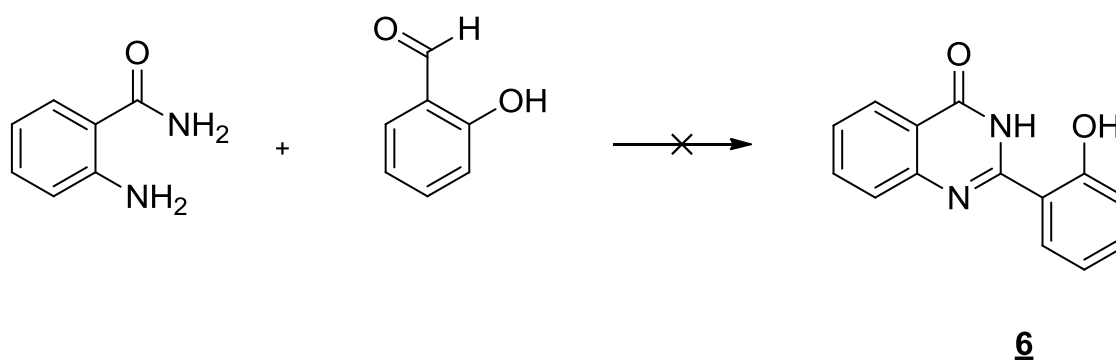
- Poskus sinteze 2-(2,3,4-trihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (**5**)



Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine **5**

Spojino **5** smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in 2,3,4-trihidroksibenzaldehida (184,94 mg; 1,2 mmol; 1,2 eq). TLC in NMR analizi sta pokazali, da sinteza ni uspela, zato za to spojino nismo izvedli DPPH testa.

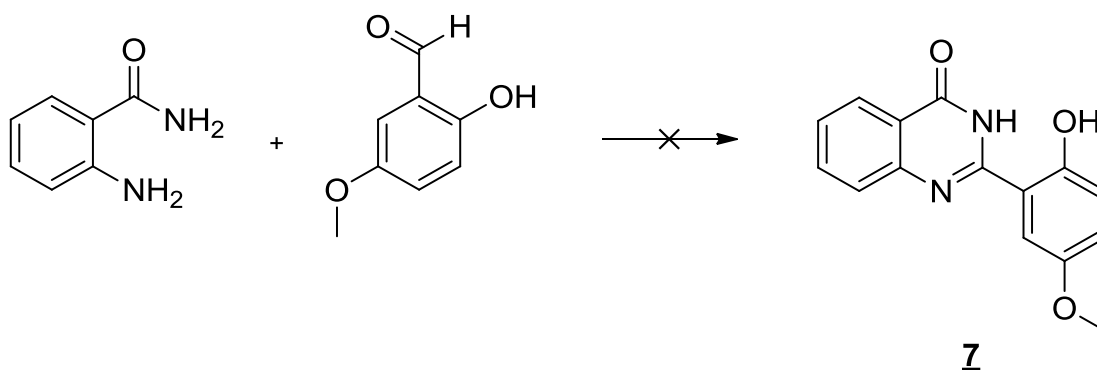
- Poskus sinteze 2-(2-hidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (**6**)



Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **6**

Spojino **6** smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in salicilaldehida (126 μ L; 1,2 mmol; 1,2 eq). TLC in NMR analizi sta pokazali, da sinteza ni uspela, zato za to spojino nismo izvedli DPPH testa.

- Poskus sinteze 2-(2-hidroksi-5-metoksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (**7**)



Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine **7**

Spojino **7** smo sintetizirali po splošnem postopku za sintezo 2-kinazolinonov iz antranilamida (136,15 mg; 1,0 mmol; 1,0 eq) in 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehida (150 μ L; 1,2 mmol; 1,2 eq). TLC in NMR analizi sta pokazali, da sinteza ni uspela, zato za to spojino nismo izvedli DPPH testa.

4.2 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE

4.2.1 Priprava vzorcev

Za pripravo osnovne raztopine DPPH, osnovnih raztopin spojin **1-4** in **8-14** ter α -tokoferola smo kot topilo uporabili metanol. Metanol je za vrednotenje spojin najprimernejše topilo, saj ne vpliva na reakcijo z DPPH, vse testirane spojine pa so v njem dobro topne (24).

Za določevanje vrednosti EC_{50} smo pripravili 1,5 mM osnovne raztopine spojin **1-4** in **8-14** ter α -tokoferola v 10 mL metanola. Z redčenjem z metanolom smo pripravili ustrezne koncentracije vzorcev. Koncentracije vzorcev so se od spojine do spojine razlikovale, saj smo za vsako spojino pripravili ustrezne koncentracije, ki so bile v linearnem območju metode.

4.2.2 Priprava DPPH

Za DPPH test smo pripravili 0,700 mM osnovno raztopino DPPH, tako da smo zatehtali 6,9 mg v 25 mL merilno bučko in dodali približno 20 mL metanola. Raztopino smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler se ni raztopil ves DPPH. Z metanolom smo dopolnili merilno bučko do oznake, jo zamašili in dobro premešali.

Absorbanca osnovne raztopine DPPH ne sme biti previsoka, torej višja od 1. Ta predstavlja zgornjo mejo linearnega območja metode, zato so rezultati z absorbanco višjo od 1 netočni in izven linearnega merilnega območja spektrofotometra. Osnovno raztopino DPPH smo pripravili vsakodnevno, saj je DPPH občutljiv na svetlobo, kisik in pH. Raztopino smo prav tako zaščitili pred svetlobo in jo hranili pri temperaturi 2-8 °C (6).

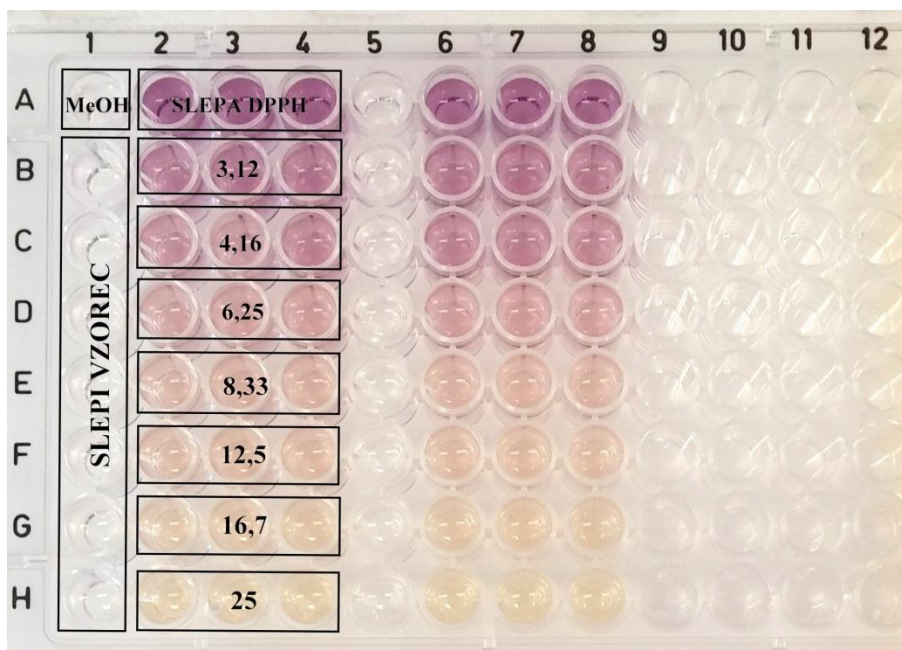
Za pripravo 0,140 mM raztopine DPPH smo v 10 mL penicilinko dodali 1 mL 0,700 mM osnovne raztopine DPPH in 4 mL metanola. Raztopino DPPH koncentracije 0,140 mM smo uporabili za določevanje vrednosti EC₅₀. Končna koncentracija DPPH v reakcijski zmesi po mešanju z vzorcem je bila 70 µM.

4.2.3 DPPH test

DPPH test smo izvedli s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic. Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo za vsako testirano spojino nanesti sedem različnih koncentracij v treh paralelkah in nato dodali 0,140 mM raztopino DPPH (slika 14). V vsaki vdolbinici je bil končni volumen 300 µL. Koncentracije vzorcev, ki smo jih nanašali, so se od spojine do spojine razlikovale in so bile v intervalu od 2,4 µM do 1,5 mM, v končni reakcijski zmesi pa pol manjše, saj smo vzorce mešali z DPPH v razmerju 1:1. Poleg različnih koncentracij vzorcev smo na mikrotitrsko ploščo nanesti tudi slepe vzorce, saj čitalec ne odšteje ozadja samodejno. Absorbance slepih vzorcev smo pri izračunu EC₅₀ odšteli od absorbance vzorcev.

Preglednica IX: Prikaz reakcijskih zmesi za določevanje EC₂₀

Reakcijska zmes	Vzorec (µL)	DPPH (µL)	Metanol (µL)
Ozadje vzorca- slepi vzorec	150	-	150
Vzorec	150	150	-
Slepi vzorec DPPH	-	150	150
Ozadje DPPH- metanol	-	-	300



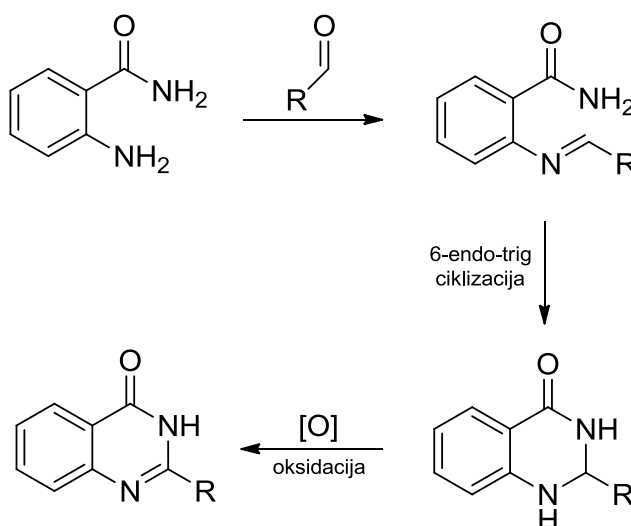
Slika 14: Primer nanašanja razredčin vzorcev in DDPH na mikrotitrsko ploščico

Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Po 30, 60 in 90 minutah smo vstavili mikrotitrsko ploščo v čitalec mikrotitrskih ploščic in opravili meritev s programom Gen5 pri valovni dolžini 517 nm.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZE 2-KINAZOLINONOV

Spojine **1-7** smo sintetizirali iz antranilamida in ustreznih benzaldehidov. Sinteza kinazolinonov iz Shiffove baze poteče v dveh korakih (slika 15). Prvi korak je ciklizacija do 2,3-dihidrokinazolinona, drugi korak pa oksidacija do 2-kinazolinona, pri čemer v prisotnosti kisika nastane voda. Korak ciklizacije do 2,3-dihidrokinazolinona je najpočasnejši (21). V postopku ciklizacije nastane obroč s šestimi atomi, novo nastala vez v obroču se tvori z adicijo amidnega dušika na novo nastali imin. Ogljik, na katerem nastane nova vez, je v trigonalem položaju, zato ta način ciklizacije po Baldwinovih pravilih imenujemo 6-endo-trig ciklizacija (30).



Slika 15: Sinteza 2-kinazolinonov (prirejeno po (21))

Ena od metod sinteze kinazolinonov je tudi oksidativna ciklizacija Schiffovih baz iz *o*-antranilamidov in aldehydov v prisotnosti oksidantov. Vendar pa ta metoda običajno zahteva visoke koncentracije oksidantov, pri čemer nastanejo velike količine odpadnih produktov (21).

Sinteza 2-kinazolinonov, ki smo jo izvedli z aerobno oksidativno ciklizacijo v dimetil sulfoksidu (DMSO), je okolju prijazen postopek, saj ne potrebujemo toksičnih kovinskih katalizatorjev in baz. V reakciji kot oksidant nastopa kisik, zato je ta postopek primernejši kot tradicionalna oksidativna ciklizacijska metoda. Metoda je zato izredno uporabna, saj ni

potrebne po uporabi dodatnih reagentov, voda pa je edini stranski produkt sinteze. V postopku sinteze prav tako ne potrebujemo nobenih katalizatorjev, saj predvidevajo, da voda deluje kot nukleofilni katalizator (21).

Uporaba primerne vrste topila je pri sintezi kinazolinonov z aerobno oksidacijo izrednega pomena. DMSO predstavlja najprimernejše topilo, ostala topila, kot so voda, toluen, etanol, 1,4-dioksan, dimetilformamid, so neustrezna, saj je izkoristek v teh topilih signifikantno manjši. Izreden vpliv ima tudi temperatura. Sinteza namreč poteka veliko počasneje pri temperaturi 80 °C, pri 100 °C pa je reakcija veliko hitrejša (21).

Sintezo smo tako izvedli v topilu DMSO pri temperaturi 100 °C. Identiteto spojin **1-4** smo potrdili z NMR, IR in MS analizo. Sinteza spojin **5-7** ni uspela, saj sta TLC in NMR analizi pokazali, da novo nastale spojine **5-7** niso čiste. V končnih zmesih so bile poleg produktov prisotne še ostale spojine, saj reakcije niso potekle popolnoma. S kristalizacijo iz vode pa zelenih produktov nismo izolirali. Vzroki za to so lahko različni. Na reakcijo močno vplivata topilo in temperatura, zato bi bilo potrebno sintezo teh spojin ponoviti v drugih topilih in pri spremenjeni temperaturi. V študiji Na Yeun Kim in Cheol-Hong Cheon so predvidevali, da kot katalizator deluje voda, zato v postopku sinteze nismo dodali nobenega katalizatorja, ki bi lahko v primeru sinteze spojin **5-7** pospešil reakcijo (21). Eden izmed vzrokov za neuspešno sintezo bi lahko bil tudi prekratek čas sinteze, ki je bil v našem primeru 24 ur.

5.2 REZULTATI DPPH TESTA

Po sintezi smo spojinam **1-4**, **8-14** ter α -tokoferolu določili antioksidativno kapaciteto z DPPH testom. Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo v triplikatih nanесли ustrezne reakcijske zmesi. Za vsako testirano spojino smo uporabljali različne koncentracije, dokler se nismo približali koncentraciji spojine, ki je potrebna za redukcijo 50% začetne koncentracije DPPH radikala (EC_{50}). Zoženje koncentracij v bližino vrednosti EC_{50} daje bolj točne vrednosti, zato je pomembno, da so uporabljene koncentracije čim bližje tej vrednosti. Prav tako mora delo potekati v linearnem območju metode, torej v območju, kjer je odnos med koncentracijo spojine in redukcijo DPPH linearen, saj tako dobimo rezultate z manjšo napako (26). Vrednosti EC_{50} smo za vsako testirano spojino izračunali iz štirih do sedmih različnih koncentracij, ki so bile nad in pod EC_{50} . Glede na koncentracije testiranih spojin smo za vsako spojino poleg EC_{50} izračunali tudi regresijsko premico ter standardno

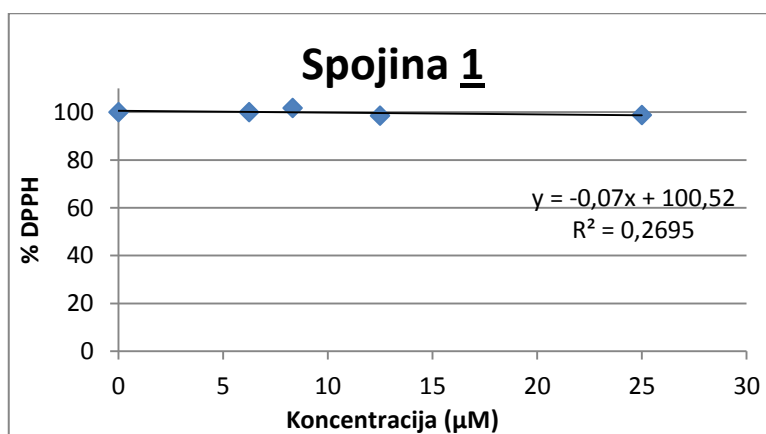
napako. V obliki grafov smo prikazali rezultate deleža DPPH-ja v odvisnosti od koncentracij spojin. Vrednosti R^2 so pri vseh grafih blizu vrednosti 1, kar nam pove, da je razpršenost rezultatov za regresijsko premico primerno majhna.

• **Spojina 1**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **1** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici X. V preglednici XI so prikazani rezultati regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki. EC_{50} za spojino **1** ni izračunan, saj spojina pri testiranih koncentracijah ne deluje kot antioksidant.

Preglednica X: Rezultati meritev absorbanc spojine **1**

Koncentracija spojine 1 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100,0	100,0	100,0
6,25	70	98,8	100,0	101,2
8,33	70	100,0	101,7	102,9
12,5	70	97,1	98,5	99,6
25	70	97,1	98,8	100,3



Slika 16: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **1** po 60 minutah

Preglednica XI: Prikaz regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki za spojino **1**

Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC_{50}
30 minut	$y = -0,1254 x + 100,03$	-
60 minut	$y = -0,07x + 100,52$	-

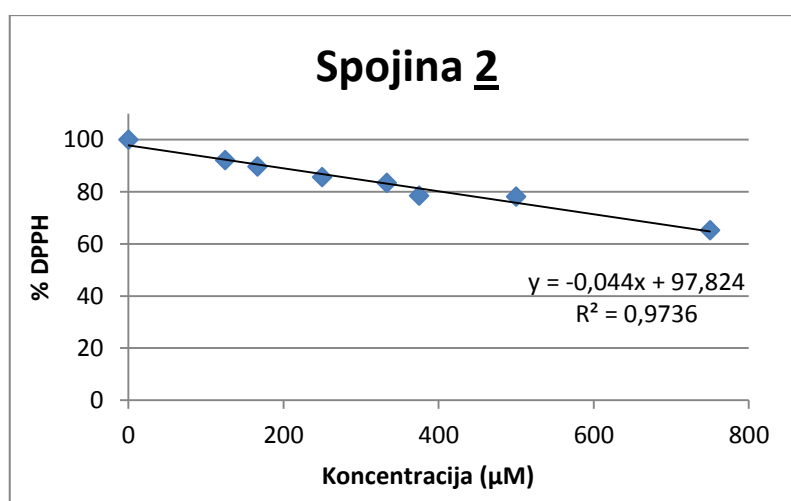
90 minut	$y = -0,0189x + 101,02$	-
----------	-------------------------	---

- **Spojina 2**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **2** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XII. V preglednici XIII so prikazani rezultati regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki.

Preglednica XII: Rezultati meritev absorbancc spojine **2**

Koncentracija spojine 2 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100,0	100,0	100
125	70	94,8	92,2	90,0
166,7	70	92,8	89,6	87,2
250	70	90,2	85,6	82,6
333,3	70	88,1	83,3	80,1
375	70	84,0	78,5	74,6
500	70	83,7	78,1	74,1
750	70	72,7	65,2	60,2



Slika 17: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **2** po 60 minutah

Preglednica XIII: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **2**

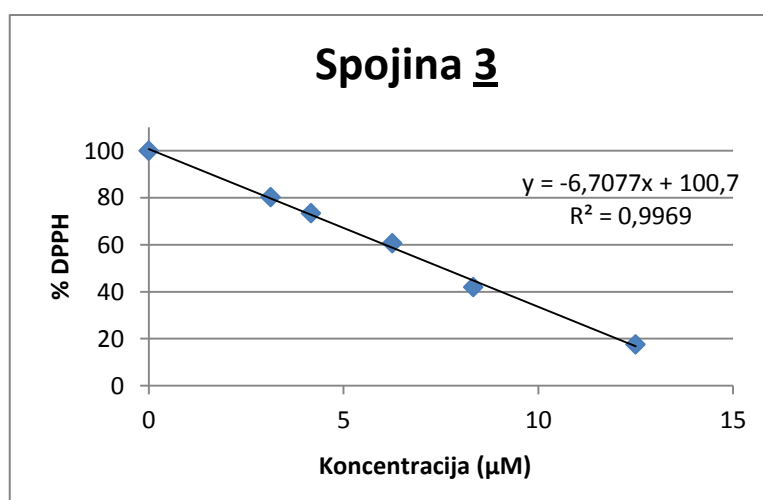
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -0,0349x + 99,216$	1410,2 ± 35,9
60 minut	$y = -0,044x + 97,824$	1086,9 ± 42,0
90 minut	$y = -0,0499x + 96,721$	936,3 ± 47,1

• **Spojina 3**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **3** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XIV. V preglednici XV so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XIV: Rezultati meritev absorbanc spojine **3**

Koncentracija spojine 3 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
3,1	70	82,8	80,1	79,3
4,2	70	76,5	73,4	72,2
6,2	70	66,1	60,6	58,7
8,3	70	49,2	41,9	39,5
12,5	70	28,1	17,5	13,7



Slika 18: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **3** po 60 minutah

Preglednica XV: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **3**

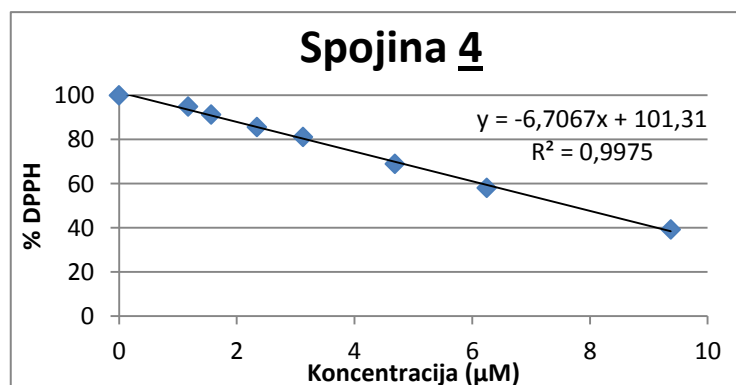
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -5,8483x + 100,65$	8,7 ± 0,3
60 minut	$y = -6,7077x + 100,7$	7,6 ± 0,3
90 minut	$y = -7,0129x + 100,74$	7,2 ± 0,2

• **Spojina 4**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **4** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XVI. V preglednici XVII so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XVI: Rezultati meritev absorbcanc spojine **4**

Koncentracija spojine 4 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
1,2	70	94,9	94,9	95,2
1,6	70	91,3	91,3	91,5
2,3	70	85,9	85,6	85,6
3,1	70	81,4	81,1	80,8
4,7	70	69,6	68,9	68,3
6,2	70	59,3	58,1	56,9
9,4	70	41,0	39,2	37,0



Slika 19: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **4** po 60 minutah

Preglednica XVII: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **4**

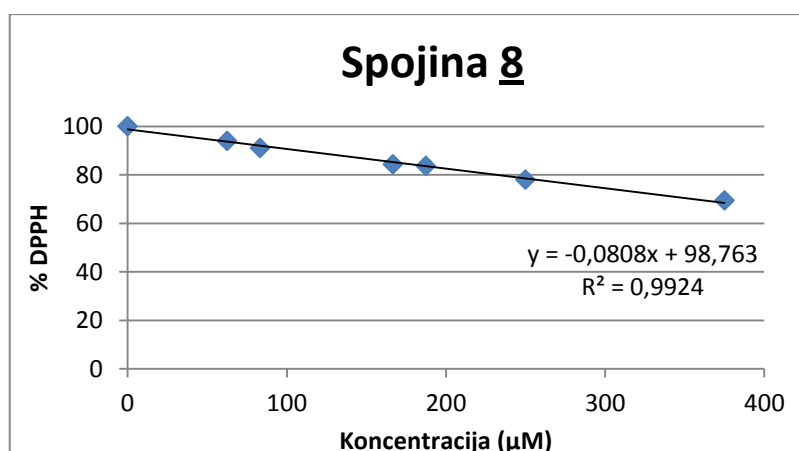
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -6,4946x + 101,07$	7,9 ± 0,3
60 minut	$y = -6,7067x + 101,31$	7,6 ± 0,2
90 minut	$y = -6,9703x + 101,77$	7,4 ± 0,2

• **Spojina 8**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **8** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XVIII. V preglednici XIX prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XVIII: Rezultati meritev absorbanco spojine **8**

Koncentracija spojine 8 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
62,5	70	96,4	94,0	92,6
83,3	70	94,0	91,0	89,3
166,7	70	89,8	84,3	81,6
187,5	70	88,6	83,6	80,8
250	70	83,3	78,0	74,6
375	70	76,2	69,4	65,3



Slika 20: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **8** po 60 minutah

Preglednica XIX: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **8**

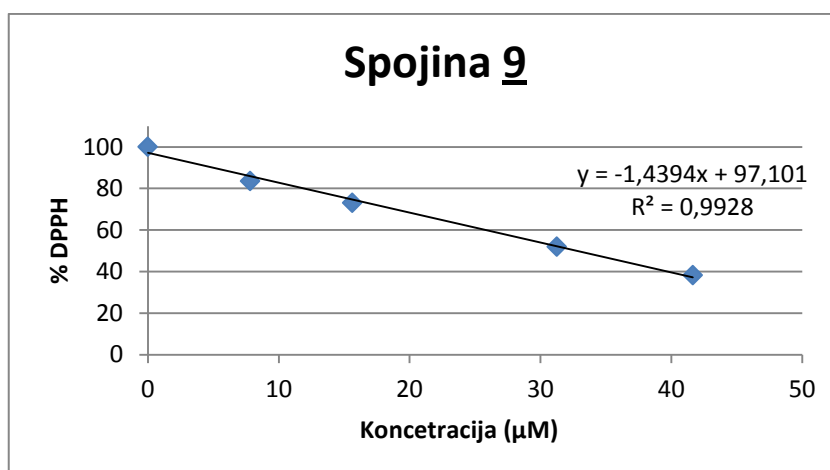
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -0,0639x + 100,02$	782,8 ± 12,1
60 minut	$y = -0,0808x + 98,763$	603,5 ± 12,1
90 minut	$y = -0,0912x + 98,13$	527,7 ± 15,1

• **Spojina 9**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **9** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XX. V preglednici XXI so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XX: Rezultati meritev absorbancc spojine **9**

Koncentracija spojine 9 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
7,8	70	83,3	83,5	84,5
15,6	70	73,2	73,0	73,7
31,2	70	53,2	52,0	51,7
41,6	70	40,2	38,3	37,1



Slika 21: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **9** po 60 minutah

Preglednica XXI: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **9**

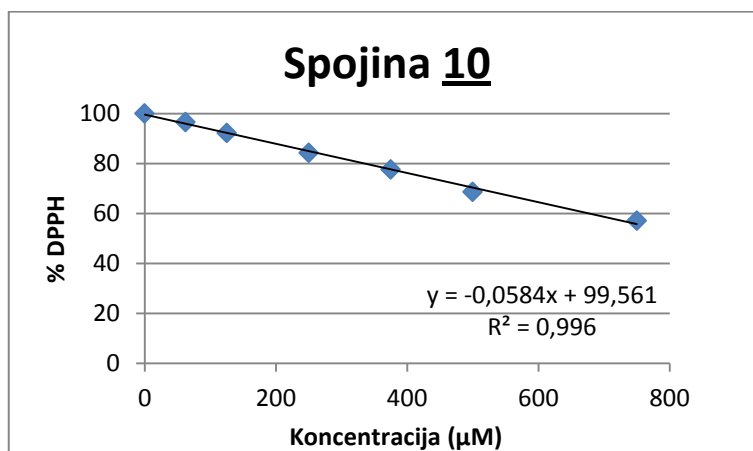
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -1,3871x + 96,708$	33,7 ± 2,0
60 minut	$y = -1,4394x + 97,101$	32,9 ± 4,6
90 minut	$y = -1,4759x + 97,872$	32,4 ± 1,2

• **Spojina 10**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **10** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XXII. V preglednici XXIII so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XXII: Rezultati meritev absorbancc spojine **10**

Koncentracija spojine 10 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
62,5	70	97,1	96,6	96,2
125	70	92,9	92,2	91,5
250	70	85,6	84,3	83,2
375	70	78,8	77,7	76,5
500	70	69,8	68,6	67,5
750	70	58,4	57,1	55,9



Slika 22: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **10** po 60 minutah

Preglednica XXIII: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **10**

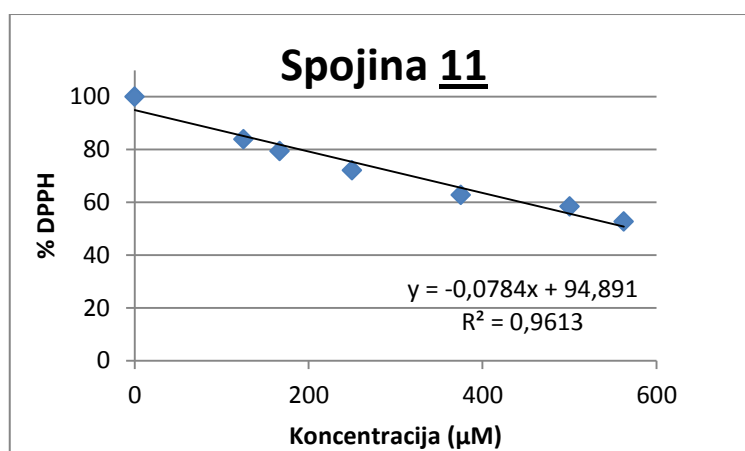
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -0,057x + 100,03$	877,7 ± 16,6
60 minut	$y = -0,0584x + 99,561$	854,5 ± 12,6
90 minut	$y = -0,0597x + 99,159$	823,4 ± 21,3

• **Spojina 11**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **11** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XXIV. V preglednici XXV so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XXIV: Rezultati meritev absorbanc spojine **11**

Koncentracija spojine 11 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
125	70	87,7	83,8	80,9
166,7	70	84,1	79,4	75,9
250	70	77,7	72,1	68,1
375	70	69,2	62,7	58,2
500	70	65,5	58,4	53,5
562,5	70	59,7	52,6	47,7



Slika 23: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **11** po 60 minutah

Preglednica XXV: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **11**

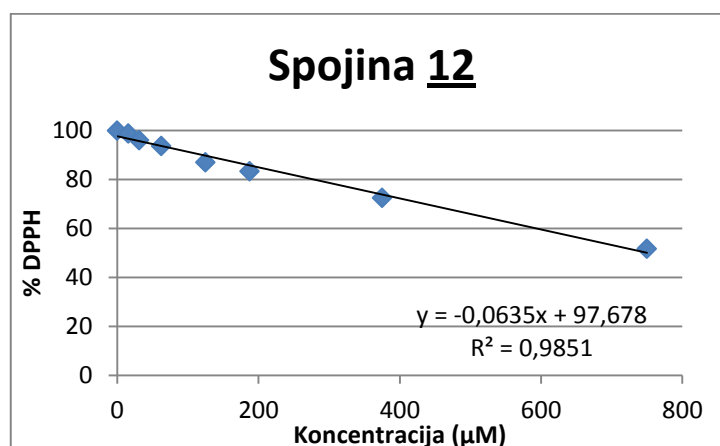
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -0,0675x + 96,813$	693,5 ± 36,0
60 minut	$y = -0,0784x + 94,891$	572,6 ± 45,2
90 minut	$y = -0,0859x + 93,457$	505,9 ± 51,0

• **Spojina 12**

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **12** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednica XXVI. V preglednica XXVII so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki.

Preglednica XXVI: Rezultati meritev absorbanc spojine **12**

Koncentracija spojine 12 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
15,6	70	99,3	98,8	98,1
31,2	70	97,2	96,0	94,9
62,5	70	95,8	93,7	91,8
125	70	90,6	87,1	84,2
187,5	70	87,9	83,3	79,9
375	70	78,6	72,5	68,4
750	70	59,9	51,7	46,7



Slika 24: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **12** po 60 minutah

Preglednica XXVII: Prikaz regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki za spojino **12**

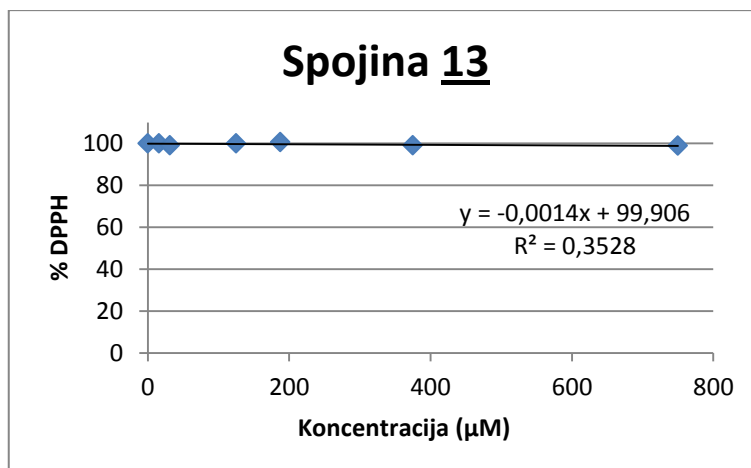
Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC ₅₀ (μM)
30 minut	$y = -0,053x + 98,921$	923,3 ± 21,3
60 minut	$y = -0,0635x + 97,678$	750,8 ± 34,1
90 minut	$y = -0,0695x + 96,448$	668,3 ± 43,2

• **Spojina 13**

Absorbance smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **13** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XXVIII. V preglednici XXIX so prikazani rezultati regresijskih premic in EC₅₀ v določeni časovni točki. EC₅₀ za spojino **13** ni izračunan, saj spojina pri testiranih koncentracijah ne deluje kot antioksidant.

Preglednica XXVIII: Rezultati meritev absorbanc spojine **13**

Koncentracija spojine 13 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
15,6	70	99,9	99,9	99,9
31,2	70	99,0	99,1	99,1
125	70	99,8	100	99,9
187,5	70	100,3	100,5	100,6
375	70	98,9	99,0	99,2
750	70	99,1	98,8	98,4



Slika 25: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **13** po 60 minutah

Preglednica XXIX: Prikaz regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki za spojino **13**

Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC_{50} (μM)
30 minut	$y = -0,0011x + 99,793$	-
60 minut	$y = -0,0014x + 99,906$	-
90 minut	$y = -0,0018x + 99,984$	-

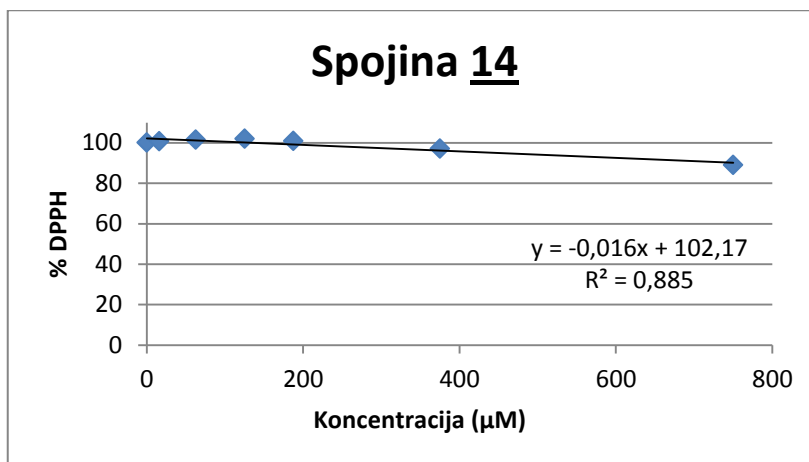
• Spojina 14

Absorbanco smo merili po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji spojine **14** z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XXX. V preglednici XXXI so prikazani rezultati regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki. EC_{50} za spojino **14** ni izračunan, saj spojina pri testiranih koncentracijah ne deluje kot antioksidant.

Preglednica XXX: Rezultati meritev absorbanc spojine **14**

Koncentracija spojine 14 v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 30 minutah	% DPPH po 60 minutah	% DPPH po 90 minutah
0	70	100	100	100
15,6	70	100,2	100,7	100,8
62,5	70	101,1	101,4	101,5
125	70	101,7	101,9	101,8
187,5	70	100,7	100,8	100,6
375	70	97,4	97,1	96,7

750	70	89,8	89,0	88,1
-----	----	------	------	------



Slika 26: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 14 po 60 minutah

Preglednica XXXI: Prikaz regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki za spojino 14

Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC_{50} (μM)
30 minut	$y = -0,0145x + 101,86$	-
60 minut	$y = -0,016x + 102,17$	-
90 minut	$y = -0,0173x + 102,25$	-

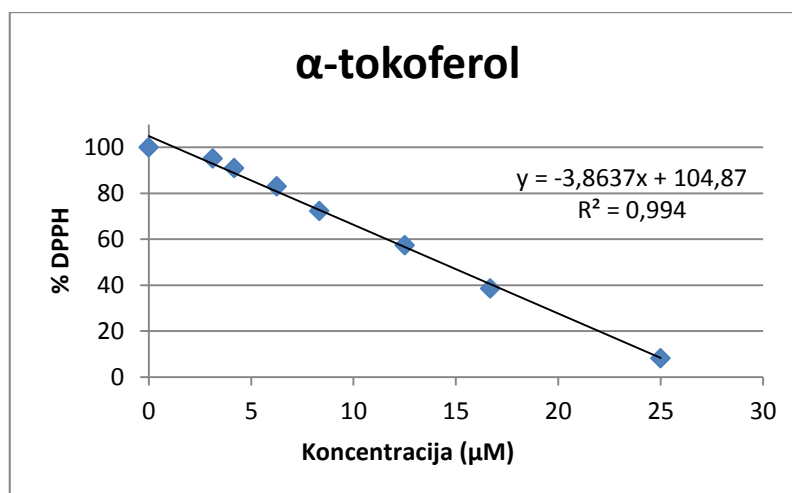
- **α -tokoferol**

Absorbance smo merili po 60 minutni inkubaciji α -tokoferola z DPPH. Rezultati v % DPPH, ki je ostal nereduciran, so prikazani v preglednici XXXII. V preglednici XXXIII so prikazani rezultati regresijske premice in EC_{50} po 60 minutni inkubaciji α -tokoferola z DPPH.

Preglednica XXXII: Rezultati meritev absorbanca α -tokoferola

Koncentracija α -tokoferola v reakcijski zmesi (μM)	Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (μM)	% DPPH po 60 minutah
0	70	100
3,1	70	95,1
4,2	70	90,8
6,2	70	82,9

8,3	70	72,2
12,5	70	57,3
16,7	70	38,5
25	70	8,1



Slika 27: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije α -tokoferola po 60 minutah

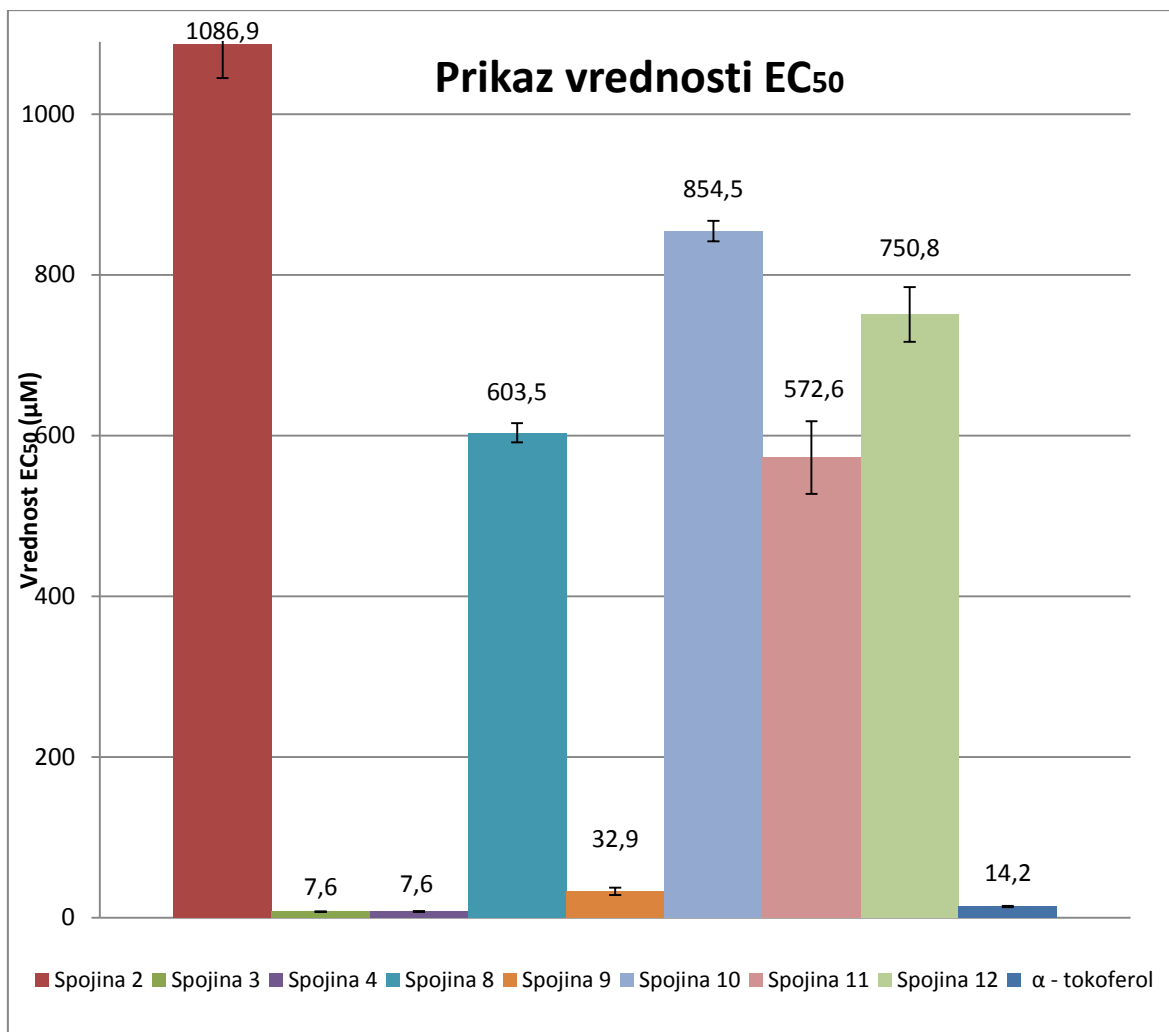
Preglednica XXXIII: Prikaz regresijskih premic in EC_{50} v določeni časovni točki za α -tokoferol

Čas inkubacije	Enačbe regresijske premice	EC_{50} (μM)
60 minut	$y = -3,8637x + 104,87$	$14,2 \pm 0,7$

- **Prikaz vrednosti EC_{50}**

Na sliki 28 so prikazane vrednosti EC_{50} za testirane spojine po 60 minutah inkubacije.

Spojinam **1**, **13** in **14** nismo izračunali EC_{50} , ker pri testiranih koncentracijah spojine ne delujejo kot antioksidanti.



Slika 28: Prikaz vrednosti EC₅₀ za testirane spojine po 60 minutah

5.3 KOMENTAR REZULTATOV DPPH TESTA

Enajstim derivatom kinazolinona in standardu α -tokoferolu smo določili antioksidativno kapaciteto s pomočjo DPPH testa. Vsakemu posebej smo iz enačb regresijskih premic izračunali vrednosti EC₅₀. S testom smo želeli ugotoviti, kako struktura spojin oziroma položaji in število hidroksilnih skupin vplivajo na antioksidativne lastnosti izbranih derivatov. Za vrednotenje antioksidativnih lastnosti smo izbrali DPPH test, ki je relativno enostaven, občutljiv in hiter ter zelo pogosto uporabljen test za vrednotenje antioksidativne kapacitete (26).

DPPH je stabilen radikal, vendar je občutljiv na svetlobo in kisik. Fotokemična razgradnja DPPH pozitivno korelira z absorbirano energijo svetlobe. Ozelik et al. poročajo, da se po

120 minutni svetlobni izpostavljenosti na 25 °C absorbanca DPPH v metanolu zniža kar za 20%. Kisik se v zraku nahaja v tripletnem stanju z bi-radikalnimi lastnostmi. Kisik lahko direktno reagira z DPPH pod vplivom svetlobe, posledično se absorbanca DPPH zmanjša. DPPH je prav tako občutljiv na Lewisove baze, različna topila ter pH (25). Raztopino DPPH smo zato po pripravi zaščitili pred svetlobo, jo dobro zamašili in jo hranili pri temperaturi 2-8 °C.

Pri DPPH testu se uporabljajo različna topila in različni pH-ji. Kot topilo za DPPH test smo uporabili metanol. Le-ta je za vrednotenje antioksidativne kapacitete najprimernejši, saj ne vpliva na reakcijo z DPPH, vse testirane spojine so v njem dobro topne ter daje višjo absorbanco kot etanol, kar vpliva na boljšo občutljivost (24).

Pri DPPH testu so rezultati z absorbanco višji od 1 netočni in izven merilnega območja spektrofotometra, zato so najprimernejše koncentracije DPPH od 25 do 70 µM. Vendar pa se v študijah uporabljajo različne koncentracije DPPH tudi do 250 µM (24). Inkubacijski časi so običajno od 5 minut do 1 ure, v večini študij je inkubacijski čas 30 minut (22). Pri eksperimentalnem delu smo zato uporabili koncentracijo DPPH 70 µM (koncentracija v končni reakcijski zmesi) ter določali vrednosti EC₅₀ po inkubacijskem času 30, 60 in 90 minut.

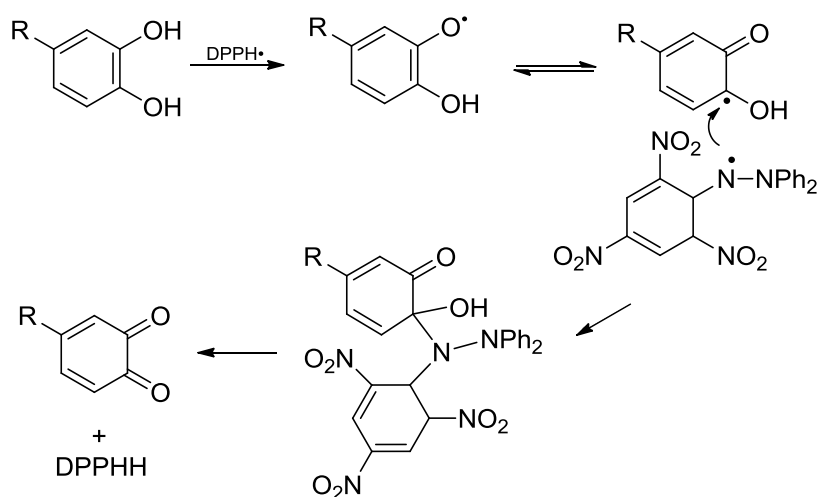
Na sliki 28 so prikazane vrednosti EC₅₀ za osem testiranih spojin in α-tokoferol po 60 minutah. Spojinama **1** in **13** nismo mogli izračunati EC₅₀, saj pri testiranih koncentracijah nista reducirani DPPH, torej spojini tudi pri najvišjih testiranih koncentracijah ne delujeta kot antioksidanta. Absorbanca se je pri spojini **14** pri najvišji 750 µM koncentraciji po 60 minutah zmanjšala za približno 11%, kar je še vseeno premalo za izračun vrednosti EC₅₀, zato tudi ta spojina ne deluje kot antioksidant. Če spojina potrebuje kar nekaj minut, da *in vitro* reducira radikale, potem je njena uporaba *in vivo* nesmiselna zaradi kratke življenjske dobe reaktivnih zvrsti (31).

Testirane spojine bi lahko razporedili od največje (najnižji EC₅₀) do najmanjše (najvišji EC₅₀) antioksidativne kapacitete: spojina **3** = spojina **4** > α-tokoferol > spojina **9** > spojina **11** > spojina **8** > spojina **12** > spojina **10** > spojina **2**

Najnižjo vrednost EC₅₀ sta imeli spojini **3** in **4**, obe z EC₅₀ 7,6 µM pri 60 minutah. Ti dve spojini imata največjo antioksidativno kapaciteto, saj nižja kot je vrednost EC₅₀, večja je

antioksidativna kapaciteta (32, 33). Najmanjšo antioksidativno kapaciteto oziroma najvišjo vrednost EC_{50} pa je imela spojina **2** z EC_{50} 1086,9 μ M.

Spojina **1** v svoji strukturi ne vsebuje nobene fenolne -OH skupine, zato smo jo uporabili kot negativno kontrolo, in kot smo pričakovali, ne deluje kot antioksidant. Spojine **2**, **3** in **4** imajo v svojih strukturah po dve hidroksilni skupini, med seboj pa se razlikujejo le v položaju hidroksilnih skupin. Spojina **2** je imela vrednost EC_{50} 1086,9 μ M, spojini **3** in **4** pa 7,6 μ M. Spojina **2** s hidroksilnima skupinama na *orto* in *para* mestu ima nizko antioksidativno kapaciteto, spojina **3** ima hidroksilni skupini na *meta* ter *para* mestu, spojina **4** pa na *orto* in *meta* mestu. Spojini **3** in **4** izkazujeta najboljše antioksidativno delovanje, saj sta imeli ti dve spojini od vseh testiranih spojin najnižji EC_{50} , torej največjo antioksidativno kapaciteto.



Slika 29: Prikaz redukcije dveh molekul DPPH s spojino **3**

Fenoli (ArOH) lahko z DPPH reagirajo po dveh različnih mehanizmih, z direktno odtegnitvijo vodikovega atoma (HAT mehanizem) ali s prenosom elektrona iz ArOH ali fenoksidnega aniona (ArO⁻) na DPPH (SET mehanizem) (34). Nastali radikal je stabiliziran z delokalizacijo nesparjenega elektrona na fenilnem obroču. Ena molekula spojine **3** reducira dve molekuli DPPH s HAT mehanizmom, torej prenosom dveh vodikovih atomov iz hidroksilnih skupin (slika 29). Ena molekula spojine **4** lahko prav tako reducira dve molekuli DPPH. Položaj hidroksilnih skupin je eden izmed ključnih dejavnikov, ki vplivajo na antioksidativno kapaciteto (34). Hidroksilni skupini na *meta* in

para mestu ter *orto* in *meta* mestu tako bolj učinkovito reducirajo DPPH kot hidroksilni skupini na *orto* in *para* mestu.

Spojina **14** ne deluje kot antioksidant in se v strukturi od spojin **2**, **3** in **4** razlikuje le v tem, da ima samo eno hidroksilno skupino na *para* mestu. S tem smo potrdili, da poleg položaja hidroksilnih skupin na antioksidativno kapaciteto vpliva tudi število hidroksilnih skupin, saj spojina **14** z eno hidroksilno skupino ne deluje kot antioksidant. Ti rezultati sovpadajo s študijo Juan C. Morales in Ricardo Lucas, kjer so ravno tako dokazali, da spojine z dvema hidroksilnima skupinama na *meta* in *para* položaju izkazujejo veliko boljše antioksidativno delovanje kot spojine z eno hidroksilno skupino (35).

Spojina **8** z EC_{50} 603,5 μ M ima v strukturi eno metoksi skupino na *meta* mestu ter hidroksilno skupino na *para* mestu. Kljub temu, da ima ta spojina le eno hidroksilno skupino, deluje kot antioksidant. Vzrok za to je najverjetneje metoksi skupina na *meta* mestu, saj le-ta zveča sposobnost prenosa vodikovega atoma ter posledično antioksidativno kapaciteto. Metoksi skupina je namreč elektron donorska, kar prispeva k stabilizaciji fenoksilnega radikala (35).

Spojina **9** ima za razliko od spojine **8** stiril namesto fenila, obe pa imata na *meta* mestu metoksi ter na *para* mestu hidroksilno skupino. Spojina **9** ima EC_{50} 32,9 μ M in zato veliko večjo antioksidativno kapaciteto kot spojina **8** z EC_{50} 603,5 μ M. V tem primeru torej stiril zveča antioksidativno kapaciteto. Vendar pa je pri spojini **9** ključnega pomena tudi metoksi skupina na *meta* položaju. Spojina **13** namreč v svoji strukturi ravno tako vsebuje stiril, a brez metoksi skupine in s hidroksilno skupino na *meta* mestu, vendar ne deluje kot antioksidant. Torej je pri spojini **9** izrednega pomena tako stirenska kot tudi metoksi skupina na *meta* mestu, saj najverjetneje obe prispevata k stabilizaciji nastalega radikala.

Spojina **10** ima dve metoksi skupini na *meta* mestu ter hidroksilno skupino na *para* mestu. Vendar pa ima spojina **10** z EC_{50} 854,5 manjšo antioksidativno kapaciteto kot spojina **8**, torej imata ena hidroksilna skupina na *para* ter metoksi skupina na *meta* mestu večjo sposobnost redukcije kot ena hidroksilna skupina z dvema metoksi skupinama. Prav tako se tukaj pojavi večja sterična oviranost hidroksilne skupine.

Če pri spojini **8** na *meta* mestu metoksi skupino zamenjamo z etoksi skupino, dobimo spojino **11**. Le-ta ima vrednost EC_{50} 572,6 μ M, ki je nekoliko nižja od vrednosti pri spojini

8. V študiji P. Venkatesan in M.N.A. Rao se je po zamenjavi metoksi skupine z etoksi skupino ravno tako antioksidativna kapaciteta izboljšala (36).

Spojina **12** z EC_{50} 750,8 μ M pa se od ostalih testiranih spojin razlikuje v tem, da ne vsebuje fenilnega obroča, saj ima hidroksilno ter metoksi skupino vezani na kinazolinonski obroč. Izkazuje manjšo antioksidativno kapaciteto kot večina testiranih spojin z elektron donorskimi skupinami vezanimi na fenilnih obročih.

Z DPPH testom smo ovrednotili *in vitro* antioksidativno kapaciteto izbranih spojin. Reducenti radikalov lahko znižajo absorbanco DPPH, vendar ni nujno da *in vivo* učinkovito donirajo vodikov atom peroksilnim radikalom, zato je priporočena uporaba in primerjava z dobro znanimi, standardnimi antioksidanti, kot je na primer α -tokoferol (25, 34). Z uporabo α -tokoferola pa smo tudi preverili, če je izbrana metoda ustrezna.

V literaturi se vrednosti EC_{50} za α -tokoferol razlikujejo in so odvisne od pogojev testiranja. V našem primeru je bil EC_{50} za α -tokoferol 14,2 μ M, kar je podobno kot v študiji Krishnanand Mishra et al., kjer je bila vrednost EC_{50} za α -tokoferol 12,7 μ M ter 11,61 μ M v študiji Haj-Hamdo Housam et al. (22, 27). Spojini **3** in **4** imata večjo antioksidativno kapaciteto kot α -tokoferol, saj je njun EC_{50} še enkrat manjši kot EC_{50} α -tokoferola, spojine **8**, **9**, **10**, **11** in **12** pa imajo veliko manjšo antioksidativno kapaciteto kot α -tokoferol. Namreč, α -tokoferol reagira z DPPH v razmerju 1:2, kar pomeni, da ena molekula α -tokoferola reducira 2 molekuli DPPH. Reakcija α -tokoferola z DPPH poteče v dveh korakih. V prvem koraku ena molekula α -tokoferola reagira z eno molekulo DPPH, nastane α -tokoferoksilni radikal, ki nato reagira še z eno molekulo DPPH in nastane α -tokoferol kinon (16).

Lovljenje radikalov pri fenolnih spojinah je odvisno od številnih dejavnikov. Poleg števila in položaja hidroksilnih skupin je pomembna celotna struktura antioksidanta (prisotnost ostalih elektron donorskih in privlačnih skupin) ter zmožnost stabilizacije nastalega radikala (37).

Ključnega pomena je tudi stehiometrija, število, ki pove, koliko molekul radikala je reducirala ena molekula antioksidanta. To število je odvisno od strukture antioksidanta in mehanizma reakcije. Več kot je hidroksilnih skupin, večja je stehiometrija. Vendar pa v mnogih primerih ne velja, da fenolne spojine reducirajo toliko DPPH molekul, kot imajo

hidroksilnih skupin, saj na stehiometrijo vplivajo še ostali dejavniki, kot sta sterična oviranost oziroma izpostavljenost hidroksilnih skupin ter njihov položaj (34).

Spojini **3** in **4** zaradi nizke EC_{50} vrednosti in visoke antioksidativne kapacitete predstavljata potencialna antioksidanta. Nekatere spojine, kot sta spojini **3** in **4**, reagirajo hitro z DPPH, vendar pa veliko spojin reagira počasi, mehanizmi pa so kompleksni. Večje, kot je število in kompleksnost obročev, počasnejše so reakcije. Antioksidati se morajo pravilno orientirati proti nesparjenemu elektronu, ki se nahaja v središču molekule DPPH, saj je leta v določeni meri sterično oviran v primerjavi z *in vivo* reaktivnimi zvrstmi, zato so reakcije antioksidantov z reaktivnimi zvrstmi *in vivo* veliko hitrejše (31). Torej ni nujno, da se *in vitro* antioksidativno delovanje *in vivo* odraža v isti meri, zato bi za ti dve spojini bilo potrebno izvesti še ostale metode za ugotavljanje antioksidativnega delovanja (34).

6. SKLEP

V magistrski nalogi smo s postopkom aerobne oksidativne ciklizacije v DMSO sintetizirali štiri 2-kinazolinone kot potencialne antioksidante. Nato smo s pomočjo DPPH testa enajstim spojinam in standardu α -tokoferolu ovrednotili antioksidativne kapacitete in vpliv struktur molekul na antioksidativne kapacitete.

- Največjo antioksidativno kapaciteto izkazujeta derivata z dvema prostima hidroksilnima skupinama na *meta* in *para* mestu ter *orto* in *meta* mestu: spojini **3** in **4**, ki lahko donirata 2 vodikova atoma in s tem nevtralizirata 2 molekuli DPPH.
- Spojini **13** in **14** imata le eno prosto hidroksilno skupino in ne delujeta kot antioksidanta, zato lahko sklepamo, da na antioksidativno kapaciteto vpliva število hidroksilnih skupin. Večje, kot je število hidroksilnih skupin, večja je antioksidativna kapaciteta.
- Na antioksidativno kapaciteto poleg števila vpliva tudi mesto, na katerega je vezana hidroksilna skupina. Spojine **2**, **3** in **4** imajo vsaka po dve hidroksilni skupini, vendar ima spojina **2** veliko manjšo antioksidativno kapaciteto kot ostali dve spojini.
- Na podlagi primerjav vrednosti EC_{50} spojin **8**, **10** in **14** smo ugotovili, da na antioksidativno kapaciteto vpliva tudi prisotnost metoksi skupin. Pri spojini z eno hidroksilno skupino prisotnost ene metoksi skupine zveča antioksidativno kapaciteto, saj le-ta zveča sposobnost prenosa vodikovega atoma in prispeva k stabilizaciji nastalega radikala. Prisotnost dveh metoksi skupin pa nekoliko zmanjša antioksidativno kapaciteto v primerjavi z eno metoksi skupino, verjetno zaradi steričnega oviranja.
- Pri primerjavi spojin **8** in **9** zamenjava fenilnega obroča s stirilom izredno zveča antioksidativno kapaciteto, pri spojinah **8** in **11** pa je zamenjava metoksi skupine z etoksi skupino antioksidativno kapaciteto le malenkost zvečala.

7. LITERATURA

1. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y: Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 2011; 21(10): 569-576.
2. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 138-274.
3. Rahman K: Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2007; 2(2) 219–236.
4. Pečar S: Radikali v našem okolju. *Kemija v šoli* 2006; 18(2): 26-30.
5. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393-406.
6. Rahal A, et al.: Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International* 2014: 1-19.
7. Mattera R, Benvenuto M, Giganti M G, Tresoldi I et al.: Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes. *Nutrients* 2017; 9(5) (<http://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/523>, dostopano 7.9.2017).
8. Gutowski M: A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol* 2013; 60(1): 1-16.
9. Myburgh K M: Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress?. *Sports Med* 2014; 44(1): 57-70.
10. Pizzino G, Irrera N, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Bitto A et al.: Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 (<https://doi.org/10.1155/2017/8416763>, dostopano: 4.9.2017).
11. Pisoschi A M, Negulescu G P: Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochem & Anal Biochem* 2011; 1(1): 1-10.
12. Jones D P: Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(4): 849-868.
13. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. *Farm Vestn* 2015 66: 127-132.
14. Rakesh K P, Manukumar H M, Channe Gowda D: Schiff's bases of quinazolinone derivatives: Synthesis and SAR studies of a novel series of potential anti-inflammatory and antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25(5): 1072–1077.
15. https://www.researchgate.net/publication/40895322_Measurement_of_superoxide_dismutase_catalase_and_glutathione_peroxidase_in_cultured_cells_and_tissue, dostopano: 17.9.2017.

16. Khanduja K L, Bhardway A: Stable free radical scavenging and antiperoxide properties of resveratrol compared *in vitro* with some other bioflavonoids. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2003; 40: 416-422.
17. Priya M G R, Giriya K , Ravichandran N: In vitro study of anti-inflammatory and antioxidant activity of 4-(3H)-quinazolinone derivatives. *J Chem* 2011; 4(2): 418-424.
18. Asif M: Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *Int J Med Chem* 2014; 2014.
19. Theivendren P S, Palanirajan V K: Quinazoline marketed drugs – a review. *Research in Pharmacy* 2011; 1(1) : 1-21.
20. <https://en.wikipedia.org/wiki/Quinazoline>, dostopano: 11.7.2017.
21. Na Yeun K, Cheol-Hong C: Synthesis of quinazolinones from anthranilamides and aldehydes via metal-free aerobic oxidation in DMSO. *Tetrahedron Lett* 2014; 55(15): 2340–2344.
22. Krishnanand M, Himanshu O, Nabo Kumar C: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem* 2012; 130(4): 1036-1043.
23. Moharram H A, Youssef M M: Methods for determining the antioxidant activity: A Review. *Alex J Fd Sci & Techno* 2014; 11(1): 31-42.
24. Sharma O P, Bhat T K: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 2009; 113(4): 1202– 1205.
25. Ozcelik B, Lee J H, Min D B: Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 2003; 68(2): 487–490.
26. Chen Z, Bertin R, Frolidi G: EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem* 2013; 138(1): 414-420.
27. Haj-Hamdo H, Khayata W, Al-Assad Z: Estimating the antioxidant activity for natural antioxidants (tocochromanol) and synthetic one by dpph. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014; 6(5): 975-1491.
28. Rihtarič M: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev in krčnic s transmisijsko infrardečo spektroskopijo: diplomska naloga (Ljubljana, 2010) (http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2010/Rihtaric_Metka_dipl_nal_2010.pdf, dostopano 5.8.2017).
29. <https://support.office.com/en-us/article/STEYX-function-6ce74b2c-449d-4a6e-b9ac-f9cef5ba48ab>, dostopano 19.10.2017

30. https://en.wikipedia.org/wiki/Baldwin%27s_rules, dostopano 22.2.2017.
31. Schaich K M, Tian X, Xie J: Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional food* 2015; 14: 111-125.
32. https://www.academia.edu/9427761/Determination_of_Inhibition_Activity_of_the_Antioxidants_Ascorbic_Acid_and_%CE%B1-Tocopherol_Using_DPPH_Assay, dostopano 3.8.2017.
33. Sharma P, Dudhe P, Kumar A: Synthesis and evaluation of antioxidant properties of some synthesized quinazoline and 1,4-diazepine derivatives. *Journal of Pharmacy Research* 2014; 8(10): 1355-1363.
34. Villaño D, Fernandez-Pachon M S et al.: Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007; 71(1): 230-235.
35. http://www.gustosalutequalita.it/it/repository/Morales_EVOO_antioxidants.pdf, dostopano 13.10.2017.
36. Venkatesan P, Rao M N A: Structure activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 1123-1128.
37. Moukette B, Pieme C A, et al.: In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: *Monodora myristica*. *Biol Res* (2015) 48(1): 15.