

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARA SLAVEC  
**MAGISTRSKA NALOGA**  
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARA SLAVEC

**SINTEZA IZBRANIH KINAZOLINONOV TER VREDNOTENJE  
NJIHOVE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE IN SPOSOBNOSTI  
KELACIJE KOVINSKIH IONOV**

**SYNTHESIS OF SELECTED QUINAZOLINONES AND EVALUATION  
OF THEIR ANTI-OXIDATIVE CAPACITY AND ABILITY OF  
CHELATING METAL IONS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

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

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za vso strokovno pomoč, nasvete in usmerjanje pri opravljanju eksperimentalnega dela ter pisanju magistrske naloge.

Posebno se zahvaljujem tudi vsem svojim bližnjim za podporo, spodbudo in potrpljenje med nastajanjem magistrske naloge.

## IZJAVA

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

Lara Slavec

Ljubljana, 2018

Komisija za zagovor magistrske naloge:

Predsednik:izr. prof. dr. Milan Skitek

Mentor:izr. prof. dr. Janez Mravljak

Član:asist. dr. Nejc Horvat

# KAZALO VSEBINE

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. REAKTIVNE ZVRSTI</b> .....	1
1.1.1. Nastanek reaktivnih zvrsti.....	2
1.1.2. Fiziološka vloga reaktivnih zvrsti.....	3
<b>1.2. OKSIDATIVNI STRES</b> .....	3
1.2.1. Oksidativne poškodbe bioloških molekul.....	4
1.2.2. Posledice oksidacije bioloških molekul.....	6
1.2.3. Merjenje oksidativnega stresa.....	7
<b>1.3. ANTIOKSIDANTI</b> .....	8
1.3.1. Kelatorji železovih in bakrovih ionov.....	9
1.3.2. Fenolni in polifenolni antioksidanti.....	11
1.3.3. Kinazolini in kinazolinoni.....	12
<b>1.4. METODE DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE</b> .....	13
1.4.1. Test redukcije DPPH radikala.....	14
1.4.2. UV-Vis spektrofotometrična titracija spojin z bakrom(II) in železom(II).....	15
<b>2. NAMEN IN POTEK DELA</b> .....	16
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	17
<b>3.1. TOPILA IN REAGENTI</b> .....	17
3.1.1. Topila in reagenti za sintezo 2-substituiranih 4(3 <i>H</i> )-kinazolinonov.....	17
3.1.2. Topila in reagenti za test redukcije DPPH radikala in UV-Vis spektrofotometrično titracijo spojin z bakrom(II) in železom(II).....	17
<b>3.2. SPOJINE</b> .....	18
<b>3.3. MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATURE</b> .....	20
<b>3.4. METODE IN RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA</b> .....	21
3.4.1. Poimenovanje in risanje spojin.....	21
3.4.2. Tankoplastna kromatografija (TLC).....	21
3.4.3. Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	21
3.4.4. Masna spektrometrija (MS).....	21
3.4.5. Infrardeča spektroskopija (IR).....	22
3.4.6. Test redukcije DPPH radikala.....	22
3.4.7. UV-Vis spektrofotometrična titracija spojin z bakrom(II) in železom(II).....	22
<b>4. EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	23
<b>4.1. SINTEZA SPOJIN</b> .....	23

<b>Splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3<i>H</i>)-kinazolinonov .....</b>	<b>23</b>
4.1.1. Sinteza 2-(2-hidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (1).....	23
4.1.2. Sinteza 2-(3-hidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (2).....	24
4.1.3. Sinteza 2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (3) .....	25
4.1.4. Sinteza 2-(2-hidroksi-5-metoksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (4) .....	26
4.1.5. Sinteza 2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (5) .....	27
4.1.6. Poskus sinteze 2-(2,3,4-trihidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (6).....	29
4.1.7. Poskus sinteze 2-(2,4,5-trihidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-ona (7).....	29
<b>4.2. ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST REDUKCIJE DPPH RADIKALA.....</b>	<b>30</b>
4.2.1. Priprava raztopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) .....	30
4.2.2. Priprava raztopin spojin in standarda .....	30
4.2.3. Izvedba testa redukcije DPPH radikala .....	31
4.2.4. Izračun vrednosti EC <sub>50</sub> .....	32
<b>4.3. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA TITRACIJA SPOJIN Z BAKROM(II) IN ŽELEZOM(II).....</b>	<b>33</b>
4.3.1. Priprava pufra .....	33
4.3.2. Priprava osnovnih raztopin spojin.....	33
4.3.3. Priprava osnovne raztopine Cu <sup>2+</sup> in Fe <sup>2+</sup> ionov.....	33
4.3.4. Izvedba UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z bakrom(II) in železom(II) .....	34
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1. KOMENTAR SINTEZE 2-SUBSTITUIRANIH 4(3<i>H</i>)-KINAZOLINONOV ..</b>	<b>36</b>
<b>5.2. ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST REDUKCIJE DPPH RADIKALA.....</b>	<b>38</b>
5.2.1. Standard kvercetin.....	39
5.2.2. Testirane spojine .....	42
5.2.3. Komentar rezultatov redukcije DPPH radikala .....	46
<b>5.3. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA TITRACIJA SPOJIN Z BAKROM(II)   IN ŽELEZOM(II).....</b>	<b>50</b>
5.3.1. Testirane spojine .....	50
5.3.2. Komentar rezultatov UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z bakrom(II) in železom(II).....	57
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>60</b>

## POVZETEK

V zadnjih letih se vse bolj zavedamo negativnih posledic oksidativnega stresa. O oksidativnem stresu govorimo, ko se poruši ravnovesje med nastajanjem reaktivnih zvrsti in sposobnostjo biološkega sistema za njihovo odstranjevanje. Za nadzor ravnovesja med oksidacijami in redukcijami skrbijo antioksidanti. Ti reagirajo z reaktivnimi zvrstmi, preprečijo pojav verižnih radikalskih reakcij in s tem nastanek oksidativnih poškodb bioloških molekul. Številne raziskave so pokazale, da so kinazolinoni po uvedbi hidroksilnih skupin na aromatski obroč učinkoviti antioksidanti. V magistrski nalogi smo iz antranilamida in izbranih hidroksibenzaldhidov sintetizirali različne 2-substituirane 4(3*H*)-kinazolinone. Za sintezo teh fenolnih spojin smo uporabili enostaven in okolju prijazen postopek aerobne oksidativne ciklizacije v dimetil sulfoksidu (DMSO). Nato smo z uporabo dveh različnih testov preverili antioksidativno kapaciteto šestih kinazolinonov (petih sintetiziranih spojin in ene spojine s podobno kemijsko strukturo). Najprej smo z 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilnim (DPPH) testom preučili antioksidativno sposobnost kinazolinonov za redukcijo DPPH radikala in za primerjavo uporabili polifenolni standard kvercetin. Z analizo rezultatov smo ugotovili, da so testirane spojine mnogo slabši antioksidanti kot standard kvercetin. Na sposobnost spojin za redukcijo radikalov vpliva število in položaj hidroksilnih skupin. Spojine z eno hidroksilno skupino, vezano na različnih mestih aromatskega obroča, ne reducirajo DPPH radikala, kar pomeni, da ena hidroksilna skupina (ne glede na položaj) ni dovolj za redukcijo radikalov. Z uvedbo metoksi skupine na fenolni obroč se antioksidativna kapaciteta lahko znatno poveča. To je odvisno od položaja metoksi skupine glede na hidroksilno skupino. Pomemben mehanizem antioksidativnega delovanja je tudi kelacija bakrovih in železovih ionov. Kinazolinonom smo z UV-Vis spektrofotometrično titracijo preverili sposobnost kelacije kovinskih ionov. Ugotovili smo, da so spojine s hidroksilno skupino, vezano v neposredni bližini karbonilne skupine, sposobne tvorjenja šibkih kompleksov z  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  v različnih molarnih razmerjih. Spojine s hidroksilnimi skupinami, vezanimi na mestih, ki so od karbonilne skupine preveč oddaljena, pa s kovinskim ionom niso zmožne tvorjenja koordinacijskih vezi. Čeprav bi bila za zanesljivo določanje celokupne antioksidativne kapacitete spojin potrebna uporaba več različnih metod, lahko z rezultati dveh osnovnih testov zaključimo, da so nekatere testirane spojine obetavni antioksidanti in bi lahko bile uporabne za preprečevanje oksidativnega stresa.

**Ključne besede:** kinazolinoni, antioksidanti, DPPH, kelacija železovih in bakrovih ionov

## ABSTRACT

In recent years, we are becoming more aware of the negative effects of oxidative stress. We talk about oxidative stress when there is an imbalance between the formation of reactive species and the ability of the biological system to remove them. Antioxidants play a major role in controlling the balance between oxidations and reductions. They react with reactive species, prevent free radical chain reactions and thus the formation of oxidative damage to biological molecules. Many studies have shown that quinazolinones become effective antioxidants after adding hydroxyl groups on their aromatic ring. In this master's thesis, we synthesized various 2-substituted 4-(3*H*)-quinazolinones from antranilamide and selected hydroxybenzaldehydes. For the synthesis of these phenolic compounds, a simple and environmentally friendly procedure of aerobic oxidative cyclization in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used. Using two different tests, we evaluated the antioxidative capacity of six quinazolinones (five synthesized compounds and one compound with a similar chemical structure). First, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was used to examine the antioxidative ability of quinazolinones to reduce the DPPH radical. The results were compared with polyphenolic standard quercetin. We discovered that tested compounds are not as good antioxidants as the standard quercetin. The ability of the compounds for the reduction of radicals is influenced by the number and position of the hydroxyl groups. Compounds with a single hydroxyl group bound at different positions in the aromatic ring do not reduce DPPH radical, which means that one hydroxyl group (regardless of position) is not sufficient to reduce radicals. By introducing a methoxy group on the phenolic ring, the antioxidant capacity can be substantially increased. This depends on the position of the methoxy group in relation to the hydroxyl group. An important mechanism of antioxidant action is the chelation of copper and iron ions. Chelation ability of quinazolinones was checked by UV-Vis spectrophotometric titration with metal ions. The results showed that compounds with a hydroxyl group bound in the immediate vicinity of a carbonyl group are capable of forming weak complexes with  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{2+}$  in different molar ratios. On the contrary, compounds with hydroxyl groups bound at sites that are too far from the carbonyl group are not capable of forming coordination bonds with metal ions. Although it would be necessary to use several methods in order to reliably determine the overall antioxidant capacity of the compounds, the results of two basic tests may conclude that some of the tested compounds are promising antioxidants and may be useful in preventing oxidative stress.

**Key words:** quinazolinones, antioxidants, DPPH, chelation of copper and iron ions

## SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
ATP	Adenozin trifosfat
CUPRAC	»Cupric reducing antioxidant capacity«
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
DPPH-H	1,1-difenil-2-pikril-hidrazin
EC <sub>50</sub>	50-odstotna efektivna koncentracija
FRAP	»Ferric reducing antioxidant power«
GSH	Glutation
IR	Infrardeča spektroskopija
MS	Masna spektrometrija
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NMR	Jedrska magnetna resonanca
ORAC	»Oxygen radical absorbance capacity«
R <sup>2</sup>	Koeficient determinacije
R <sub>f</sub>	Retencijski faktor
ROS	Reaktivne kisikove spojine
RNS	Reaktivne dušikove spojine
SOD	Superoksid dismutaza
TLC	Tankoplastna kromatografija



# 1. UVOD

## 1.1. REAKTIVNE ZVRSTI

Vse snovi (ioni, atomi, molekule ali kompleksi), ki imajo v svoji strukturi nesparjen valenčni elektron, imenujemo radikali. Ti so navadno nestabilni in kemično zelo reaktivni, saj težijo k pridobitvi manjkajočega elektrona z nasprotno usmerjenim spinom. Posledično ima večina radikalov tudi kratko življenjsko dobo (od  $\mu\text{s}$  do  $\text{ms}$ ). Stabilnost radikalov se poveča, če obstaja možnost delokalizacije njihovega nesparjenega elektrona ali ko je le-ta sterično oviran. Značilnost, ki velja za vse radikale, je tudi obarvanost (1). Radikali imajo paramagnetne lastnosti, saj ima elektron brez para magnetni moment in na orbitali povzroči nastanek lokalnega magnetnega polja. Stabilne radikale, ki so prisotni v zadostnih koncentracijah, lahko zaradi paramagnetizma neposredno zaznamo z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) (1).

Radikale in iz njih nastale neradikalske reaktivne snovi združujemo v skupine reaktivnih zvrsti, med katerimi sta najpomembnejši skupini: reaktivne kisikove spojine (ROS) in reaktivne dušikove spojine (RNS) (2). Predstavniki so naštet v preglednici I.

**Preglednica I:** Predstavniki ROS in RNS (1).

	<b>Radikali</b>	<b>Neradikali</b>
<b>ROS</b>	Superoksidni ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) Hidroksilni ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) Hidroperoksilni ( $\text{HOO}^{\bullet}$ ) Peroksilni ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) Alkoksilni ( $\text{RO}^{\bullet}$ )	Singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) Ozon ( $\text{O}_3$ ) Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Hidroperoksidi ( $\text{ROOH}$ ) Hipoklorna kislina ( $\text{HOCl}$ ) Peroksintrit ( $\text{ONOO}^-$ )
<b>RNS</b>	Dušikov oksid ( $^{\bullet}\text{NO}$ ) Dušikov dioksid ( $^{\bullet}\text{NO}_2$ )	Dušikovi oksidi ( $\text{N}_2\text{O}_3$ , $\text{N}_2\text{O}_4$ ) Dušikova(III) kislina ( $\text{HNO}_2$ ) Nitrozilni kation ( $\text{NO}^+$ ) Nitronijev anion ( $\text{NO}_2^-$ ) Alkilperoksinitrit ( $\text{ROONO}$ ) Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ )

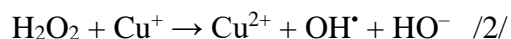
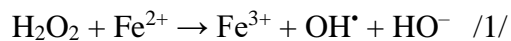
Radikali so produkti normalnega celičnega metabolizma. Reagirajo nespecifično in z odtegnitvijo elektrona bližnji spojini povzročijo nastanek novega radikala. V telesu na ta način sprožajo verižne radikalske reakcije. ROS in RNS so lahko koristne kot tudi toksične spojine za žive organizme. V primeru zmernih in nizkih koncentracij imajo ugodne učinke. Nasprotno pa visoke koncentracije ROS in RNS povzročajo oksidativni in nitrozativni stres (2).

### **1.1.1. Nastanek reaktivnih zvrsti**

Kopičenje radikalov v telesu lahko sprožijo tako endogeni kot tudi eksogeni dejavniki. Reaktivne zvrsti endogeno nastajajo v celični membrani in različnih celičnih organelih, kot so mitohondriji, peroksisomi, mikrosomi (endoplazemski retikulum) in drugi viri citosola (3). Nastajajo v spontanah enoelektronskih redoks reakcijah, avtooksidacijah, encimskih reakcijah, pri metabolizmu nekaterih snovi ali pri aktivaciji imunskega sistema. Reaktivni radikali reagirajo zelo hitro in praktično z vsako spojino, ki jo srečajo. Reakcija poteka po enem izmed naslednjih treh načinov: odtegnitev ali odvzem vodikovega atoma, adicija radikala na dvojno vez ali reakcija dveh radikalov (1). Endogeni dejavniki, ki povzročajo nastajanje reaktivnih zvrsti v telesu, so kronično vnetje, psihični stres, prekomerna telesna aktivnost in metabolizem nekaterih ksenobiotikov (paracetamola, doxorubicina itd.), hrane (dimljenega mesa, nasičenih maščobnih kislin itd.) ter alkohola. Med eksogene dejavnike, ki vplivajo na pojav nenadzorovanih oksidacij, pa štejemo elektromagnetna sevanja (ultravijolična svetloba, ionizirajoče sevanje), ultrazvok, izpostavljenost visokim temperaturam, pesticidom, težkim kovinam (Fe, Cu, Co, Cr) in vdihavanje ozona ter cigaretnega dima (2).

Večina znotrajceličnih reaktivnih zvrsti nastane v mitohondriju. Tam v procesu oksidativne fosforilacije nastaja življenjsko pomembna energija v obliki ATP (adenozin trifosfata). Proces poteka na notranji membrani mitohondrija, kjer je v obliki respiratornih proteinskih kompleksov (I, II, III, IV) nameščena veriga za prenos elektronov. V normalnih fizioloških pogojih se lahko na dveh mestih verige, na kompleksu I in III, elektroni vežejo tudi na okoliški kisik. Pri tem v reakciji enoelektronske redukcije nastaja superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ). Čeprav  $O_2^{\cdot-}$  ni močen oksidant, je predhodnik večine reaktivnih kisikovih zvrsti in sodeluje pri širjenju verižnih oksidativnih reakcij (4).

Pomemben način tvorbe reaktivnih radikalov v organizmu je tudi Fentonova reakcija, v kateri nastaja eden najmočnejših oksidantov v naravi, hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Fentonova reakcija poteče v primeru, ko so v organizmu prisotni prosti kovinski ioni ( $Fe^{2+}$  ali  $Cu^+$ ), ki reagirajo z vodikovim peroksidom /1, 2/ (2).



### **1.1.2. Fiziološka vloga reaktivnih zvrsti**

Reaktivne zvrsti v človeškem telesu nastajajo neprestano in pri tem oksidirajo organske sestavine celic. V primeru, ko oksidacije potekajo v omejenem obsegu, imajo reaktivne zvrsti pozitivne (fiziološke) učinke in so nujno potrebne za prilagajanje organizma na zunanje okolje (prehrana, koncentracija kisika v zraku, temperatura itd.) (1, 6).

Organizem reaktivne zvrsti uporablja za obrambo pred patogeni. Aktivirani nevtrofilci in makrofagi pridelajo velike količine reaktivnih zvrsti (5, 6). Za to je zaslužna fagocitna izooblika nikotinamid dinukleotid fosfat (NAD(P)H) oksidaze, ki katalizira reakcijo nastanka superoksida, predhodnika številnih drugih reaktivnih zvrsti (1, 5). V primeru vdora patogenih mikroorganizmov v telo fagociti sprostijo reaktivne zvrsti in tako predstavljajo prvi imunski odziv v boju proti tujkom (5, 6). Pri ljudeh z granulomatozno boleznijo je sistem NAD(P)H oksidaz okvarjen, kar povzroči pojav ponavljajočih in dolgotrajnih okužb (6). Radikali so udeleženi tudi v procesih celične signalizacije. Poleg fagocitov tudi druge celice proizvajajo ROS preko NAD(P)H oksidaze. Primer so fibroblasti, žilne gladkomišične celice, endotelijske celice in srčni miociti, ki reaktivne zvrsti uporabljajo za znotrajcelično signalizacijo in posledično uravnavanje celičnih funkcij srca in ožilja (5). Najbolj raziskan radikal, ki ima vlogo signalne molekule, je dušikov oksid. Ima pomembno funkcijo pri zagotavljanju ustreznega krvnega tlaka in normalnega delovanja živčevja, vključen pa je tudi v procese strjevanja krvi in imunski odziv na patogene. Številne reaktivne zvrsti delujejo mitogeno, kar vodi v proliferacijo in daljše preživetje celic. Radikali so tako pri nizkih oz. zmernih koncentracijah ključnega pomena za zdravje ljudi (6).

### **1.2. OKSIDATIVNI STRES**

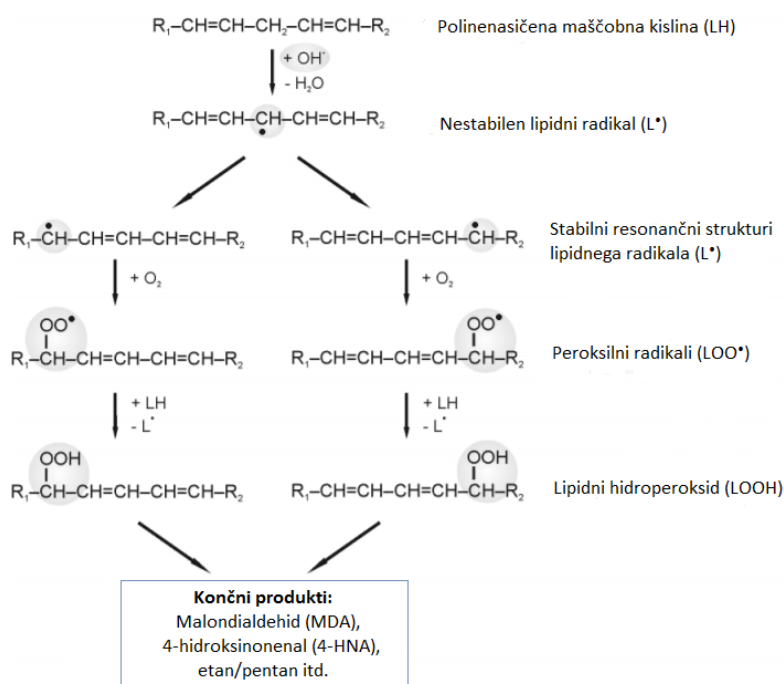
Oksidativni stres je vsako stanje v celici ali tkivu, kjer se poruši ravnovesje med nastajanjem reaktivnih zvrsti in sposobnostjo biološkega sistema za njihovo odstranjevanje. Pri zdravem človeku za nadzor ravnovesja med oksidacijami in redukcijami skrbijo antioksidanti. V primeru, da se pojavi motnja v ravnovesju med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih, začnejo prevladovati oksidativni procesi, to pa vodi v nastanek škodljivih znotrajceličnih procesov in do razvoja patoloških sprememb celic in tkiv (1).

## 1.2.1. Oksidativne poškodbe bioloških molekul

Porast reaktivnih zvrsti vodi do nastanka znotrajceličnega oksidativnega stresa. Nekateri predstavniki ROS in RNS reagirajo zelo hitro in praktično s katerokoli spojino, ki jo srečajo. Tako sprožajo nenadzorovane oksidacije, ki lahko poškodujejo različne celične komponente, med katerimi so najpomembnejše: lipidi, nukleinske kisline in proteini (1).

### - Oksidativne poškodbe lipidov

Večina celičnih lipidov je v bioloških membranah (1). Tam reaktivni radikali sprožajo oksidacijo polinenasičenih maščobno-kislinskih ostankov fosfolipidov oziroma lipidno peroksidacijo (slika 1). Ta oslabi membransko funkcijo, in sicer zmanjša njeno fluidnost in elastičnost ter inaktivira membranske encime in receptorje. *In vivo* je lipidna peroksidacija vpletena v mehanizme nastanka številnih patoloških stanj, kot so kardiovaskularna obolenja (ateroskleroza), rak, neurodegenerativne bolezni in staranje (2).



**Slika 1:** Shematski prikaz lipidne peroksidacije (prirejeno po 5).

Lipidna peroksidacija poteka v več fazah. Začetek verižne reakcije predstavlja *faza iniciacije*. Radikal odvzame vodikov atom iz metilenske skupine ( $-CH_2-$ ) maščobne kisline (LH) in povzroči nastanek na ogljik osredotočenega lipidnega radikala ( $L^\bullet$ ). S premeščanjem prostega elektrona lipidni radikal zavzema različne resonančne strukture in tako ohranja stabilnost (2).

Lipidni radikal nato v *fazi propagacije* reagira z molekularnim kisikom ( $^3\text{O}_2$ ). Nastane lipidni peroksilni radikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ), ki lahko v naslednjem koraku odtegne vodikov atom novi maščobni kislini. Produkt reakcije je lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ) in nov na ogljik osredotočen lipidni radikal ( $\text{L}^\bullet$ ). Dogodki se začnejo verižno ponavljati, pri čemer neprestano nastajajo novi radikali (1).

*Faza terminacije* nastopi, ko je koncentracija radikalov dovolj visoka, da dva radikala reagirata med seboj in povzročita nastanek neradikalskih spojin. V živih organizmih lipidno peroksidacijo zaustavljajo antioksidanti in vse druge reakcije, ki reaktivne radikale odstranjujejo iz procesa oksidacije. Do terminacije pa pride tudi v primeru, ko se v membrani zmanjša koncentracija kisika (1).

Končni produkti lipidne peroksidacije so reaktivni aldehidi, ki nastanejo iz reaktivnega hidroperoksida. Primer sta malondialdehid (MDA) in 4-hidroksinonenal (4-HNA), ki sta toksična in povzročata poškodbe DNA in proteinov (2).

#### - Oksidativne poškodbe proteinov

Reaktivni radikali v proteinih oksidirajo predvsem stranske verige različnih aminokislin, lahko pa tudi peptidno ogrodje (1). Posledica je kovalentno povezovanje med proteini, kar povzroči bodisi denaturacijo ali izgubo funkcije encimov, receptorjev in transportnih proteinov (2).

Aminokisliline, ki vsebujejo tiolne skupine (metionin in cistein), so najbolj občutljive na oksidacijo. Pri tem nastanejo disulfidi in metionin sulfoksidi, ki spremenijo konformacijo proteina in jim tako onemogočijo delovanje. Lahko sodelujejo tudi pri redoks signaliziranju (2).

Oksidativne poškodbe aminokislinskih ostankov, kot so lizin, prolin, treonin in arginin, vodijo do nastanka reaktivnih karbonilnih derivatov. Reakcijo najpogosteje katalizirajo kovinski ioni. Karbonilni derivati povzročijo spremembo konformacije, v nekaterih primerih celo fragmentacijo peptidne verige. To pripelje do delne ali popolne inaktivacije proteinov in spremembe celičnih funkcij. Prisotnost karbonilnih proteinov je najpomembnejši biomarker proteinske oksidacije (5).

Oksidirani proteini prispevajo k poškodbam ostalih celičnih komponent (DNA in lipidov), saj vplivajo na regulacijo in izražanje genov ter sprožajo lipidno peroksidacijo (1). Kljub temu v celici obstaja veliko mehanizmov, ki poškodovane proteine odstranjujejo, zato vse našete poškodbe za celico največkrat niso smrtonosne (5).

## - Oksidativne poškodbe DNA

Reaktivne zvrsti lahko neposredno poškodujejo tudi nukleinske kisline. Raziskave so pokazale, da je mitohondrijska DNA v primerjavi z jedrno DNA bolj podvržena oksidativnim poškodbam. Verjetno je vzrok v tem, da je mitohondrij glavno mesto nastanka ROS v celici. Poleg tega mitohondrijska DNA ni zaščitena s histoni in nima dovolj učinkovitih popravljalnih mehanizmov (5).

ROS, med katerimi je najpomembnejši hidroksilni radikal, neposredno reagirajo z vsemi komponentami DNA. Poškodujejo tako purinske (A, G) in pirimidinske (C, T) baze kot tudi deoksiribozni sladkor (5). Oksidacija na sladkorju lahko povzroči odcep nukleinske baze, kar vodi do pretrganja DNA verige ali pa do kovalentne vezave med DNA in proteini. V nekaterih primerih se lahko kovalentno povežejo tudi komponente znotraj DNA, kar povzroči križno premreženje molekule. Med bazami je gvanin najbolj dovzeten za oksidativne poškodbe, zato je produkt oksidacije gvanina, 8-oksogvanin, najpomembnejši bioznačevalec oksidativnih poškodb DNA (1). Opisane spremembe DNA vodijo v nastanek mutacij, kromosomsko nestabilnost in na koncu v celično smrt (5).

### 1.2.2. Posledice oksidacije bioloških molekul

Posledice oksidativnega stresa pri človeku postanejo vidne šele ob pojavu različnih patoloških stanj. Čeprav povišane vrednosti reaktivnih zvrsti niso prvotni vzrok nastanka bolezni, njihova prisotnost sproža verižne radikalske reakcije, ki poškodujejo biološke molekule, celice in tkiva (3). Oksidativni stres je tako vpleten v patogenezo številnih bolezni. Z njim povezujemo nevrodegenerativne bolezni, kardiovaskularne bolezni, raka, sladkorno bolezen, kronično vnetje, katarakto, astmo, revmatoidni artritis, opekline, gastrointestinalne bolezni idr (2). Pospešeno je tudi staranje (3).

Reaktivne zvrsti nastopajo pri *procesu staranja*. Z leti se v telesu kopičijo oksidativne poškodbe bioloških molekul, kar oslabi normalno funkcijo celic. S staranjem organizem ni več sposoben nevtralizirati reaktivnih radikalov in obvladovati oksidativnega stresa (5).

Centralni živčni sistem je zaradi visoke porabe kisika, vsebnosti lipidov in nizkih vrednosti encimov antioksidantov posebno občutljiv na delovanje oksidantov. Reaktivne zvrsti povzročijo lipidno peroksidacijo, kar vodi do postopne izgube membranske fluidnosti, zmanjšanega membranskega potenciala in povečane prepustnosti membrane za ione ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Stanje oksidativnega stresa v možganih je vpleteno v številne *nevrodegenerativne bolezni*:

Parkinsonovo bolezen, Huntingtonovo bolezen, lateralno amiotrofično sklerozo (ALS) in multiplo sklerozo (MS) (2).

Reaktivne zvrsti lahko s povzročanjem kemijskih sprememb na DNA delujejo mutageno. Tako so vpletene v etiologijo *rakavih bolezni*. Rakave celice imajo v primerjavi z normalnimi celicami višje vrednosti ROS. Vzrok za nastanek oksidativnega stresa je predvsem aktivacija onkogenov in zmanjšano delovanje tumor supresorskih genov. ROS vplivajo na rastne faktorje in izražanje genov, kar vodi v pospešeno proliferacijo rakavih celic (2).

Radikali imajo pomembno vlogo tudi pri razvoju številnih *srčno-žilnih bolezni*. Ti z oksidacijo lipoproteinov majhne gostote (LDL) sprožajo lipidno peroksidacijo. Posledica je kopičenje oksidirane LDL v notranjem sloju žilne stene (endoteliju), kar povzroči vnetni odziv, agregacijo trombocitov in začetek ateroskleroze (3).

Oksidativni izbruh, ki ga povzročijo nevtrofilci in makrofagi ob obrambi pred patogeni, lahko vodi do *kroničnega vnetja* in razvoja številnih *avtoimunskih bolezni*. Primer sta revmatoidni artritis in kronična vnetna črevesna bolezen (Crohnova bolezen) (5).

Z vsem naštetim lahko potrdimo, da so radikali in posledično oksidativni stres, odgovorni za nastanek več patoloških stanj, ki vplivajo na različna tkiva in organe. Tako so eni najpomembnejših škodljivih dejavnikov za zdravje ljudi (6).

### **1.2.3. Merjenje oksidativnega stresa**

Za kvantitativno in kvalitativno določanje dolgotrajnega oksidativnega stresa je potrebna uporaba več različnih metod. Nekatere reaktivne zvrsti lahko določamo neposredno z uporabo spinskih pasti (elektronske paramagnetne resonance (EPR)). Alternativen pristop tej metodi je merjenje produktov oksidacije. Idealnega kazalnika oksidativnih poškodb ni. Najpogosteje določamo sekundarne produkte lipidne peroksidacije (malondialdehid ali druge elektrofile), vsebnost izoprostanov in lipidnih peroksidov ter hidroperokside z uporabo kromogena in Fentonove reakcije. Pomembni so tudi kazalniki oksidacije nukleinskih kislin v telesnih tekočinah (8-hidroksideoksigvanozin). Za ugotavljanje sproščanja radikalov iz nevtrofilcev pa se uporablja metoda kemiluminiscence (7).

### 1.3.ANTIOKSIDANTI

Med antioksidante štejemo vse snovi, ki reagirajo z reaktivnimi zvrstmi, zavirajo oksidacije in preprečijo nastanek verižnih radikalskih reakcij. Antioksidanti upočasnijo ali preprečijo pojav oksidativnega stresa in s tem oksidativnih poškodb bioloških molekul (8). V telesu neprestano potekajo spontane oksidacije, zato je pomembno, da je v vseh predelih celic in tkiv zagotovljena ustrezna antioksidativna zaščita. Evolucija je poskrbela za povezovanje antioksidantov v mrežo redoks spojin, ki delujejo sinergistično, se medsebojno obnavljajo in nevtralizirajo škodljive učinke radikalov in drugih reaktivnih zvrsti (1).

Antioksidanti so zelo heterogena skupina molekul. Delimo jih lahko na več različnih načinov. Poznamo antioksidante endogenega (superoksid dismutaza, transferin, glutation itd.) in eksogenega (polifenoli, vitamin C in E, tokoferoli, itd.) izvora. Na osnovi fizikalno-kemijskih lastnosti ločimo hidrofilne/vodotopne antioksidante (vitamin C), hidrofobne/maščobotopne antioksidante (vitamin E) in amfifilne antioksidante, ki so topni tako v maščobah kot v vodi (lipojska kislina, glutation). Po kemijski strukturi so lahko antioksidanti encimske ali ne-encimske snovi. Medtem ko imajo nekateri antioksidanti možnost regeneracije (glutation, vitamin C in E idr.), so drugi neobnovljivi (sečna kislina, beta-karoten idr.) (1).

Posamezni antioksidanti so različno učinkoviti in v telesu različno zastopani. Tudi delujejo na različne načine. Glede na mehanizem delovanja jih lahko razdelimo na tri osnovne skupine:

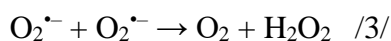
#### - **Kelatorji kovinskih ionov**

Ti vežejo ione prehodnih kovin (železa, bakra) in v telesu zmanjšajo njihovo razpoložljivost. S tem jim preprečijo sodelovanje v redoks reakcijah (Fentonova, Haber-Weissova), kjer nastaja visoko reaktiven hidroksilni radikal. Predstavniki so nekateri proteini: transferin, laktoferin, feritin, ceruloplazmin itn. (10).

#### - **Encimski antioksidanti**

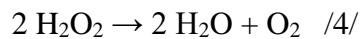
Ti katalizirajo pretvorbo nekaterih reaktivnih zvrsti v nereaktivne ali manj reaktivne produkte. V telesu so najpomembnejši predstavniki: superoksid dismutaza, glutation peroksidaza in katalaza. Našteti encimi sodelujejo pri odstranjevanju superoksidnega radikala (11).

- a. Superoksid dismutaza katalizira dismutacijo superoksidnega radikala do kisika in vodikovega peroksida /3/:

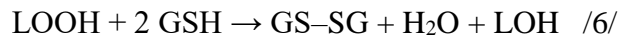




b. Nato katalaza pretvori vodikov peroksid v kisik in vodo /4/:



c. Medtem ko so katalaze v peroksisomih, jih v mitohondrijih ni. Tam redukcijo vodikovega peroksida do vode /5/ ali lipidnih hidroperoksidov do vode in ustreznih alkoholov /6/ katalizira glutation peroksidaza. Kot donor vodika sodeluje glutation (GSH), ki se v reakciji oksidira:



#### - **Reducenti ali lovilci radikalov**

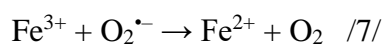
Ti neposredno reagirajo z radikali ali oksidanti, prekinajo verižno radikalsko reakcijo in preprečijo nastanek oksidativnih poškodb biološko pomembnih molekul. Antioksidanti v reakciji z radikalom donirajo elektron ali vodikov atom, pri čemer se oksidirajo do stabilnih ali nereaktivnih radikalov. Ti se nato regenerirajo ali izločijo iz telesa. Predstavniki so predvsem nizkomolekularne snovi: vitamin E, koencim Q<sub>10</sub>, karotenoidi, flavonoidi, vitamin C, sečna kislina, glutation, polifenoli idr. (10).

Mehanizem antioksidativne obrambe lahko razdelimo na štiri nivoje (primarni, sekundarni in terciarni). *Primarni* nivo obrambe vključuje antioksidante, ki delujejo preventivno in preprečijo nastanek radikalov in reaktivnih zvrsti. Sem spadajo encimski antioksidanti in kelatorji kovinskih ionov. *Sekundarni nivo antioksidativne* obrambe predstavljajo reducenti ali lovilci radikalov, ki nevtralizirajo že nastale radikale. V *terciarni nivo* obrambe pa štejemo antioksidante, ki sodelujejo pri odpravljanju oksidativnih poškodb. Gre za tako imenovane *de novo* encime, ki prepoznajo, uničijo in odstranijo poškodovane proteine, DNA in lipide. Predstavniki so DNA popravljalni encimi (polimeraze, glikozilaze, nukleaze) in proteolitični encimi (proteinaze, proteaze, peptidaze) (9, 11).

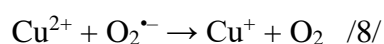
### **1.3.1. Kelatorji železovih in bakrovih ionov**

Železovi in bakrovi ioni so zaradi sposobnosti sprejemanja in oddajanja elektronov nujno potrebni za življenje aerobnih organizmov. Železo je v aktivnih mestih številnih encimov (katalaze, hidrogenaze, akonitaze, citokromov idr.), poleg tega je bistven del skladiščne in transportne molekule kisika (mioglobina in hemoglobina). Tudi baker je ključen del številnih metaloencimov (SOD, citokrom oksidaze, nitrit-reduktaze in NADH dehidrogenaze) in tako pomemben za odstranjevanje superoksidnega radikala, tvorbo ATP in regulacijo transkripcije (12). Nasprotno sta železo in baker v prosti oziroma nevezani obliki toksična za organizem. Kot

prooksidanta lahko sodelujeta v enoelektronskih redoks reakcijah (13). Prosti železovi ioni reagirajo z vodikovim peroksidom (Fentonova reakcija /1, 2/), pri čemer nastaja visoko reaktiven hidroksilni radikal.  $\text{Fe}^{2+}$  se pri tem oksidira do netopne in bolj stabilne oblike  $\text{Fe}^{3+}$ . V prisotnosti superoksidnega radikala pa se lahko le-ta reducira nazaj v  $\text{Fe}^{2+}$  /7/ (12).



$\text{Fe}^{2+}$  lahko ponovno vstopi v Fentonovo reakcijo, nastaja še več hidroksilnega radikala, to pa vodi v obsežnejše oksidativne poškodbe bližnjih molekul (12). Tudi prosti baker ( $\text{Cu}^+$ ) reagira z vodikovim peroksidom, se oksidira do  $\text{Cu}^{2+}$  in tako sodeluje pri nastanku hidroksilnega radikala. Tako kot v primeru železovih ionov se v prisotnosti superoksidnega radikala  $\text{Cu}^+$  ioni reducirajo /8/ in lahko ponovno vstopajo v Fentonovo reakcijo (12).



Telo je skozi evolucijo razvilo številne mehanizme, s katerimi uravnava koncentracijo prostih kovinskih ionov na najnižji možni ravni. Tako železove in bakrove ione vežejo številni proteini: transferin, laktoferin, feritin, ceruloplazmin idr (1).

Za preprečevanje oksidativnih poškodb, ki nastanejo pod vplivom višjih koncentracij bakrovih in železovih ionov, so uporabni številni *kelatorji* sinteznega izvora. To so polidentatni ligandi, ki se z več atomi koordinativno vežejo na kation železa ali bakra. Pri tem nastane kelatni kompleks, katerega stabilnost je odvisna od vrste kovine in strukture kelatorja (1, 12).

Kelatorji, ki lahko v zmesi  $\text{H}_2\text{O}_2$  in kovinskih ionov zmanjšajo nastanek hidroksilnega radikala, lahko delujejo na različne načine:

- Z vezavo na kovinski ion le-temu spremenijo redukcijski potencial ali zmanjšajo dostopnost vezavnih mest. Posledično preprečijo reakcijo bakrovega ali železovega iona s  $\text{H}_2\text{O}_2$  in nastanek  $\text{OH}^{\bullet}$ . Primer sta transferin in laktoferin.
- Lahko vežejo kovinski ion, s čimer sicer ne preprečijo tvorbe  $\text{OH}^{\bullet}$ , ampak ga v bližini nastanka prestrežejo in absorbirajo.
- V primeru, ko je v raztopini več kelatorjev kot kovinskih ionov, lahko nevezani kelatorji reagirajo z  $\text{OH}^{\bullet}$  in ga odstranijo (1, 13).

Ti mehanizmi delovanja so pomembni pri načrtovanju kelatorjev, ki se uporabljajo za zdravljenje preobremenitev z železom ali bakrom. Najpogosteje se uporabljata desferoksamin (železo) in D-penicilamin (baker) (12).

### 1.3.2. Fenolni in polifenolni antioksidanti

Fenolne spojine so ene izmed najpomembnejših nizkomolekularnih antioksidantov eksogenega izvora. Mednje uvrščamo vse spojine, ki imajo eno ali več hidroksilnih skupin (-OH) vezanih direktno na aromatski obroč. Fenolne spojine so lahko enostavne molekule ali visoko polimerizirane spojine. Glede na število aromatskih hidroksilnih skupin v molekuli fenolne spojine delimo na monofenole, difenole in polifenole (1).

Fenolne spojine so najširše zastopana skupina sekundarnih metabolitov rastlin. Danes jih je znanih že več kot 10.000. V splošnem se glavna biosintezna pot večine rastlinskih fenolnih spojin začne iz aromatske aminokislina fenilalanina (1).

Polifenole lahko razdelimo v različne razrede glede na število fenolnih obročev v molekuli in prisotnost strukturnih elementov, ki te obroče med seboj povezujejo. Poznamo štiri glavne razrede polifenolnih spojin, in sicer fenolne kisline (hidrobenzojske kisline, hidroksicimetne kisline), flavonoidi, stilbeni in lignani (15).

Polifenoli se nahajajo v večini rastlinskih tkiv. Njihova prisotnost je pomembna, saj znatno prispevajo k fiziologiji in morfologiji rastlin. Imajo ključno vlogo pri njihovi pigmentaciji, rasti in razmnoževanju. Rastlinam nudijo antioksidativno zaščito in jih varujejo pred zajedavci in poškodbami zaradi UV sevanja. Poleg tega so fitoaleksini, kar pomeni, da povečujejo odpornost rastlin proti raznim glivičnim, bakterijskim in virusnim okužbam (16).

V naravi polifenole pogosto najdemo v sadju, zelenjavi, žitaricah in različnih pijačah (14). Rastlinski polifenoli so izredno pomembne sestavine prehrane ljudi. Njihova najpomembnejša funkcija je sposobnost odstranjevanja nekaterih reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti. Reagirajo namreč z različnimi radikali in neradikali, kot so  $\text{HO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $^\bullet\text{NO}$ ,  $\text{ONOOH}$ . Poleg tega so učinkoviti pri odstranjevanju  $\text{RO}^\bullet$  in  $\text{ROO}^\bullet$  radikalov, ki nastanejo pri oksidativnih poškodbah lipidov, proteinov in DNA. Pri reakciji s peroksilnim radikalom tako prekinajo verižno reakcijo lipidne peroksidacije. Nekateri polifenoli lahko kelirajo kovinske ione, kot so železovi(II)/bakrovi(I) in železovi(III)/bakrovi(II) ioni. S tem preprečijo reakcijo pretvorbe  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  v zelo reaktiven  $\text{HO}^\bullet$ , torej Haber-Weiss in Fentonovo reakcijo. Poleg tega blokirajo delovanje nekaterih prooksidativnih encimov. Opisani antioksidativni učinki polifenolov pripomorejo k zaščiti organizma pred nastankom in napredovanjem bolezni, ki so povezane s pojavom oksidativnega stresa (1, 17).

Pod določenimi pogoji, in sicer v primeru visokih koncentracij prehodnih kovinskih ionov, visokega pH in prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti, lahko polifenoli delujejo prooksidativno. Kovinski ioni v višjem oksidacijskem stanju,  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$ , se pod temi pogoji s pomočjo polifenolnih spojin reducirajo do nižjega oksidacijskega stanja,  $\text{Cu}^+$  in  $\text{Fe}^{2+}$ . Ioni v reducirani obliki nato vstopajo v Fentonovo reakcijo, pri čemer nastajajo reaktivne kisikove zvrsti. Polifenoli imajo prooksidativne učinke tudi pri visokih temperaturah. Takrat lahko avtooksidirajo, pri čemer nastaja  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Posledično pride do poškodb DNA in proteinov. Polifenoli s svojimi prooksidativnimi učinki sprožijo apoptozo celic. Tako delujejo tudi antikancerogeno. Zaradi visoke vsebnosti kovinskih ionov v rakavih celicah že nizke koncentracije polifenolov na rakave celice delujejo citotoksično (1, 17, 18).

### 1.3.3. Kinazolini in kinazolinoni

Kinazolini in kinazolinoni spadajo v skupino dušikovih heterocikličnih spojin. Zaradi širokega spektra biološkega delovanja so aktualni predvsem na področju farmacije in medicinske kemije. Substituirani kinazolinski in kinazolinonski derivati so učinkoviti pri zdravljenju epilepsije, raka, različnih okužb (virusne, bakterijske, glivične), vnetja, depresije, tuberkuloze in veliko drugih patoloških stanj. Zaradi teh lastnosti so sestavine številnih zdravil, uporabljajo pa se tudi kot izhodiščne spojine v proizvodnji funkcionalnih materialov (19).

Kinazolin je biciklična spojina, ki nastane z intramolekularno kondenzacijo dveh šest-členskih aromatskih obročev, benzenovega in pirimidinskega (slika 2). Prvič ga je v svojem laboratoriju leta 1903 sintetiziral Gabriel. Takrat je bil kinazolin znan pod imenom benzo-1,3-diazin (20). Kinazolini so v hladnih in razredčenih raztopinah kislin in baz stabilni, pri temperaturah vrelišča pa razpadejo. Z različnimi reakcijami (hidroliza, oksidacije, redukcije, nukleofilne in elektrofilne substitucije, adicije, alkilacije) nastajajo substituirani kinazolini. Njihove lastnosti so odvisne od narave in položaja (pirimidinski ali benzenov obroč) substituentov v molekuli (19).

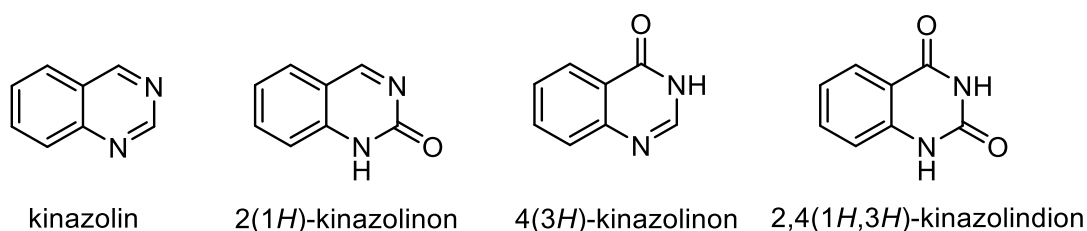
Kinazolinoni so derivati kinazolinov. Pirimidinski obroč vsebuje, v nasprotju s kinazolini, karbonilno (-CO-) funkcionalno skupino. Prvi kinazolinon je leta 1869 sintetiziral Griess. V reakciji antranilne kisline in cianogena ( $\text{C}_2\text{N}_2$ ) je nastal 2-ciano-4(3*H*)-kinazolinon (20, 21).

Glede na položaj substitucije na obroču lahko kinazolinone razdelimo na pet skupin:

- 2-substituirani-4(3*H*)-kinazolinoni,

- 3-substituirani-4(3*H*)-kinazolinoni,
- 4-substituirani-kinazolinoni,
- 2,3-disubstituirani-4(3*H*)-kinazolinoni in
- 2,4-disubstituirani-4(3*H*)-kinazolinoni (19).

Kinazolinone lahko razdelimo tudi glede na položaj okso- oziroma keto- skupine, in sicer v tri razrede: 2(1*H*)-kinazolinoni, 4(3*H*)-kinazolinoni in 2,4(1*H*,3*H*)-kinazolidioni (slika 2) (19).



**Slika 2:** Strukturne formule kinazolina in posameznih kinazolinonov.

Od naštetih treh struktur so 4(3*H*)-kinazolinoni najpogostejši. Tako naravni kot tudi sintetično pridobljeni kinazolinoni so bili v zadnjih letih, predvsem zaradi svojih raznolikih farmakoloških aktivnosti, deležni veliko pozornosti. Številne raziskave so pokazale, da so kinazolinoni po uvedbi hidroksilnih skupin na aromatski obroč učinkoviti antioksidanti. Tako predstavljajo potencialna zdravila za zdravljenje bolezni, ki so posledica oksidativnih poškodb (22).

## 1.4. METODE DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE

Zaradi pomembnosti antioksidantov pri zaščiti bioloških molekul pred oksidativnim stresom, poznamo številne analitske tehnike za določanje antioksidativne kapacitete. Delimo jih v tri skupine, in sicer spektrofotometrične, elektrokemijske in kromatografske. Metode so našteje v preglednici II (23).

Metode so lahko neposredne in temeljijo na inhibiciji avtooksidacije ter spremljanju kinetike porabe primarnih oksidantov (hidroperoksidov, kisika). Vseeno pa večina metod ne temelji na avtooksidaciji substrata. Večinoma so metode posredne in temeljijo na kompeticiji antioksidanta s fluorescentno sondo (npr. ORAC), na redukciji stabilnih radikalov (DPPH, ABTS), na reakciji s prehodnimi kovinami (FRAP, CUPRAC) idr. (24). Izbor metode je odvisen predvsem od narave vzorcev, težavnosti in trajanja testa ter eksperimentalnih parametrov (specifičnosti, občutljivosti, natančnosti, meje detekcije) (23).

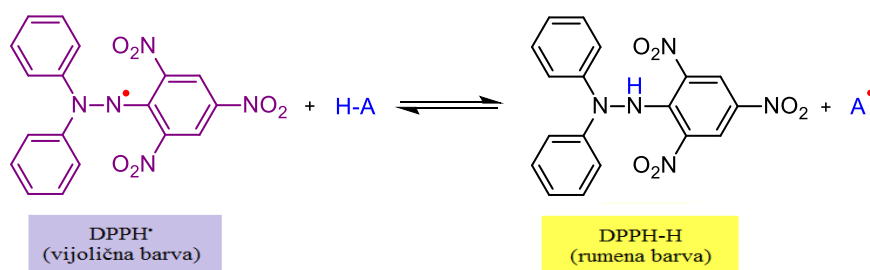
**Preglednica II:** Primeri spektrofotometričnih, elektrokemijskih in kromatografskih metod (23).

Spektrofotometrične metode	Elektrokemijske metode
Test z 1,1-difenil-2-pikril-hidrazilnim radikalom (DPPH test)	Ciklična voltometrija
Test z radikalom 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline (ABTS test)	Amperometrija
»Ferric reducing antioxidant power« (FRAP test)	Bioamperometrija
»Cupric reducing antioxidant capacity« (CUPRAC test)	<b>Kromatografske metode</b>
»Oxygen radical absorbance capacity« (ORAC test)	Tekočinska kromatografija
»Hydroxyl radical antioxidant capacity assay« (HORAC test)	visoke ločljivosti (HPLC)
»Total radical-trapping antioxidant parameter« (TRAP test)	Plinska kromatografija (GC)

### 1.4.1. Test redukcije DPPH radikala

DPPH test je najpogosteje uporabljena metoda za določanje antioksidativne aktivnosti, saj je enostavna, učinkovita, občutljiva in cenovno ugodna. DPPH test je leta 1958 razvil Bloiss, ki je za prenos vodikovega atoma na DPPH radikal uporabil cistein (25, 26).

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) je stabilen radikal, saj zaradi delokalizacije elektrona po molekuli ne dimerizira. DPPH<sup>\*</sup> je temno vijolične barve in v metanolu ali etanolu absorbira svetlobo valovnih dolžin med 515 in 520 nm. V prisotnosti antioksidanta lahko DPPH<sup>\*</sup> sprejme elektron ali vodikov atom in se reducira v bolj stabilno molekulo DPPH-H. Rezultat je sprememba barve iz vijolične v blede rumeno, kar lahko spremljamo spektrofotometrično (25, 27).



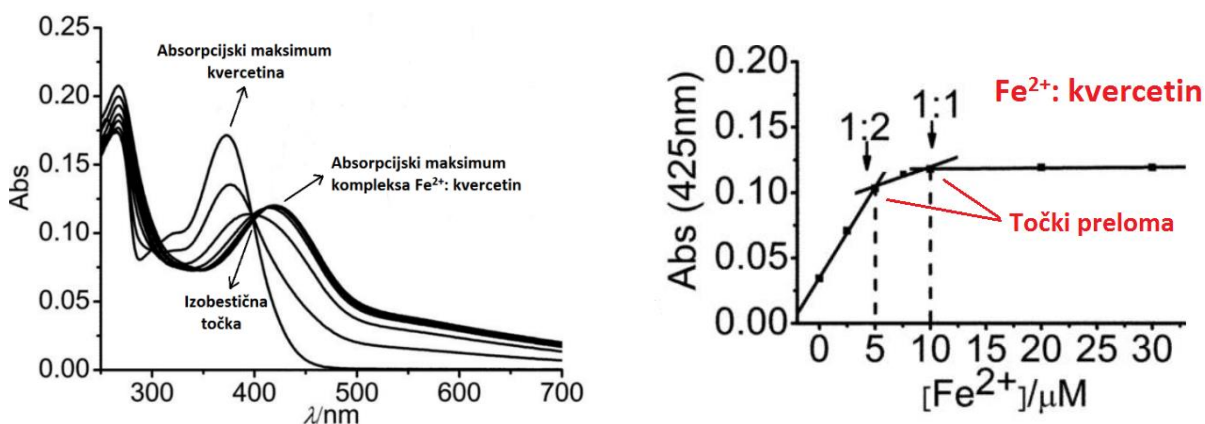
**Slika 3:** Princip reakcije DPPH radikala z antioksidantom (AH).

Večja kot je antioksidativna kapaciteta spojine, večja je količina reduciranega DPPH-H in manj intenzivna je vijolična barva. Posledica je padec absorbance DPPH<sup>\*</sup> pri 517 nm. Odvisnost med koncentracijo antioksidanta in absorbanco je navadno premo sorazmerna (25, 26). Sposobnost

antioksidantov za redukcijo radikalov izrazimo z  $EC_{50}$ , ki predstavlja koncentracijo, pri kateri antioksidant reducira 50 % začetne koncentracije DPPH $\cdot$  v določenem časovnem intervalu. Nižja kot je vrednost  $EC_{50}$ , večja je učinkovitost antioksidanta (27).

#### 1.4.2. UV-Vis spektrofotometrična titracija spojin z bakrom(II) in železom(II)

Raziskave so pokazale, da so spojine, ki vsebujejo hidroksilne skupine (fenoli in polifenoli), sposobne kelacije kovinskih ionov. Kelatorji so v primerjavi z reducenti (lovilci radikalov) včasih celo uspešnejši pri zaščiti organizma pred oksidativnim stresom. Sposobnost spojine za kelacijo kovinskih ionov in njuno vezavno stehiometrijo lahko določamo s pomočjo UV-Vis spektrofotometra. V reakcijsko zmes, ki vsebuje testno spojino in pufer, postopoma dodajamo vedno višje koncentracije raztopin  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ali drugih kovinskih ionov ( $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ). Reakcijski zmesi s posameznimi koncentracijami kovinskih ionov posnamemo absorpcijske spektre. Posledica nastanka kompleksa med spojino in kovinskim ionom je lahko pojav izobestične točke, premik absorpcijskega maksimuma za določeno valovno dolžino oziroma sprememba absorbance. To pomeni, da spojina kelira določen kovinski ion. Iz spektrov nato pri novi valovni dolžini odčitamo absorbance in izrišemo titracijsko krivuljo (sprememba absorbance v odvisnosti od koncentracije ali molarne razmerja kovinski ioni/spojina). Naraščanje ali padanje spremembe absorbance pomeni, da v reakcijski zmesi nastaja vse več kompleksov. Ko se v zmesi na spojino vežejo že vsi kovinski ioni, pride do vzpostavitve ravnotežja in absorbance se ne spreminja več. To na titracijski krivulji zaznamo kot točko preloma. V tej točki nato odčitamo vezavno stehiometrijo med  $Fe^{2+}$  ali  $Cu^{2+}$  in testno spojino (28). Kvercetin na primer z železom(II) tvori komplekse v razmerju 1:2 ali 1:1 (slika 4).



**Slika 4:** Absorpcijski spekter po titraciji kvercetina s  $Fe^{2+}$  (levo) in titracijska krivulja z odčitano vezavno stehiometrijo (desno) (povzeto po 28).

## 2. NAMEN IN POTEK DELA

Kinazolinoni so v zadnjih letih zaradi raznolikih farmakoloških aktivnosti deležni veliko pozornosti. Številne raziskave so pokazale, da imajo po uvedbi hidroksilnih skupin na aromatski obroč antioksidativne učinke. Tako predstavljajo potencialna zdravila za zdravljenje bolezni, ki so posledica oksidativnih poškodb bioloških molekul (22).

V sklopu magistrske naloge bomo s postopkom aerobne oksidacije v DMSO iz antranilamida in izbranih hidroksibenzaldehydov sintetizirali različne 2-substituirane 4(3*H*)-kinazolinone. Za sintezo bomo uporabili naslednje benzaldehyde: 2-hidroksibenzaldehyd, 3-hidroksibenzaldehyd, 2,3,4-trihidroksibenzaldehyd, 2,4,5-trihidroksibenzaldehyd, 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehyd, 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehyd in 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehyd. Čistost spojin bomo najprej preverili z uporabo tankoplastne kromatografije (TLC) in nato še z jedrsko magnetno resonanco (NMR). Spojinam bomo potrdili strukturo z masno spektrometrijo (MS), NMR ter infrardečo spektroskopijo (IR).

Nato bomo z uporabo dveh različnih testov preverili antioksidativno kapaciteto petih spojin, ki smo jih sintetizirali sami in ene spojine, sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo.

- Najprej bomo z DPPH testom preučili antioksidativno sposobnost kinazolinonov za redukcijo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilnega (DPPH<sup>•</sup>) radikala. Za primerjavo bomo uporabili polifenolni standard kvercetin. Posamezni spojini bomo izračunali koncentracijo, ki reducira 50 % začetne koncentracije DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>), in na podlagi rezultatov sklepali, ali spojine izkazujejo antioksidativne učinke. Zanima nas tudi, kako struktura, število hidroksilnih skupin in prisotnost metoksi skupine vplivajo na njihovo antioksidativno kapaciteto.
- Nato bomo opravili UV-Vis spektrofotometrično titracijo kinazolinonov z bakrovimi(II) in železovimi(II) ioni. Pri tem bomo preverili njihovo sposobnost kelacije kovinskih ionov. Izrisali bomo titracijsko krivuljo in v primeru, da spojina kelira kovinske ione, določili vezavno stehiometrijo med kinazolinonom in kovinskim ionom.



### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. TOPILA IN REAGENTI

##### 3.1.1. Topila in reagenti za sintezo 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov

Topila in reagenti, ki smo jih uporabili za sintezo, so prikazani v preglednici III.

**Preglednica III:** Topila in reagenti, uporabljeni za sintezo.

Ime	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Proizvajalec
Antranilamid	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O	136,15	Sigma-Aldrich
Salicilaldehid (2-hidroksibenzaldehid)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122,12	Acros organics
3-hidroksibenzaldehid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122,12	Acros organics
2-hidroksi-4- metoksibenzaldehid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	Acros organics
2-hidroksi-5- metoksibenzaldehid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	TCI
3-hidroksi-4- metoksibenzaldehid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	Acros organics
2,3,4-trihidroksibenzaldehid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,12	Fluka
2,4,5-trihidroksibenzaldehid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,12	Acros organics
Dimetil sulfoksid	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO	78,13	Merck
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07	Merck
Destilirana voda	H <sub>2</sub> O	18,00	Pripravljena na Fakulteti za farmacijo
Etilacetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	Carlo Erba Reagents
10 % citronska kislina	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192,12	Merck
Natrijev klorid	NaCl	58,44	Acros organics

##### 3.1.2. Topila in reagenti za test redukcije DPPH radikala in UV-Vis spektrofotometrično titracijo spojin z bakrom(II) in železom(II)

Topila in reagenti, ki smo jih uporabili za izvedbo DPPH testa in preverjanje sposobnosti kelacije kovinskih ionov, so prikazani v preglednici IV.

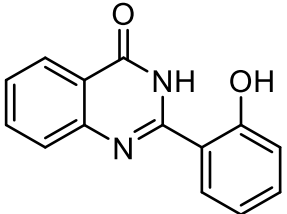
**Preglednica IV:** Topila in reagenti za DPPH test in preverjanje sposobnosti kelacije kovinskih ionov.

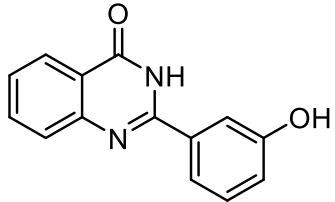
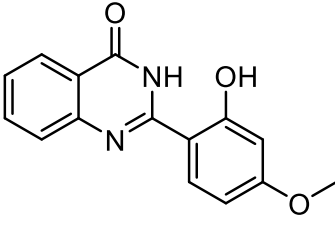
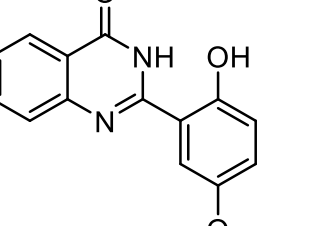
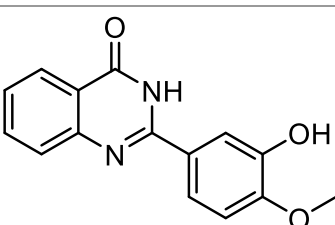
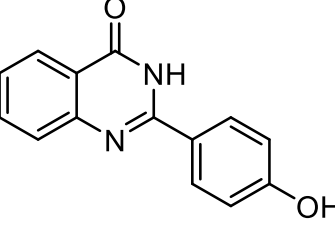
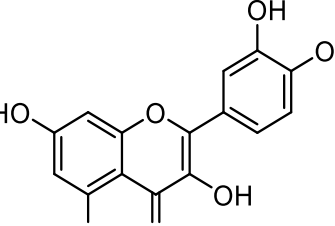
Ime	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Proizvajalec
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394,32	Sigma-Aldrich
Metanol	$CH_3OH$	32,04	Carlo Erba Reagents
MilliQ <sup>®</sup> prečiščena voda	$H_2O$	18,00	Pripravljena na Fakulteti za farmacijo
Natrijev hidroksid	$NaOH$	40,00	Merck
Bakrov(II) klorid dihidrat	$CuCl_2 \times 2H_2O$	170,48	Sigma-Aldrich
Železov(II) klorid tetrahidrat	$FeCl_2 \times 4H_2O$	198,81	Sigma-Aldrich
L(+)-Askorbinska kislina	$C_6H_8O_6$	176,13	Acros organics
HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,30	Acros organics
Natrijev klorid	$NaCl$	58,44	Acros organics

### 3.2.SPOJINE

V magistrski nalogi smo antioksidativno kapaciteto in sposobnost kelacije kovinskih ionov preverjali pri šestih spojinah (preglednica V). Pet spojin (**1-5**) smo sintetizirali sami, eno spojino (**8**) pa je na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo sintetizirala doc. dr. Martina Hrast, mag. farm. Spojino **8** smo izbrali, saj ima podobno kemijsko strukturo kot spojin **1** in **2**. Želeli smo primerjati njihove antioksidativne učinke. Kot standard za določanje antioksidativne kapacitete s testom DPPH smo uporabili polifenolni antioksidant kvercetin,  $\geq 95\%$ , proizvajalca Sigma-Aldrich, ki se pri sobni temperaturi nahaja v obliki rumenega prahu.

**Preglednica V:** Prikaz spojin, uporabljenih za DPPH test in preverjanje sposobnosti kelacije kovinskih ionov.

Spojina	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Kemijska struktura
<b>1</b>	2-(2-hidroksifenil)kinazoln-4(3H)-on	$C_{14}H_{10}N_2O_2$	238,24	

<u>2</u>	2-(3-hidroksifenil)kinazoloni-4(3 <i>H</i> )-on	$C_{14}H_{10}N_2O_2$	238,24	
<u>3</u>	2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)kinazoloni-4(3 <i>H</i> )-on	$C_{15}H_{12}N_2O_3$	268,24	
<u>4</u>	2-(2-hidroksi-5-metoksifenil)kinazoloni-4(3 <i>H</i> )-on	$C_{15}H_{12}N_2O_3$	268,24	
<u>5</u>	2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)kinazoloni-4(3 <i>H</i> )-on	$C_{15}H_{12}N_2O_3$	268,24	
<u>8</u>	2-(4-hidroksifenil)kinazoloni-4(3 <i>H</i> )-on	$C_{14}H_{10}N_2O_2$	238,24	
<b>Kvercetin</b>	2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4 <i>H</i> -kromeni-4-on	$C_{15}H_{10}O_7$	302,24	

### 3.3.MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATURE

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje pripomočke:

- magnetno mešalo Ika,
- UV svetilka Camag,
- TLC plošče Merck: Silica gel 60 F254,
- polavtomatske pipete BRAND Transferpette<sup>®</sup> S: 100 – 1000  $\mu$ L in 0,5 – 5 mL; Thermo SCIENTIFIC FINNPIPETTE<sup>®</sup> F2: 1 – 10  $\mu$ L in 10 – 100  $\mu$ L; Gilson PIPETMAN P2: 0,2 – 2  $\mu$ L; Eppendorf Research 20 - 200  $\mu$ L,
- nastavke za pipete BRAND Transferpette<sup>®</sup>,
- 2,5 mL kiveta iz kvarčnega stekla Hellma Analytics: QS High Precision Cell, Quartz SUPRASIL<sup>®</sup>, 10 mm.
- 1,5 mL plastične semi-mikro kivete BRAND<sup>®</sup>,
- 5 in 10 mL penicilinke neOLAB,
- mikrotitrne plošče Techno Plastic Products<sup>®</sup> s 96 vdolbinicami,
- parafilm BEMIS<sup>®</sup>,
- laboratorijsko steklovino, keramiko, aluminijasto folijo, kovinske spatule z žličko, steklene palčke, plastične zamaške različnih proizvajalcev in
- osebna zaščitna sredstva.

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje aparature:

- analitsko tehtnico AG245 proizvajalca Mettler Toledo,
- precizno tehtnico PB403 proizvajalca Mettler Toledo,
- rotavapor Büchi 461 Water Bath,
- ultrazvočno kopel Sonis 3 proizvajalca ISKRA Pio d.o.o.,
- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy HT Hybrid Reader proizvajalca BioTek<sup>®</sup>,
- UV-Vis spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca VARIAN in
- pH meter MP 220 proizvajalca Mettler Toledo.

## **3.4.METODE IN RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA**

### **3.4.1. Poimenovanje in risanje spojin**

Za risanje kemijskih struktur in reakcijskih shem ter poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0.0 proizvajalca PerkinElmer.

### **3.4.2. Tankoplastna kromatografija (TLC)**

TLC smo uporabili za spremljanje poteka kemijskih reakcij in preverjanje čistosti sintetiziranih spojin. Uporabili smo plošče TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> proizvajalca Merck. Te imajo na aluminijastem nosilcu nanešeno 0,20 mm debelo plast silikagela s fluorescentnim indikatorjem. Za mobilno fazo smo uporabili etil acetat in heksan v razmerju 1:1. Prisotnost spojin pa smo detektirali z UV svetlobo svetilke Camag pri valovnih dolžinah 254 nm in 366 nm. Rezultate smo podali z retencijskim faktorjem ( $R_f = \text{pot končne spojine/pot topila}$ ).

### **3.4.3. Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

NMR smo uporabili za dodatno preverjanje čistosti in določitev strukture sintetiziranih spojin. S pomočjo spektrometra Bruker Avance III 400 MHz smo na Fakulteti za Farmacijo posneli <sup>1</sup>H NMR in <sup>13</sup>C NMR spektre. Kot topilo smo uporabili devteriran DMSO-d<sub>6</sub> z dodanim internim standardom tetrametilsilanom (TMS). Spektre smo obdelali z uporabo računalniškega programa NMRnotebook (NMRTEC), kemijske premike ( $\delta$ ) pri posamezni spojini pa podali glede na TMS ( $\delta$  (ppm) = 0,00).

### **3.4.4. Masna spektrometrija (MS)**

Z MS smo sintetiziranim spojinam potrdili strukturo. Masne spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo. Najprej smo naredili MS nizke resolucije. Uporabili smo Advion expression Compact Mass Spectrometer z ESI načinom ionizacije. Rezultate smo potrdili še z MS visoke resolucije (HRMS). Uporabili smo Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ visoko ločljivi masni spektrometer z elektrosprej ionizacijo (ESI) in LC-MS sklopitvijo proizvajalca ThermoFisher Scientific. Strukturo spojin smo potrdili z analizo masnih spektrov tako, da smo odčitali razmerje med maso in nabojem ( $m/z$ ).

### **3.4.5. Infrardeča spektroskopija (IR)**

Sintetiziranim spojinam smo strukturo potrdili tudi z IR. Spektre smo posneli s tehniko popolnega odboja (ATR) na spektrofotometru FT-IR Thermo Nicolet na Fakulteti za farmacijo. Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2 in rezultate podali v enotah recipročnih centimetrov ( $\text{cm}^{-1}$ ).

### **3.4.6. Test redukcije DPPH radikala**

S testom redukcije DPPH radikala smo preverjali antioksidativno kapaciteto sintetiziranih spojin. Za določanje absorpcijskega maksimuma delovne raztopine DPPH smo uporabili UV-Vis spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca VARIAN in računalniški program Cary WinUV. DPPH test smo izvedli na mikrotitrski ploščici Techno Plastic Products® s 96 vdolbinicami. Absorbance DPPH v prisotnosti različnih koncentracij sintetiziranih spojin smo izmerili s spektrofotometričnim čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy HT Hybrid Reader proizvajalca BioTek® in programom Gen5. Rezultate smo prenesli v računalniški program Microsoft Excel 2010. Program smo uporabili za analizo rezultatov (izračun  $\text{EC}_{50}$  in standardne napake) ter risanje grafov odstotka nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine. V primeru, da je rezultate namesto linearne krivulje opisovala 4-parametrična logistična krivulja, smo za risanje grafov uporabili spletni program MyCurveFit (29). Enačba krivulje je bila v teh primerih zelo zapletena, zato smo si pri izračunu  $\text{EC}_{50}$  ter standardne napake pomagali s programom Online Equation Solver proizvajalca WolframAlpha (30).

### **3.4.7. UV-Vis spektrofotometrična titracija spojin z bakrom(II) in železom(II)**

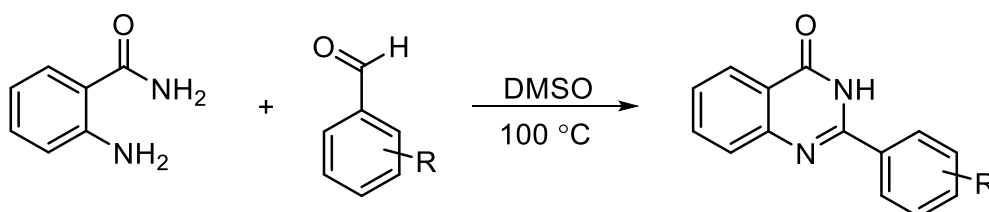
UV-Vis spektrofotometrično titracijo sintetiziranih spojin z bakrovimi(II) in železovimi(II) ioni smo izvedli s pomočjo UV-Vis spektrofotometra Cary 50 Conc proizvajalca VARIAN in računalniškim programom Cary WinUV. Rezultate smo prenesli v računalniški program Microsoft Excel 2010 in za vsako spojino, v prisotnosti različnih koncentracij kovinskih ionov, izrisali absorpcijske spektre. Program Excel smo uporabili tudi za risanje titracijskih krivulj in določanje vezavne stehiometrije med  $\text{Fe}^{2+}$  ali  $\text{Cu}^{2+}$  in spojino.

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1. SINTEZA SPOJIN

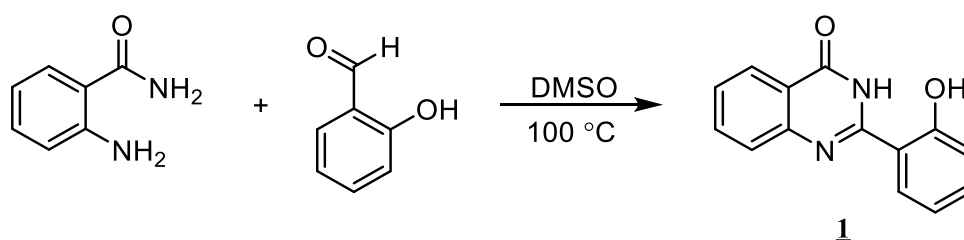
#### Splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov

Najprej v bučki pripravimo reakcijsko zmes. Antranilamid (1,0 mmol; 1 ekv.) in izbrani benzaldehid (1,2 mmol, 1,2 ekv.) raztopimo v DMSO (5 mL) ter dodamo magnet. Nato med mešanjem v odprti bučki segrevamo reakcijsko zmes na oljni kopeli (100 °C) od 2 do 6 dni. Potek reakcije na sliki 5 spremljamo s TLC. Ko se prepričamo, da v reakcijski zmesi ni več izhodnih spojin, reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in dodamo prečiščeno vodo (50 mL). Pri tem se tvori precipitat, ki ga od prečiščene vode ločimo s filtracijo s presesavanjem. Precipitat nato prekrizaliziramo iz etanola in kristalinični produkt sušimo pod znižanim tlakom. Čistost in kemijsko strukturo spojin potrdimo s TLC, NMR, MS in IR analizo.



Slika 5: Reakcijska shema sinteze 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov.

#### 4.1.1. Sinteza 2-(2-hidroksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (**1**)

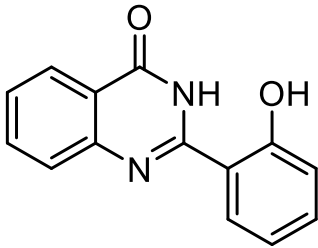


Slika 6: Reakcijska shema sinteze 2-(2-hidroksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (spojine **1**).

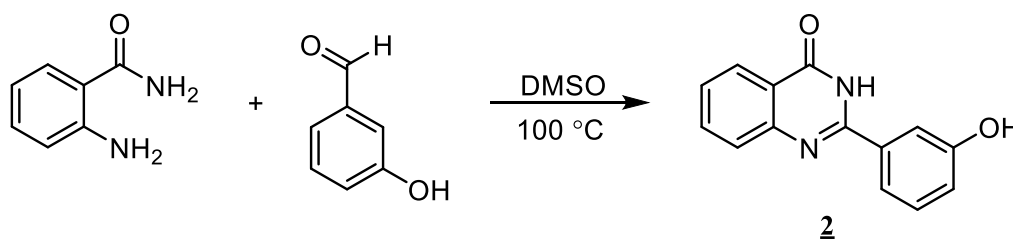
Za sintezo spojine **1** smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov. Sintezo (slika 6) smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in 126,11  $\mu$ L salicilaldehida (1,2 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli segrevali 3 dni. Po analizi produkta s TLC smo ugotovili, da je prisotnega še nekaj antranilamida, zato

smo dodali še 60  $\mu$ L salicilaldehida in reakcijsko zmes na oljni kopeli segrevali dodatne 3 dni. Po končanem splošnem postopku sinteze smo dobili spojino **1**, ki ni potrebovala dodatnega čiščenja.

#### Analiza spojine **1**:

IUPAC ime	2-(2-hidroksifenil)kinazolin-4(3H)-on	
Izgled	Rumeno beli kristali	
Izkoristek	73,88 %	
TLC	R <sub>f</sub> (etil acetat/heksan = 1/1) = 0,525	
<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz)	$\delta$ (ppm) = 6,95 – 7,03 (m, 2H, H-Ar); 7,44 – 7,58 (m, 2H, H-Ar), 7,77 – 7,90 (m, 2H, H-Ar); 8,16 – 8,25 (m, 2H, H-Ar); 12,495 (s, 1H, -OH); 13,81 (s, 1H, -NH-CO-)	
<sup>13</sup> C NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz)	$\delta$ (ppm) = 113,71 (C-Ar); 117,87 (C-Ar); 118,81 (C-Ar); 120,73 (C-Ar); 126,03 (2C, C-Ar); 126,96 (C-Ar); 127,68 (C-Ar); 133,71 (C-Ar); 135,02 (C-Ar); 146,11 (-CN-); 153,69 (Ar-COH); 160,02 (-CN-NH); 161,37 (-CO-NH-)	
IR (ATR)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3099, 1666, 1604, 1559, 1511, 1491, 1460, 1438, 1396, 1330, 1299, 1251, 1226, 1166, 1146, 1124, 1068, 1040, 1020, 951, 874, 825, 793, 760, 686	
MS (ESI)	m/z = 237,12 [M-H] <sup>-</sup>	
HRMS (ESI+)	m/z = izračunana vrednost za C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [M + H] <sup>+</sup> : 239,0815; izmerjena vrednost: 239,0811	

#### 4.1.2. Sinteza 2-(3-hidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (**2**)



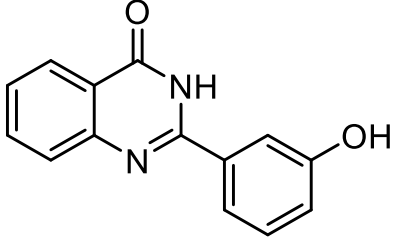
**Slika 7:** Reakcijska shema sinteze 2-(3-hidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (spojine **2**).

Za sintezo spojine **2** smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3H)-kinazolinonov. Sintezo (slika 7) smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in 146,54 mg 3-hidroksibenzaldehida (1,2 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli segrevali 3 dni. Produkt smo analizirali s TLC in ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Po

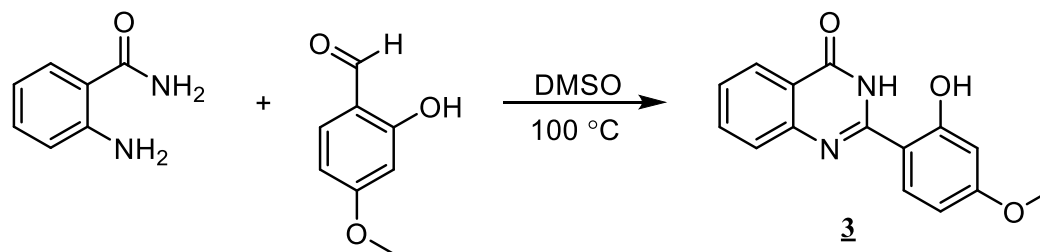


končanem splošnem postopku sinteze smo dobili spojino **2**, ki ni potrebovala dodatnega čiščenja.

### Analiza spojine **2**:

IUPAC ime	2-(3-hidroksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-on	
Izgled	Rumeno oranžni kristali	
Izkoristek	66,78 %	
TLC	R <sub>f</sub> (etil acetat/heksan = 1/1) = 0,182	
<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz)	$\delta$ (ppm) = 6,98 – 7,00 (m, 1H, H-Ar); 7,33 – 7,37 (m, 1H, H-Ar), 7,50 – 7,54 (m, 1H, H-Ar); 7,60 – 7,62 (m, 2H, H-Ar); 7,72 – 7,74 (m, 1H, H-Ar); 7,82 – 7,86 (m, 1H, H-Ar); 8,15 – 8,17 (m, 1H, H-Ar); 9,79 (s, 1H, -OH); 12,46 (s, 1H, -NH-CO-)	
<sup>13</sup> C NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz)	$\delta$ (ppm) = 114,55 (C-Ar); 118,32 (C-Ar); 118,49 (C-Ar); 120,98 (C-Ar); 125,83 (C-Ar); 126,51 (C-Ar); 127,44 (C-Ar); 129,66 (C-Ar); 134,01 (C-Ar); 134,58 (C-Ar); 148,70 (-CN-); 152,32 (-CN-NH-); 157,49 (Ar-COH); 162,17 (-CO-NH-)	
IR (ATR)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3193, 3067, 1657, 1604, 1560, 1510, 1468, 1443, 1370, 1337, 1298, 1245, 1214, 1138, 1091, 1019, 998, 972, 886, 823, 802, 770, 719, 671	
MS (ESI)	m/z = 237,02 [M-H] <sup>-</sup>	
HRMS (ESI+)	m/z = izračunana vrednost za C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [M + H] <sup>+</sup> : 239,0815; izmerjena vrednost: 239,0807	

### 4.1.3. Sinteza 2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (**3**)

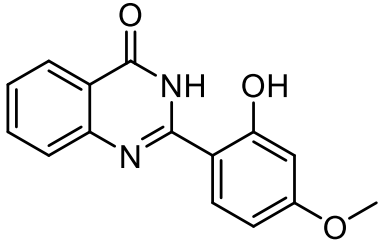


**Slika 8:** Reakcijska shema sinteze 2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (spojine **3**).

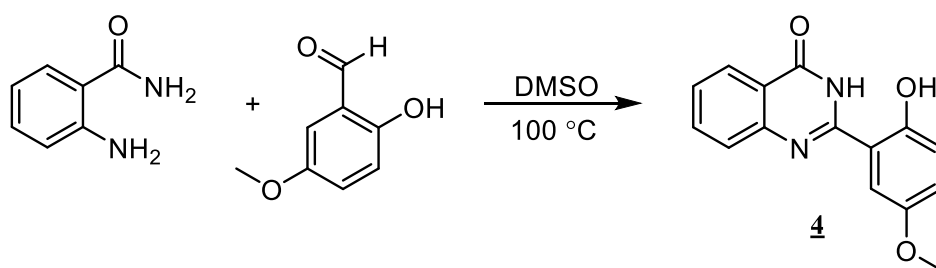
Za sintezo spojine **3** smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov. Sintezo (slika 8) smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in 182,58 mg 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehida (1,2 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo na

oljni kopeli segrevali 3 dni. Produkt smo analizirali s TLC in ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Po končanem splošnem postopku sinteze smo dobili spojino **3**, ki ni potrebovala dodatnega čiščenja.

#### Analiza spojine **3**:

IUPAC ime	2-(2-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3H)-on	
Izgled	Svetlo oranžni kristali	
Izkoristek	82,59 %	
TLC	R <sub>f</sub> (etil acetat/heksan = 1/1) = 0,238	
<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz)	δ (ppm) = 3,81 (s, 3H, -OCH <sub>3</sub> ); 6,52 – 6,56 (m, 2H, H-Ar); 7,48 – 7,52 (m, 1H, H-Ar), 7,69 – 7,71 (m, 1H, H-Ar); 7,81 – 7,85 (m, 1H, H-Ar); 8,12 – 8,21 (m, 2H, H-Ar); 12,37 (s, 1H, -OH); 14,42 (s, 1H, -NH-CO-)	
<sup>13</sup> C NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz)	δ (ppm) = 55,45 (-OCH <sub>3</sub> ); 101,74 (C-Ar); 106,11 (C-Ar); 106,48 (C-Ar); 120,32 (C-Ar); 125,48 (C-Ar); 126,02 (C-Ar); 126,42 (C-Ar); 128,76 (C-Ar); 135,00 (C-Ar); 145,69 (C-Ar); 153,79 (-CN-); 161,40 (Ar-COH); 162,70 (-CN-NH); 163,67 (-CO-NH-)	
IR (ATR)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3077, 1670, 1605, 1562, 1525, 1501, 1464, 1405, 1337, 1252, 1211, 1182, 1155, 1131, 1069, 1032, 966, 945, 859, 818, 763, 689	
MS (ESI)	m/z = 267,06 [M-H] <sup>-</sup>	
HRMS (ESI+)	m/z = izračunana vrednost za C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [M + H] <sup>+</sup> : 269,0921; izmerjena vrednost: 269,0915	

#### 4.1.4. Sinteza 2-(2-hidroksi-5-metoksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (**4**)

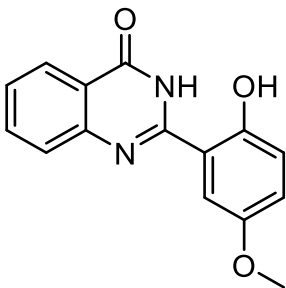


**Slika 9:** Reakcijska shema sinteze 2-(2-hidroksi-5-metoksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (spojine **4**).

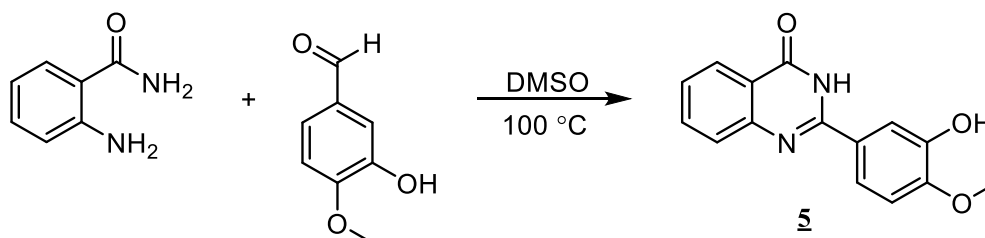
Za sintezo spojine **4** smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3H)-kinazolinonov. Sintezo (slika 9) smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in

182,58 mg 2-hidroksi-5-metoksibenzaldehida (1,2 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli segrevali 3 dni. Po analizi produkta s TLC smo ugotovili, da je prisotnega še nekaj antranilamida, zato smo reakcijsko zmes pustili segrevati na oljni kopeli še dodatne 3 dni. Po končanem splošnem postopku sinteze smo dobili spojino **4**, ki ni potrebovala dodatnega čiščenja.

#### Analiza spojine **4**:

IUPAC ime	2-(2-hidroksi-5-metoksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-on	
Izgled	Temno rumeni kristali	
Izkoristek	70,82 %	
TLC	R <sub>f</sub> (etil acetat/heksan = 1/1) = 0,489	
<sup>1</sup> H NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz)	$\delta$ (ppm) = 3,81 (s, 3H, -OCH <sub>3</sub> ); 6,93 – 6,95 (m, 1H, H-Ar); 7,06 – 7,09 (m, 1H, H-Ar); 7,53 – 7,57 (m, 1H, H-Ar); 7,75 – 7,78 (m, 2H, H-Ar); 7,84 – 7,88 (m, 1H, H-Ar); 8,15 – 8,17 (m, 1H, H-Ar); 12,58 (s, 1H, -OH); 13,48 (s, 1H, -NH-CO-)	
<sup>13</sup> C NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 100 MHz)	$\delta$ (ppm) = 55,82 (-OCH <sub>3</sub> ); 110,11 (C-Ar); 112,97 (C-Ar); 118,93 (C-Ar); 120,65 (C-Ar); 121,78 (C-Ar); 126,01 (2C, C-Ar); 126,94 (C-Ar); 135,02 (C-Ar); 146,08 (C-Ar); 151,69 (Ar-COH); 153,62 (-CN-); 154,40 (-CN-NH); 161,48 (-CO-NH-)	
IR (ATR)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3094, 2989, 2837, 1261, 1660, 1611, 1562, 1508, 1487, 1456, 1426, 1392, 1332, 1294, 1253, 1223, 1144, 1046, 967, 912, 878, 853, 833, 813, 764, 677	
MS (ESI)	m/z = 267,16 [M-H] <sup>-</sup>	
HRMS (ESI+)	m/z = izračunana vrednost za C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [M + H] <sup>+</sup> : 269,0921; izmerjena vrednost: 269,0913	

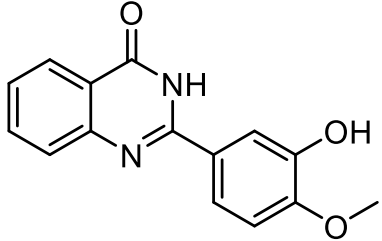
#### 4.1.5. Sinteza 2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (**5**)



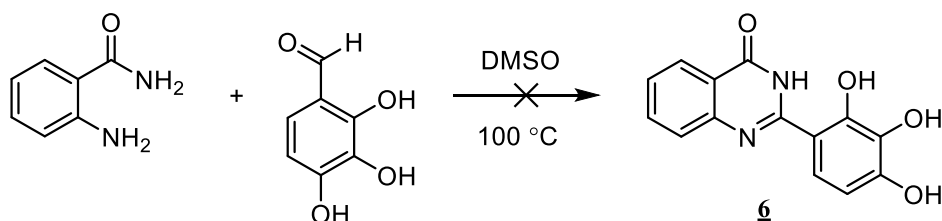
**Slika 10:** Reakcijska shema sinteze 2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-ona (spojine **5**).

Za sintezo spojine **5** smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov. Sintezo (slika 10) smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in 167,00 mg 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehida (1,1 mmol; 1,1 ekv.). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli segrevali 3 dni. Produkt smo analizirali s TLC in ugotovili, da je reakcija potekla do konca. Ko smo izvedli filtracijo s presesavanjem, je produkt izpadel v obliki gela. Sklepali smo, da produkt poleg spojine vsebuje še nekaj topila (DMSO), zato smo se odločili za ločevanje spojine z ekstrakcijo. Produktu smo dodali organsko topilo etilacetat, prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 × 20 mL). Medtem ko je spojina ostala v organski fazi, je DMSO prehajal v vodno fazo, ki smo jo odstranili. Nato smo ekstrahirali še z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL), ki je odtegnila preostanek vode iz organske faze. Produkt z organskim topilom smo prenesli v čašo in sušili z natrijevim sulfatom (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Sušilno sredstvo smo odfiltrirali, etilacetat pa uparili z rotavaporjem. Dobili smo spojino **5**, ki ni potrebovala dodatnega čiščenja.

#### Analiza spojine **5**:

IUPAC ime	2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)kinazolin-4(3 <i>H</i> )-on	
Izgled	Svetlo rumeni kristali	
Izkoristek	50,7 %	
TLC	R <sub>f</sub> (etil acetat/heksan = 1/1) = 0,120	
<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz)	δ (ppm) = 3,87 (s, 3H, -OCH <sub>3</sub> ); 7,05 – 6,08 (m, 1H, H-Ar); 7,47 – 7,51 (m, 1H, H-Ar); 7,68 – 7,72 (m, 3H, H-Ar); 7,80 – 7,84 (m, 1H, H-Ar); 8,12 – 8,14 (m, 1H, H-Ar); 9,40 (s, 1H, -OH); 12,33 (s, 1H, -NH-CO-)	
<sup>13</sup> C NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz)	δ (ppm) = 55,67 (-OCH <sub>3</sub> ); 111,45 (C-Ar); 114,73 (C-Ar); 119,33 (C-Ar); 120,62 (C-Ar); 124,89 (C-Ar); 125,83 (C-Ar); 126,09 (C-Ar); 127,01 (C-Ar); 134,54 (C-Ar); 146,431 (C-Ar); 148,68 (Ar-COH); 150,73 (-CN-); 152,07 (-CN-NH); 162,30 (-CO-NH-)	
IR (ATR)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3532, 2974, 1652, 1603, 1577, 1514, 1490, 1437, 1344, 1292, 1256, 1215, 1196, 1142, 1107, 1075, 1021, 925, 887, 864, 832, 734, 712, 689	
MS (ESI)	m/z = 267,16 [M-H] <sup>-</sup>	
HRMS (ESI+)	m/z = izračunana vrednost za C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [M + H] <sup>+</sup> : 269,0921; izmerjena vrednost: 269,0912	

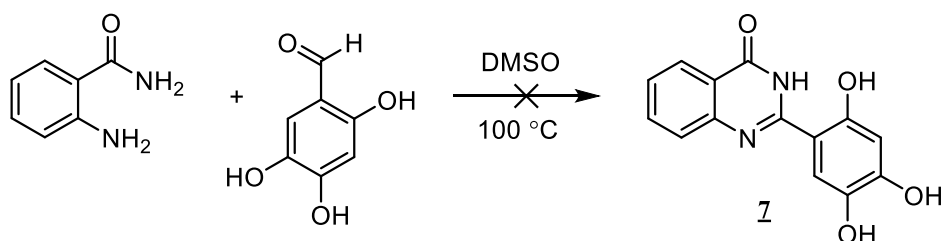
#### 4.1.6. Poskus sinteze 2-(2,3,4-trihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (6)



**Slika 11:** Reakcijska shema sinteze 2-(2,3,4-trihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (spojine 6).

Za sintezo (slika 11) spojine 6 smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3H)-kinazolinonov. Sintezo smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in 184,95 mg 2,3,4-trihidroksibenzaldehida (1,2 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli segrevali 2 dni. Po analizi produkta s TLC smo ugotovili, da je prisotnega še nekaj antranilamida, zato smo zmes na oljni kopeli segrevali še dodatne 3 dni. Barva reakcijske zmesi se je spremenila iz rumene v temno rjavo. Analizo TLC smo ponovili in ugotovili, da je antranilamid še vedno prisoten. Vseeno smo se odločili za izolacijo produkta. Po končanem splošnem postopku sinteze smo spojino analizirali s TLC in ji posneli <sup>1</sup>H NMR spekter. Analizi sta pokazali, da imamo kompleksno zmes spojin. Tako je nismo uporabili za preverjanje antioksidativne kapacitete in sposobnosti kelacije kovinskih ionov.

#### 4.1.7. Poskus sinteze 2-(2,4,5-trihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (7)



**Slika 12:** Reakcijska shema sinteze 2-(2,4,5-trihidroksifenil)kinazolin-4(3H)-ona (spojine 7).

Za sintezo (slika 12) spojine 7 smo uporabili splošni postopek sinteze 2-substituiranih 4(3H)-kinazolinonov. Sintezo smo izvedli iz 136,00 mg antranilamida (1,0 mmol; 1 ekv.) in 184,95 mg 2,4,5-trihidroksibenzaldehida (1,2 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo na oljni kopeli segrevali 3 dni. Tudi v tem primeru smo opazili, da je zmes postala temne barve. Po analizi produkta s TLC smo ugotovili, da je prisotnega še nekaj antranilamida, vendar smo se tudi tokrat odločili, da nadaljujemo z izolacijo. Po končanem splošnem postopku sinteze smo spojino analizirali s TLC in ji posneli <sup>1</sup>H NMR spekter. Analizi sta pokazali, da imamo

kompleksno zmes spojin. Tako je nismo uporabili za preverjanje antioksidativne kapacitete in sposobnosti kelacije kovinskih ionov.

## **4.2. ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST REDUKCIJE DPPH RADIKALA**

### **4.2.1. Priprava raztopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH)**

Osnovno raztopino DPPH (25 mL; 700  $\mu$ M) smo pripravili v 25 mL merilni bučki. Najprej smo uporabili precizno tehtnico in v bučko natehtali 6,90 mg DPPH. Nato smo dodali približno 20 mL metanola. Pri pripravi osnovne raztopine je zelo pomembno, da se vijolični kristali DPPH popolnoma raztopijo. To smo dosegli tako, da smo bučko zaprli s steklenim zamaškom in pri sobni temperaturi sonicirali v ultrazvočni kopeli. Nato smo zamašek merilne bučke odprli, metanol dodali do oznake in z obrati premešali. Nastala je bistra temno vijolična raztopina DPPH, ki smo jo pred svetlobo zaščitili z aluminijasto folijo. Hranili smo jo v hladilniku (4-8  $^{\circ}$ C).

Delovno raztopino DPPH (5 mL; 140  $\mu$ M) smo pripravili v 10 mL penicilinki. Najprej smo odpipetirali 4 mL metanola in dodali 1 mL osnovne raztopine DPPH (700  $\mu$ M). Penicilinko smo nato pokrili s pokrovčkom in jo ovili z aluminijasto folijo. Delovno raztopino smo uporabili za ugotavljanje sposobnosti spojin za redukcijo DPPH radikala.

Delovni raztopini DPPH smo pred izvedbo DPPH testa posneli UV-Vis spekter in določili absorpcijski maksimum. Najprej smo v kiveto odpipetirali 1 mL metanola in z UV-Vis spektrofotometrom v območju 350-800 nm posneli absorpcijski spekter slepe (ozadja). Slepo smo odšteli. 1 mL metanola smo nato dodali 1 mL delovne raztopine DPPH (140  $\mu$ M) in znova posneli absorpcijski spekter. Absorpcijski maksimum delovne raztopine DPPH smo odčitali pri 517 nm. Z merjenjem sposobnosti spojin za redukcijo DPPH radikala pri 517 nm bomo tako dobili zanesljive rezultate.

### **4.2.2. Priprava raztopin spojin in standarda**

Za pripravo osnovnih raztopin spojin **1-5** in spojine **8** smo prav tako uporabili metanol. V 10 mL penicilinkah smo v 5 ml metanola pripravili 1-10 mM raztopine. Pri tem smo maso posamezne spojine, potrebno za pripravo določene koncentracije osnovne raztopine, izračunali s pomočjo enačbe:  $m = c \times V \times Mr$ . Po navadi se natehtana masa spojin ni skladala s

predvideno maso, zato smo morali za pripravo ustreznih koncentracij raztopin preračunati potreben volumen metanola. Pripravljene raztopine smo v ultrazvočni kopeli sonicirali tako dolgo, da so se spojine popolnoma raztopile. Nekatere spojine so v metanolu slabo topne. V tem primeru smo raztopinam dodali nekaj kapljic 0,1 M NaOH. Osnovne raztopine posameznih spojin smo redčili z metanolom in tako pripravili sedem različnih koncentracij vsake spojine, ki smo jih uporabili za meritve sposobnosti redukcije DPPH radikala oziroma določanje vrednosti EC<sub>50</sub>.

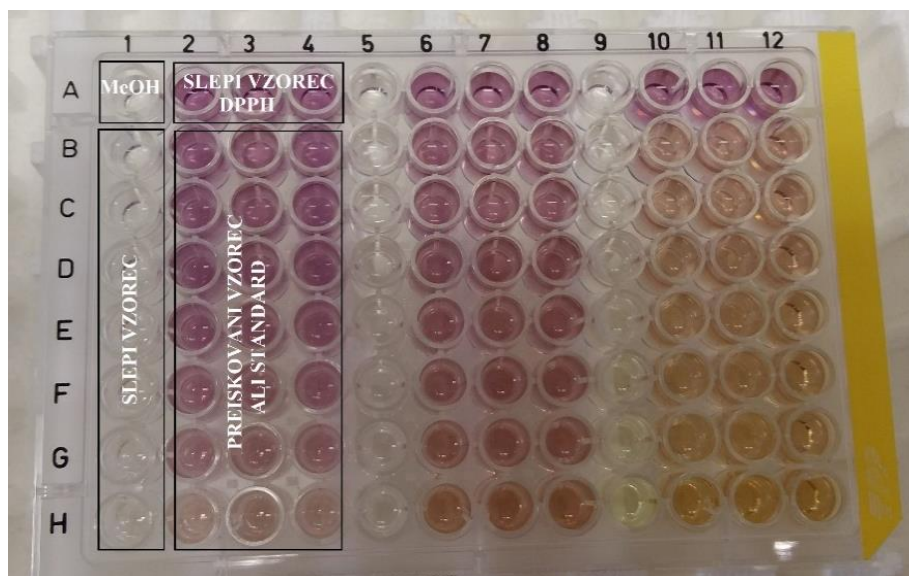
Za standard smo uporabili 1 mM raztopino kvercetina. Pripravili smo jo v metanolu, na enak način kot raztopine spojin. V 10 mL penicilinko smo natehtali 1,58 mg kvercetina, mu dodali 5,23 mL metanola in sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler ni nastala bistra raztopina. Z redčenjem raztopine v metanolu smo pripravili sedem koncentracij standarda. Te smo uporabili za meritve.

#### 4.2.3. Izvedba testa redukcije DPPH radikala

Test redukcije DPPH radikala smo izvedli na mikrotitrski ploščici. V vdolbinice ploščice smo nanесли po 150  $\mu$ L vseh sedmih različnih koncentracij posamezne spojine ali standarda in dodali 150  $\mu$ L delovne raztopine DPPH (140  $\mu$ M). Reakcijsko zmes smo nanašali v triplicatih, končni volumen pa je znašal 300  $\mu$ L. Spojine in DPPH smo pri tem redčili (1:1), zato so se njihove koncentracije prepolovile. Na mikrotitrsko ploščico smo nanесли tudi slepe vzorce in jih upoštevali pri izračunih EC<sub>50</sub>. Po nanosu reakcijskih zmesi smo mikrotitrsko ploščico inkubirali 90 min v temi in pri sobni temperaturi (preglednica VI, slika 13). Nato smo jo postavili v čitalec mikrotitrskih ploščic in pri valovni dolžini 517 nm izmerili absorbance.

**Preglednica VI:** Prikaz reakcijskih zmesi, ki smo jih nanašali na mikrotitrsko ploščico.

Reakcijska zmes	Sestava
Ozadje DPPH (metanol)	300 $\mu$ L metanola
Slepi vzorec DPPH	150 $\mu$ L DPPH + 150 $\mu$ L metanola
Slepi vzorec spojine (ozadje)	150 $\mu$ L spojine + 150 $\mu$ L metanola
Preiskovana spojina/standard	150 $\mu$ L spojine + 150 $\mu$ L DPPH



**Slika 13:** Prikaz nanašanja reakcijskih zmesi za testiranje treh spojin na mikrotitrsko ploščico. Najnižje koncentracije spojin smo nanесли na vrhu (vrstica B), najvišje pa na dnu ploščice (vrstica H).

#### 4.2.4. Izračun vrednosti $EC_{50}$

Najprej smo posameznim koncentracijam spojine izračunali povprečno vrednost treh izmerjenih absorbanc in odšteli absorbenco slepega vzorca (enačba 1):

$$\bar{A} \text{ (posamezne koncentracije spojine)} = \frac{A_1 + A_2 + A_3}{3} - A \text{ (slepega vzorca spojine)} \quad \text{Enačba 1}$$

Pri tem  $A_1$ ,  $A_2$  in  $A_3$  predstavljajo absorbance triplikata posamezne koncentracije spojine,  $A$  (slepi vzorec spojine) pa absorbenco posamezne koncentracije spojine brez DPPH. Iz dobljenih povprečnih vrednosti absorbanc posameznih koncentracij spojine smo nato izračunali delež DPPH, ki je v reakcijski zmesi ostal nereduciran (enačba 2):

$$\%DPPH = \frac{\bar{A} \text{ (posamezne koncentracije spojine)}}{\bar{A}_0 \text{ (slepega vzorca DPPH)}} \times 100 \quad \text{Enačba 2}$$

Pri tem je  $\bar{A}$  povprečna vrednost treh izmerjenih absorbanc posamezne koncentracije spojine,  $\bar{A}_0$  pa povprečna vrednost treh izmerjenih absorbanc slepega vzorca DPPH. Oboje smo izračunali po enačbi 1. Z uporabo programa Excel/spletnega programa MyCurveFit smo nato za vsako testirano spojino narisali graf odstotka nereducirane DPPH v odvisnosti od koncentracije preiskovane spojine. Z uporabo statistične funkcije STEYX smo izračunali tudi standardne napake (SN) predvidenih vrednosti  $y$  za vsak  $x$  regresijske analize (enačba 3) (31).

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



Pri tem  $n$  predstavlja velikost vzorca,  $y$  obseg odvisnih podatkovnih točk,  $x$  obseg neodvisnih podatkovnih točk,  $\bar{y}$  srednjo vrednost  $y$  in  $\bar{x}$  srednjo vrednost  $x$  (31).

Iz enačbe regresijske krivulje smo na koncu izračunali še koncentracijo spojine, ki reducira 50 % začetne koncentracije DPPH ( $EC_{50}$ ), in rezultat podali v obliki  $EC_{50} \pm SN$ .

### **4.3.UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA TITRACIJA SPOJIN Z BAKROM(II) IN ŽELEZOM(II)**

#### **4.3.1. Priprava pufra**

Uporabili smo 20 mM HEPES pufer s 146 mM NaCl ( $pH = 7,5$ ). V 500 mL čašo smo natehtali 2,38 g kisline HEPES in 4,27 g natrijevega klorida (NaCl). Ustrezne mase, potrebne za pripravo pufra, smo izračunali s pomočjo enačbe:  $m = c \times V \times Mr$ . Nato smo dodali magnet in čašo napolnili z MilliQ® prečiščeno vodo približno do oznake za 400 mL. Čašo smo postavili na magnetni mešalec in počakali, da sta se HEPES in NaCl popolnoma raztopila. Nastala je brezbarvna raztopina, katere pH smo izmerili s pomočjo pH metra. pH pripravljene pufra je znašal 5,22. Pufro smo nato po kapljicah dodajali 1 M NaOH, dokler nismo dosegli pH vrednosti 7,48. Vsebino čaše smo prenesli v 500 mL merilno bučko in dodali MilliQ® prečiščeno vodo do oznake. Pufer je bil tako pripravljen.

#### **4.3.2. Priprava osnovnih raztopin spojin**

Osnovne raztopine testnih spojin (3 mM) smo pripravili z raztapljanjem v DMSO. V penicilinke smo približno natančno natehtali 7,147 mg spojin **1**, **2** in **8** in 8,04 mg spojin **3**, **4** in **5**. Nato smo dodali 10 mL DMSO in sonicirali v ultrazvočni kopeli, da so se spojine popolnoma raztopile. Mase posameznih spojin, ki smo jih potrebovali za pripravo raztopin, smo izračunali s pomočjo enačbe:  $m = c \times V \times Mr$ . V primeru da se natehtana masa spojin ni skladala s predvideno maso, smo za pripravo 3 mM raztopin preračunali potreben volumen DMSO.

#### **4.3.3. Priprava osnovne raztopine $Cu^{2+}$ in $Fe^{2+}$ ionov**

Osnovno raztopino  $Cu^{2+}$  ionov (1 mM) smo pripravili v MilliQ® prečiščeni vodi. V 50 mL merilno bučko smo natehtali 8,53 mg  $CuCl_2 \times 2H_2O$  in bučko do oznake napolnili z MilliQ® prečiščeno vodo.

Raztopino  $\text{Fe}^{2+}$  ionov (10 mM) smo pripravili v raztopini askorbata.  $\text{Fe}^{2+}$  je na zraku nestabilen in oksidira v  $\text{Fe}^{3+}$ . Askorbat ga po oksidaciji reducira nazaj oziroma prepreči oksidacijo  $\text{Fe}^{2+}$  v  $\text{Fe}^{3+}$ . Najprej smo pripravili 2 mM raztopino askorbata. V 20 mL merilno bučko smo natehtali 7,05 mg askorbinske kisline in bučko do oznake napolnili s prečiščeno MilliQ<sup>®</sup> vodo. Nato smo v 10 mL penicilinko, ki smo jo predhodno zaščitili z aluminijasto folijo, natehtali 15,9 mg  $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  in dodali 8 mL pripravljene 2 mM raztopine askorbata. Tako smo dobili 10 mM raztopino  $\text{Fe}^{2+}$  ionov z askorbatom. Vedno smo delali s seže pripravljeno raztopino in jo porabili v eni uri.

Nato smo pripravili osnovno raztopino  $\text{Fe}^{2+}$  ionov (1 mM). Najprej smo v pufru pripravili 0,33 mM raztopino askorbata. V 10 mL penicilinko smo natehtali 0,58 mg askorbinske kisline in dodali 10 mL pripravljenega 20 mM HEPES puфра. Nato smo v novo penicilinko odpipetirali 1 mL pripravljene 10 mM raztopine  $\text{Fe}^{2+}$  ionov in 9 mL 0,33 mM raztopine askorbata.

Mase spojin, ki smo jih potrebovali za pripravo raztopin, smo izračunali s pomočjo enačbe:  $m = c \times V \times M_r$ . Natehtane mase so po navadi nekoliko odstopale. V teh primerih smo enačbo preobrnili in preračunali pravilen volumen topil.

#### **4.3.4. Izvedba UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z bakrom(II) in železom(II)**

V 2,5 mL kiveto iz kvarčnega stekla smo odpipetirali 2 mL 20 mM HEPES puфра in z UV-Vis spektrofotometrom v območju 240-500 nm posneli absorpcijski spekter ozadja. Ozadje smo odšteli in začeli z meritvami. Najprej smo posneli absorpcijski spekter spojine brez kovinskih ionov. V suho kiveto smo odpipetirali 2475  $\mu\text{L}$  20 mM HEPES puфра in 25  $\mu\text{L}$  3 mM testne spojine ter pri danih valovnih dolžinah posneli absorpcijski spekter. Nato smo v kiveto dodali določen volumen 1 mM raztopine  $\text{Cu}^{2+}$  ali  $\text{Fe}^{2+}$  ionov, s pipeto premešali, 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi in posneli absorpcijski spekter. Kovinske ione smo dodajali v isto kiveto in tako višali koncentracijo ionov. Po vsakem dodatku kovinskih ionov smo ponovno posneli absorpcijski spekter. Koncentracijo posameznih komponent v reakcijski mešanici smo izračunali s pomočjo enačbe  $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$ , pri čemer smo končni volumen reakcijske mešanice poenostavili na 2500  $\mu\text{L}$ . Meritve smo tako izvajali ob prisotnosti 30  $\mu\text{M}$  testne spojine in 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 35  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  in 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  ionih.

Za posamezne spojine smo v programu Excel narisali grafe odvisnosti absorbance od valovne dolžine. Krivuljo spojine brez kovinskih ionov in krivulje spojine v prisotnosti posameznih koncentracij kovinskih ionov smo združili v en graf. Morebiten nastanek kompleksov med spojino in  $\text{Cu}^{2+}$  ali  $\text{Fe}^{2+}$  ioni smo spremljali preko sprememb v absorpcijskem spektru. Iz spektra smo odčitali valovno dolžino, pri kateri smo zaznali premik absorpcijskega maksimuma oz. spremembo absorbance. Pri tej valovni dolžini smo odčitali absorbance in izračunali spremembo absorbance med absorbanco spojine in absorbanco nastalih kompleksov spojine s posameznimi koncentracami  $\text{Cu}^{2+}$  ali  $\text{Fe}^{2+}$  ionov. Za posamezno spojino smo izrisali titracijsko krivuljo (sprememba absorbance pri odčitani valovni dolžini v odvisnosti od molarnega razmerja  $\text{Cu}^{2+}$ /spojina oz.  $\text{Fe}^{2+}$ /spojina). Molarno razmerje  $\text{Cu}^{2+}$ /spojina oz.  $\text{Fe}^{2+}$ /spojina smo izračunali tako, da smo koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  ionov, pri katerih smo izvajali meritve, delili s koncentracijo testne spojine ( $30 \mu\text{M}$ ). Molarno razmerje med kovinskim ionom in testno spojino je tako znašalo: 0 (0), 0,08 (1:12), 0,17 (1:6); 0,25 (1:4); 0,33 (1:3); 0,5 (1:2); 0,67 (2:3); 0,83 (5:6); 1,0 (1:1); 1,16 (7:6); 1,33 (4:3); 1,67 (5:3) in 2,0 (2:1). Na titracijski krivulji smo poiskali točke, ki so nakazovale linearni trend, in skozi njih narisali premice. V točkah preloma smo nato na x-osi odčitali molarno razmerje in določili vezavno stehiometrijo med spojino in  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  ioni.

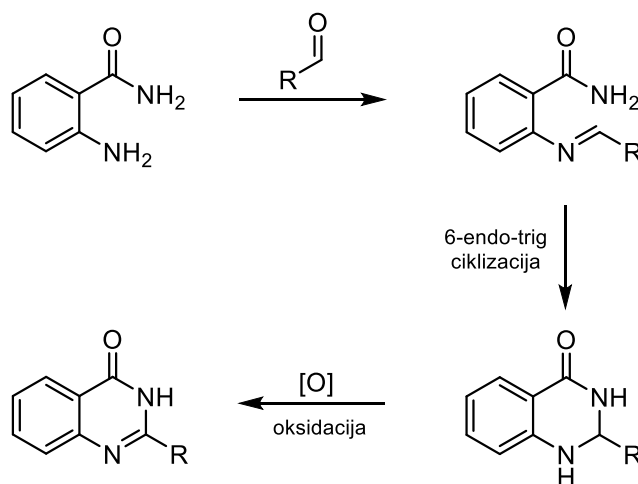
## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. KOMENTAR SINTEZE 2-SUBSTITUIRANIH 4(3H)-KINAZOLINONOV

Za sintezo spojin **1-7** smo uporabili postopek aerobne oksidativne ciklizacije v dimetil sulfoksidu (DMSO). Iz antranilamida in izbranih hidroksibenzaldehidov smo na ta način sintetizirali različne 2-substituirane 4(3H)-kinazolinone. Sinteza najverjetneje poteče v dveh korakih (slika 14):

1. Ciklizacija Schiffove baze do 2,3-dihidrokinazolin-4(1H)-ona.
2. Oksidacija nastalega 2,3-dihidrokinazolin-4(1H)-ona v prisotnosti kisika do ustreznega 2-substituiranega 4(3H)-kinazolinona in vode (32).

Hitrost reakcije določa prvi korak sinteze (ciklizacija), saj je najpočasnejši (37). Reakcija ciklizacije (zapiranja obroča) poteče z adicijo amidnega dušika na ogljik imina. Po Baldwinovih pravilih gre za 6-endo-trig ciklizacijo. Nastane namreč šestčlenski obroč (6-), vez, ki v procesu ciklizacije razpade, se nahaja v notranjosti obroča (-endo-), geometrija ogljika, na katerem se tvori nova vez, pa je trigonalna (-trig) (33).



**Slika 14:** Shematski prikaz korakov sinteze 2-substituiranih 4(3H)-kinazolinonov.

Obstajajo različne metode sinteze kinazolinonov. Običajno se uporablja tradicionalna metoda oksidativne ciklizacije Schiffovih baz iz aldehydov in *o*-antranilamidov, ki poteka v prisotnosti oksidantov. Za popolno sintezo so navadno potrebne visoke koncentracije oksidantov, kar vodi do nastanka velikih količin odpadnega materiala. Posledično so potrebni dolgotrajni postopki čiščenja nastalih produktov. Mi smo sintezo izvedli z uporabo aerobne oksidativne ciklizacije,

pri kateri namesto oksidantov v drugem koraku sinteze (oksidacija) nastopa kisik. Edini stranski produkt sinteze je tako voda. Poleg tega lahko sintezo izvedemo brez toksičnih baz in kovinskih katalizatorjev, zaradi česar je ta postopek okolju prijaznejši. Postopek sta prva preverjala Na Yeun Kim in Cheol-Hong Cheon. Ugotovila sta, da je izkoristek sinteze največji, ko ni prisotnih nukleofilnih katalizatorjev (natrijevega cianida, natrijevega jodida, kalijevega jodida) in molekularnih sit. Direktna sinteza, ko sta oba koraka (ciklizacija in oksidacija) potekla v eni stopnji sinteze (brez izolacije intermedijata 2,3-dihidrokinazolin-4(1*H*)-ona), je bila najuspešnejša (32). Odločili smo se, da tudi mi sintezo izvedemo v eni stopnji.

Na Yeun Kim in Cheol-Hong Cheon sta v svoji študiji ugotovila, da na sintezo v veliki meri vplivata tudi izbira topila in temperatura. Za najprimernejše topilo se je izkazal DMSO. Izkoristek sinteze je v tem topilu v primerjavi z drugimi topili (voda, etanol, 1,4-dioksan, dimetilformamid, toluen) znatno večji. Pri temperaturi 80 °C sinteza poteka zelo počasi, z dvigom temperature na 100 °C pa se poleg hitrosti poveča tudi izkoristek sinteze. V študiji so sintezo izvedli tudi pod argonovo atmosfero. Sinteza v tem primeru ni potekla, kar potrjuje dejstvo, da je zrak (atmosferski kisik) potreben kot končni oksidant za zaključek sinteze. Poleg tega sta ugotovila, da na sintezo ne vpliva izbira substrata (aldehida) (32).

Sintezo spojin **1-7** smo tako izvedli z uporabo aerobne oksidativne ciklizacije v DMSO pri temperaturi 100 °C. Sinteza spojin **1-5** je uspela, saj smo njihovo čistost in strukturo potrdili s TLC, NMR, MS in IR analizo. Reakcijske zmesi smo na 100 °C sprva segrevali 3 dni in nato produkte analizirali s TLC. Po analizi produktov smo ugotovili, da je reakcija sinteze spojin **2**, **3** in **5** potekla do konca. Nasprotno je bilo pri spojinah **1** in **4** prisotnega še nekaj antranilamida (prvega reaktanta). Medtem ko smo se v primeru sinteze spojine **1** odločili, da povečamo koncentracijo drugega reaktanta (salicilaldehida) v reakcijski zmesi (1,8 mmol; 1,8 ekv.) in zmes segrevamo dodatne tri dni, smo v primeru spojine **4** reakcijsko zmes le dodatno segrevali. Sinteza je v obeh primerih potekla do konca, pri čemer je bil izkoristek obeh reakcij podoben (okoli 70 %). Tako lahko sklepamo, da so uporabljene začetne koncentracije reaktantov ustrezne. Za uspešno sintezo kinazolinonov je bilo dovolj podaljšanje časa sinteze. Produkt spojine **5** je vseboval sledi DMSO, zato smo spojino od topila ločevali z ekstrakcijo. Izkoristek sinteze je bil zato nekoliko manjši (50,7 %).

Sinteza spojin **6** in **7** ni uspela. Reakcijski zmesi sta že po enem dnevu segrevanja na 100 °C spremenili barvo iz rumene v temno rjavo. Po analizi produkta s TLC smo v obeh primerih ugotovili, da je prisotnega še nekaj antranilamida, zato smo s segrevanjem nadaljevali še nekaj dni. Ko smo analizo TLC ponovili, smo ugotovili, da je antranilamid še vedno prisoten, a smo

se vseeno odločili za izolacijo produkta. Produkta smo analizirali s TLC in jima posneli  $^1\text{H}$  NMR spekter. Analizi sta pokazali, da imamo kompleksno zmes spojin. 2,3,4-trihidroksibenzaldehid in 2,4,5-trihidroksibenzaldehid, ki sta v reakcijah nastopala kot reaktanta sinteze spojin **6** in **7**, imata v svoji strukturi tri hidroksilne skupine. Med reakcijo v prisotnosti kisika je verjetno prišlo do njune oksidacije, kar je povzročilo spremembo barve reakcijske zmesi. Kisik je bil v teh dveh primerih dovolj močan oksidant, da je povzročil oksidacijo reaktantov, še preden sta le-ta reagirala z antranilamidom. Podaljšanje časa sinteze bi bilo nesmiselno, saj je reakcijska zmes postala temne barve že po enem dnevu segrevanja. S povišanjem temperature na  $120\text{ }^\circ\text{C}$  bi morda pospešili sintezo in se izognili oksidaciji reaktantov. Sinteza bi lahko bila uspešna tudi v primeru, če bi hidroksilne skupine na molekulah reaktantov zaščitili. Allais F. s sodelavci je hidroksilne skupine zaščitil z acetatom (peracetilacija). Postopek so izvedli pod argonovo atmosfero s pomočjo piridina in acetanhidrida ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ). Nastali produkt je nato kot reaktant sodeloval v reakciji sinteze. Po uspešni sintezi so acetat odščitili. Uporabili so aceton in  $3\text{ M HCl}$ . Na ta način so dobili željen produkt, pri čemer hidroksilne skupine na zraku niso oksidirale (34). Enak postopek bi lahko uporabili za sintezo spojin **6** in **7**. Ta postopek poteka v treh stopnjah. Poleg tega da je postopek daljši, izolacija posameznih intermediatov povzroči večje izgube (slabši izkoristki), več korakov pa zmanjša možnost uspešne sinteze.

## **5.2. ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST REDUKCIJE DPPH RADIKALA**

Sintetiziranim spojinam **1-5**, spojini **8** in standardu kvercetin su smo s testom redukcije DPPH radikala določili antioksidativno kapaciteto. Na mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami smo v triplicatih nanesti spojine ali standard in dodali ustrezne reagente. Uporabili smo različne koncentracije testiranih spojin, s katerimi smo se želeli v čim večji meri približati vrednosti  $\text{EC}_{50}$  posamezne spojine. Mikrotitrne ploščice smo inkubirali 90 minut in s spektrofotometričnim čitalcem izmerili absorbance pri  $517\text{ nm}$ . Izrisali smo grafe odstotka nereducirane DPPH v odvisnosti od koncentracije preiskovane spojine in iz enačbe linearne regresijske premice ali 4-parametrične krivulje na koncu izračunali še koncentracijo spojine, ki reducira 50 % začetne koncentracije DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ). Rezultate smo podali v obliki  $\text{EC}_{50} \pm$  standardna napaka (SN).

### 5.2.1. Standard kvercetin

Za standard smo uporabili nizkomolekularni antioksidant rastlinskega izvora kvercetin. Spada v skupino rastlinskih fenolnih spojin (flavonoidov) in je znan po svoji sposobnosti odstranjevanja oz. lovljenja radikalov. Kvercetin je izredno pomemben del prehrane ljudi. Bogati viri kvercetina so različne vrste sadja, zelenjave, rastlinskih listov in žitaric. Je eden najbolj poznanih flavonoidnih antioksidantov in se pogosto uporablja kot standard v testih določanja antioksidativne kapacitete. Kvercetin dokazano reducira DPPH radikal (35).

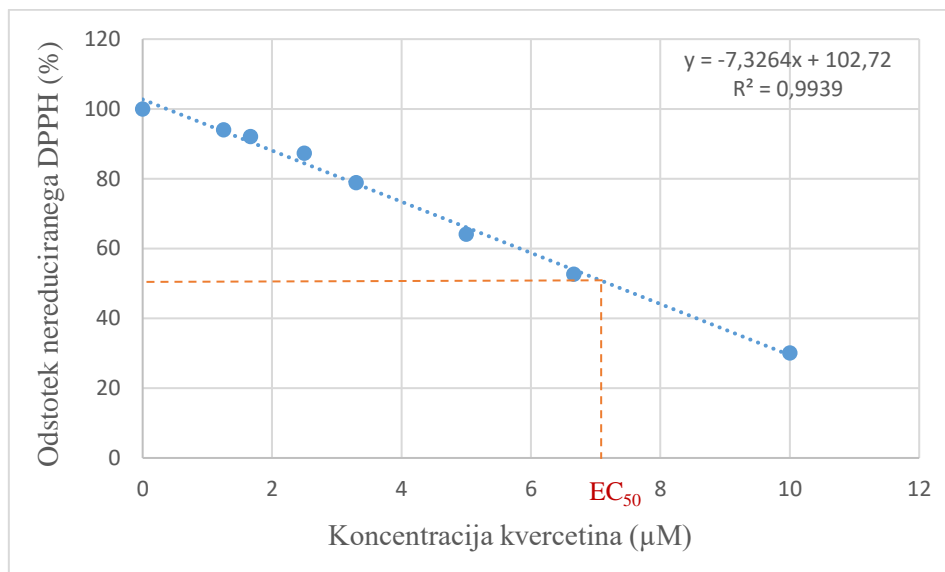
**Preglednica VII:** Rezultati meritev DPPH testa za standard kvercetin.

<b>Koncentracija kvercetina v reakcijski zmesi (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Koncentracija DPPH v reakcijski zmesi (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Absorbanca</b>	<b>Odstotek nereduciranega DPPH (%)</b>
<b>0,00</b>	70	0,566333	100,000
<b>1,25</b>	70	0,532667	94,055
<b>1,67</b>	70	0,521333	92,054
<b>2,50</b>	70	0,494667	87,346
<b>3,30</b>	70	0,446667	78,870
<b>5,00</b>	70	0,363000	64,097
<b>6,67</b>	70	0,298000	52,619
<b>10,00</b>	70	0,170667	30,135

Preglednica VII prikazuje izmerjene absorbance po 90-minutni inkubaciji reakcijske zmesi in izračunane odstotke nereduciranega DPPH radikala. Z višanjem koncentracije kvercetina se vedno več DPPH reducira, zaradi česar se manjša odstotek nereduciranega DPPH. Iz podatkov smo narisali graf odstotka nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije kvercetina (slika 15) in dobili padajočo linearno regresijsko premico. Pri tem je determinacijski koeficient ( $R^2$ ) znašal skoraj 1, kar pomeni, da se linearna trendna črta podatkom zelo dobro prilega. To je pomembno, saj je linearna odvisnost med odstotkom nereduciranega DPPH in koncentracijo antioksidanta nujna za enostaven in hkrati natančen izračun  $EC_{50}$  vrednosti (25).

Izračunana vrednost  $EC_{50}$  za standard kvercetin je znašala  $7,19 \pm 0,277 \mu\text{M}$  (slika 15). V raziskavah smo za kvercetin zasledili zelo širok razpon  $EC_{50}$  vrednosti. Gibljejo se vse od 95

nM do 226  $\mu\text{M}$ , za kar so zaslužni različni reakcijski pogoji (35). Najpogosteje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  za kvercetin znašajo od 5,26 do 9,77  $\mu\text{M}$  (35, 36, 39).



**Slika 15:** Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije kvercetina.

Raziskovalci za test redukcije DPPH radikala uporabljajo različna topila. Za najboljši prikaz antioksidativnega delovanja spojin v živih sistemih bi bilo optimalno, da se kot topilo uporablja voda. Izkazalo se je, da DPPH v vodi ni dobro topen. Poleg tega lahko v vodi agregira, zaradi česar je težje dostopen za antioksidante. Tako se antioksidativno kapaciteto navadno meri v organskih topilih, pri čemer metoda deluje enako dobro v metanolu ali v etanolu. Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  so z uporabo metanola in etanola višje kot v primeru, ko ju mešamo z bolj polarnimi topili (voda, DMSO, aceton). Raziskovalci metodo izvajajo pri različnih pH (5,0 do 6,5). Na rezultate DPPH testa lahko vpliva tudi prisotnost kovinskih ionov v reakcijski raztopini, pri čemer magnezijevi ioni povišajo, aluminijevi ioni pa znižajo vrednost  $\text{EC}_{50}$ . Količina DPPH, ki ga sprejme antioksidant, je neodvisna od začetne koncentracije DPPH radikala. Pomembno je le, da je molarno razmerje med DPPH in antioksidantom višje od stehiometrijskega razmerja (kvercetin : DPPH = 1:4) (35). Poleg tega je za boljšo zanesljivost meritev dobro, da absorbance niso večje od 1 (da je koncentracija DPPH v reakcijski raztopini dovolj nizka) (38). Najboljši način merjenja redukcije DPPH radikala je spremljanje reakcije do končne točke, ko je absorbanca konstantna. Takrat se vzpostavi dinamično ravnovesje med antioksidantom in DPPH radikalom (26). Kvercetin hitro reagira z DPPH, pri čemer reakcija končno točko doseže zelo hitro (v manj kot 30 minutah). Raziskovalci so ugotovili, da je pri merjenju antioksidativne sposobnosti kvercetina za redukcijo DPPH radikala 30 minut inkubacije dovolj za pravilno izvedbo testa, pri čemer daljši inkubacijski čas ne vpliva na rezultate meritev. Po drugi strani

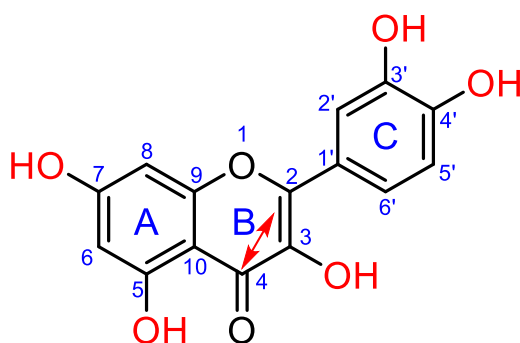


pa na rezultate vpliva temperatura. Ti so pri temperaturi 37 °C nekoliko višji kot pri sobni temperaturi (24 °C) (25, 35).

Čeprav so rezultati  $EC_{50}$  vrednosti kvercetina zaradi različnih reakcijskih pogojev med laboratoriji neprimerljivi, se naš rezultat ( $EC_{50} = 7,19 \pm 0,277 \mu\text{M}$ ) ujema z vrednostmi, ki smo jih najpogosteje zasledili v literaturi (35, 36). Tako smo sklepali, da je metoda ustrezna za določanje antioksidativne sposobnosti redukcije DPPH radikala in nadaljevali z meritvami na sintetiziranih spojinah **1-5** in spojini **8**.

Sposobnost fenolnih spojin za odstranjevanje radikalov je v veliki meri odvisna od njihove molekulske strukture. Majhne spremembe v strukturi molekule, predvsem število in položaj hidroksilnih funkcionalnih skupin ter konjugirane dvojne vezi, lahko znatno vplivajo na njihovo antioksidativno učinkovitost. Pri kvercetinu na antioksidativno kapaciteto vplivajo trije strukturni faktorji (slika 16):

- 3',4'-dihidroksilna (kateholna) skupina na obroču C je elektron donorska skupina in glavna tarča reaktivnih radikalov. Po reakciji kvercetina z radikali nastane fenoksilni radikal. Kateholna skupina je pomembna pri delokalizaciji elektrona po molekuli radikala, zaradi česar se poveča njegova stabilnost.
- 2,3-dvojna vez, konjugirana s 4-okso (karbonilno) skupino na obroču B, je vpletena v delokalizacijo elektrona iz obroča C.
- 3-, 5- in 7-hidroksilne skupine prav tako delujejo kot donorji elektrona in še povečajo antioksidativno kapaciteto kvercetina (35).

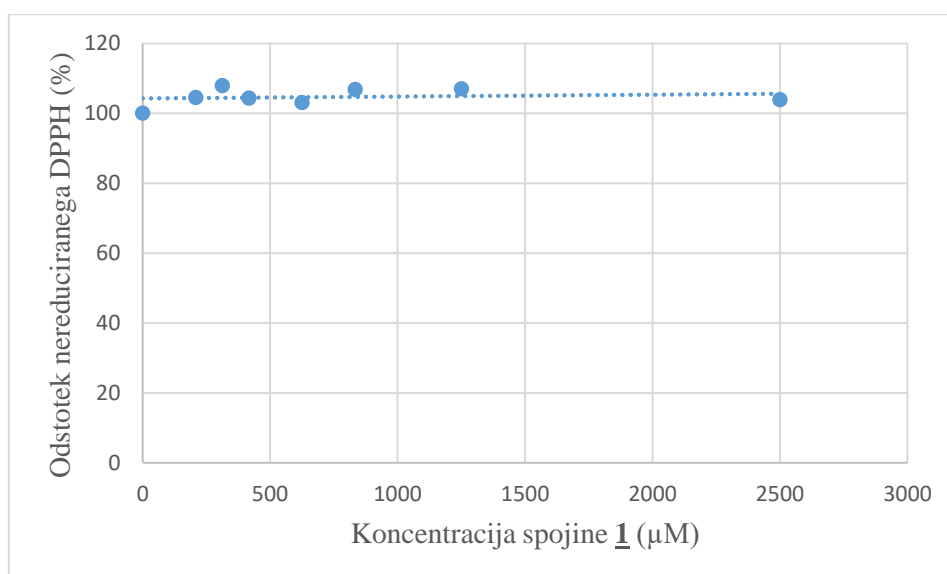


**Slika 16:** Prikaz strukturnih komponent kvercetina, ki pomembno vplivajo na antioksidativno delovanje.

## 5.2.2. Testirane spojine

Sposobnost redukcije DPPH radikala smo preverjali pri sintetiziranih spojinah **1-5** in spojin **8**. Rezultate smo prikazali v obliki odstotka nereducirane DPPH (%) v odvisnosti od koncentracije preiskovane spojine ( $\mu\text{M}$ ) (slike 17-22). Za risanje grafov in prikaz rezultatov spojin **1**, **2** in **8**, ki so izkazovale linearno odvisnost med koncentracijo in odstotkom nereduciranega DPPH, smo uporabili program Excel. V primeru spojin **3**, **4** in **5** se je meritvam najbolj prilagajala 4-parametrična logistična krivulja (nelinearna odvisnost), zato smo za risanje grafov, izračune in prikaz rezultatov teh spojin poleg Excela uporabili spletni program MyCurveFit. V preglednicah VIII-XIII so prikazani rezultati analiz posameznih spojin, in sicer enačbe regresijskih premic oz. logističnih krivulj, determinacijski koeficienti in izračunane vrednosti  $\text{EC}_{50}$  s standardno napako. V preglednici XIV so združene vrednosti  $\text{EC}_{50}$  testiranih spojin in standarda kvercetina.

### Rezultat analize spojine **1**

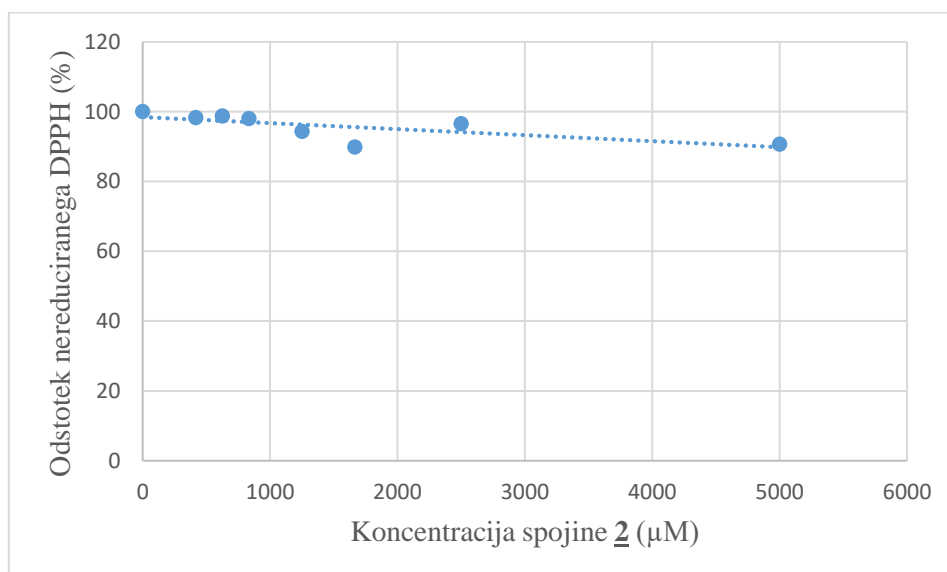


**Slika 17:** Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **1**.

**Preglednica VIII:** Prikaz enačbe in  $R^2$  regresijske premice ter  $\text{EC}_{50}$  spojine **1**.

Spojina <b>1</b>	
Enačba regresijske premice	$y = 0,0005 x + 104,28$
$R^2$	0,0281
$\text{EC}_{50} \pm \text{SN} (\mu\text{M})$	-

## Rezultat analize spojine 2

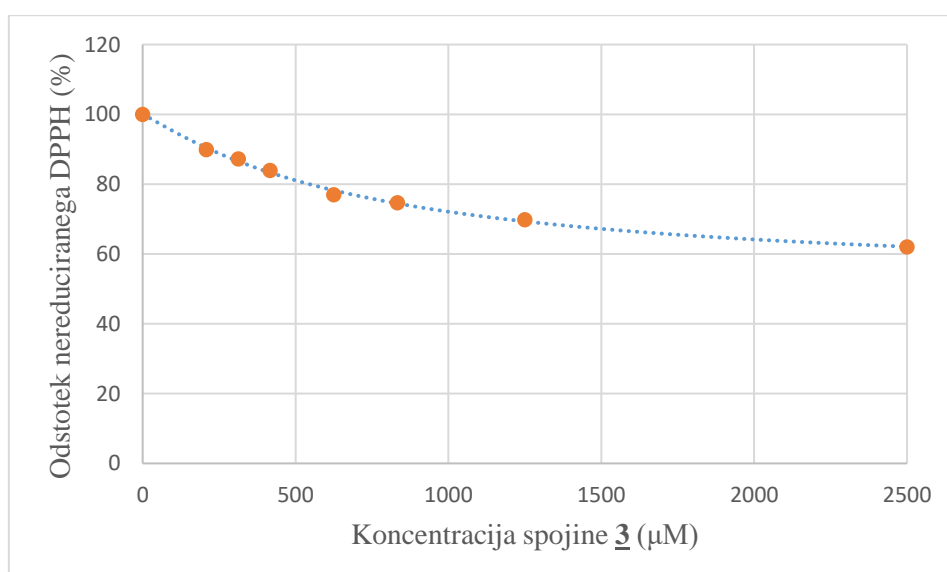


Slika 18: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 2.

Preglednica IX: Prikaz enačbe in  $R^2$  regresijske premice ter  $EC_{50}$  spojine 2.

Spojina <u>2</u>	
Enačba regresijske premice	$y = -0,0017 x + 98,45$
$R^2$	0,5234
$EC_{50} \pm SN$ (µM)	-

## Rezultat analize spojine 3

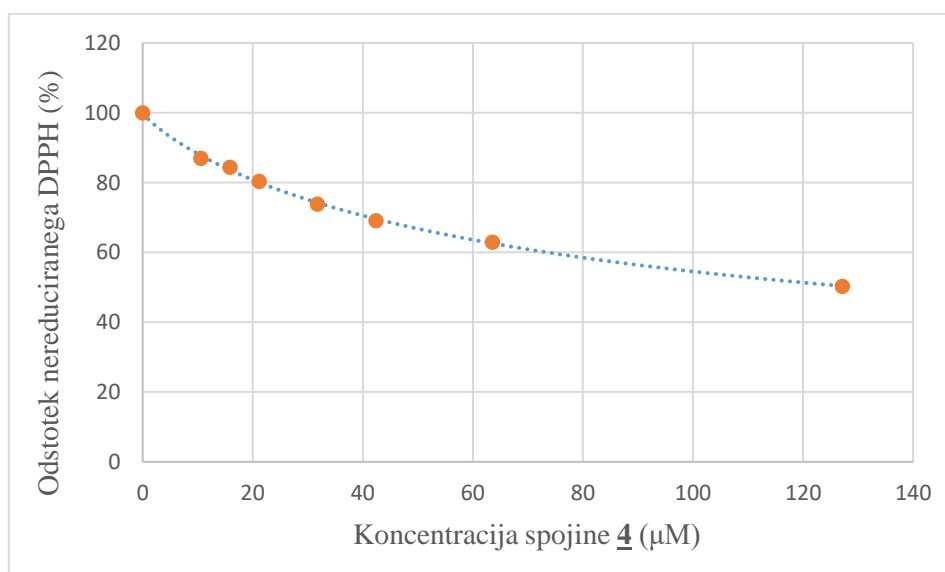


Slika 19: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 3.

**Preglednica X:** Prikaz enačbe in  $R^2$  logistične krivulje ter  $EC_{50}$  spojine **3**.

<b>Spojina 3</b>	
<b>Enačba 4-parametrične logistične krivulje</b>	$y = 52,21081 + \frac{99,97388 - 52,21081}{1 + \left(\frac{x}{736,0427}\right)^{1,0987}}$
<b><math>R^2</math></b>	0,9970
<b><math>EC_{50} \pm SN</math> (<math>\mu M</math>)</b>	-

**Rezultat analize spojine 4**

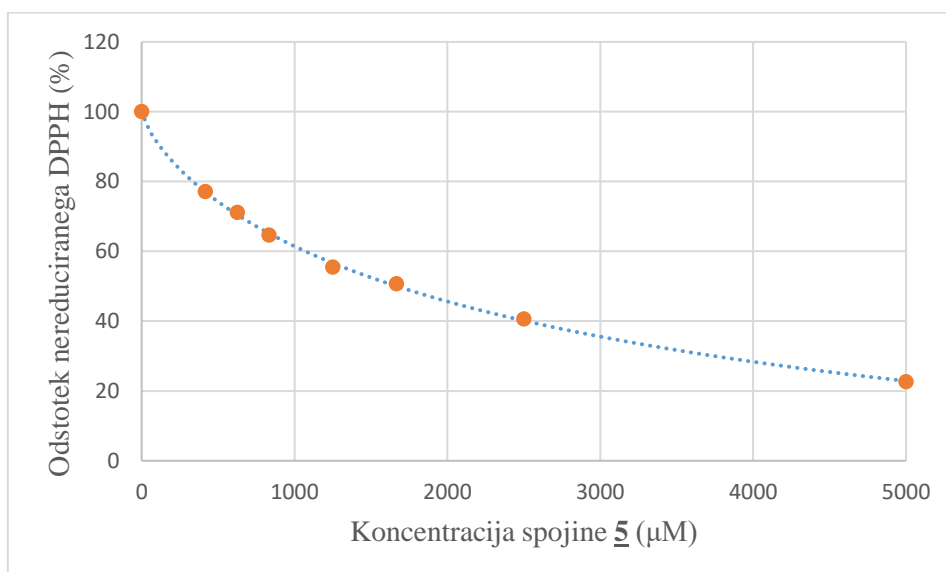


**Slika 20:** Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **4**.

**Preglednica XI:** Prikaz enačbe in  $R^2$  logistične krivulje ter  $EC_{50}$  spojine **4**.

<b>Spojina 4</b>	
<b>Enačba 4-parametrične logistične krivulje</b>	$y = 18,60934 + \frac{99,95935 - 18,60934}{1 + \left(\frac{x}{76,5198}\right)^{0,8768894}}$
<b><math>R^2</math></b>	0,9989
<b><math>EC_{50} \pm SN</math> (<math>\mu M</math>)</b>	129,994 $\pm$ 37,7135

## Rezultat analize spojine 5

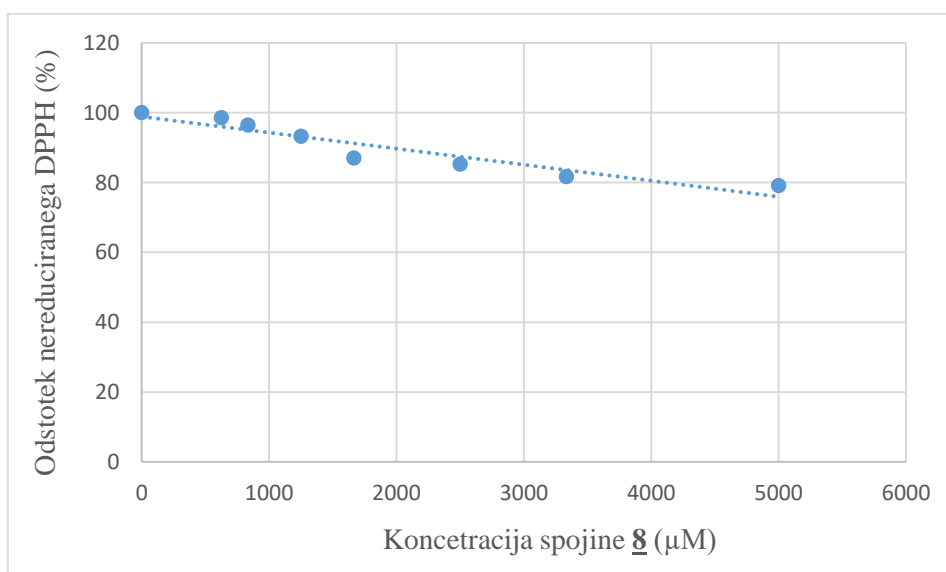


Slika 21: Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 5.

Preglednica XII: Prikaz enačbe in  $R^2$  logistične krivulje ter  $EC_{50}$  spojine 5.

Spojina <u>5</u>	
Enačba 4-parametrične logistične krivulje	$y = -31,23112 + \frac{100,0425 + 31,23112}{1 + \left(\frac{x}{3141,32}\right)^{0,7654568}}$
$R^2$	0,9993
$EC_{50} \pm SN$ (µM)	1668,27 ± 619,91

## Rezultat analize spojine 8



**Slika 22:** Odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **8**.

**Preglednica XIII:** Prikaz enačbe in  $R^2$  regresijske premice ter  $EC_{50}$  spojine **8**.

<b>Spojina 8</b>	
<b>Enačba regresijske premice</b>	$y = 0,0046 x + 98,909$
<b><math>R^2</math></b>	0,8966
<b><math>EC_{50} \pm SN</math> (<math>\mu M</math>)</b>	$10\ 632,39 \pm 601,4428$

**Preglednica XIV:** Vrednosti  $EC_{50}$  za testirane spojine in standard kvercetin.

<b>Spojina</b>	<b><math>EC_{50} \pm SN</math> (<math>\mu M</math>)</b>
<b><u>1</u></b>	Ne reducira DPPH radikala
<b><u>2</u></b>	Ne reducira DPPH radikala
<b><u>3</u></b>	Ne reducira DPPH radikala
<b><u>4</u></b>	$129,994 \pm 37,7135$
<b><u>5</u></b>	$1668,27 \pm 619,91$
<b><u>8</u></b>	$10\ 632,39 \pm 601,4428$
<b>Kvercetin</b>	$7,19 \pm 0,277$

### 5.2.3. Komentar rezultatov redukcije DPPH radikala

S testom redukcije DPPH radikala smo preverili antioksidativno kapaciteto izbranih 2-substituiranih 4(3H)-kinazolinonov (spojin **1-5** in spojine **8**). Ugotavljali smo njihovo sposobnost za redukcijo radikalov in prekinitve verižnih radikalskih reakcij. DPPH radikal namreč oponaša delovanje reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (37). Rezultate smo podali z vrednostjo  $EC_{50}$ , pri čemer nižja vrednost pomeni boljšo antioksidativno kapaciteto kinazolinona. Zanimalo nas je, kako struktura, število in položaj hidroksilnih skupin ter prisotnost metoksi skupine vplivajo na njihovo antioksidativno kapaciteto. Rezultate spojin (preglednica XIV) smo primerjali s polifenolnim standardom kvercetinom.

Za fenolne spojine je znano, da zlahka donirajo vodikove atome. DPPH radikal (DPPH $\cdot$ ) se z odtegnitvijo vodikovega atoma fenolni spojini (PheOH) reducira do DPPH-H (razbarvanje vijolične barve) /9/. Pri tem nastane fenoksilni radikal (PheO $\cdot$ ), ki je zaradi delokalizacije nesparjenih elektronov po fenilnem obroču razmeroma dobro stabilen. Resonančna stabilizacija radikala znatno pripomore k antioksidativni aktivnosti fenolne spojine. Novonastali radikal tako

ni dovolj reaktiven, da bi sprožil nadaljevanje verižne radikalske reakcije. PheO<sup>•</sup> lahko navadno reagira z novo molekulo DPPH radikala. To je odvisno od stehiometrijskega razmerja PheOH : DPPH, ki nam pove, koliko molekul DPPH lahko reducira ena molekula fenolne spojine (35).



Na začetku smo pripravili 1200  $\mu\text{M}$  izhodni raztopini spojin **1** in **2** in nato z redčenjem v metanolu pripravili po 7 različnih koncentracij spojin za izvedbo testa. Ugotovili smo, da spojini pri tako nizkih koncentracijah nimata antioksidativnih lastnosti, zato smo test ponovili z uporabo veliko višjih koncentracij. Pripravili smo 5000  $\mu\text{M}$  raztopino spojine **2** in 10.000  $\mu\text{M}$  raztopino spojine **3**. Spojini se v metanolu tokrat nista popolnoma raztopili, zato smo dodali nekaj kapljic 0,1 M NaOH, da sta nastali bistri raztopini. Pripravili smo redčitve in pri višjih koncentracijah ponovno izvedli test. Glede na to, da imajo testirane spojine podobne strukture, smo se odločili, da tudi pri testiranju spojin **3**, **4**, **5**, in **8** uporabimo zelo visoke koncentracije. Tako smo pripravili 5000  $\mu\text{M}$  raztopino spojine **3**, 5000  $\mu\text{M}$  raztopino spojine **4**, 10.000  $\mu\text{M}$  raztopino spojine **5** in 10.000  $\mu\text{M}$  raztopino spojine **8**. V vseh primerih smo imeli pri pripravi tako visokih koncentracij spojin (velika masa spojine (6,706 – 13,412 mg) v majhnem volumnu metanola (5 mL)) težavo s topnostjo, zato smo dodali nekaj kapljic 0,1 M NaOH in nastale so bistre raztopine. Spojina **4** je pri visokih koncentracijah zelo hitro reagirala, zato smo test ponovili pri nižjih koncentracijah (najvišja razredčina je znašala 254,25  $\mu\text{M}$ ).

Za enostaven in hkrati natančen izračun vrednosti  $\text{EC}_{50}$  je pomembna linearna odvisnost med odstotkom nereduciranega DPPH in koncentracijo fenolne spojine (25). Medtem ko pri spojinah **1** in **2** ni odvisnosti med odstotkom nereduciranega DPPH in koncentracijo spojine (ne reducirata DPPH), smo pri spojini **8** zasledili linearno odvisnost ( $R^2 > 0,90$ ). V primeru spojin **3**, **4** in **5** odvisnost ni linearna. Oblika krivulje kaže na to, da poteka reakcija med fenolno spojino in DPPH reverzibilno. Nastali fenoksilni radikal je začel oksidirati reducirano obliko DPPH (DPPH-H) in reakcija je začela potekati v obratni smeri. Na koncu reakcija doseže plato, kar pomeni, da se je najverjetneje vzpostavilo ravnotežje. Težavo z linearnostjo bi lahko rešili tako, da bi test ponovili z uporabo nižjih koncentracij, najvišje koncentracije (točke, ki niso del linearne območja) pa bi izpustili. V našem primeru bi to bilo nesmiselno, saj so omenjene fenolne spojine zelo šibki antioksidanti in pri nižjih koncentracijah ne reducirajo niti 50 % začetne koncentracije DPPH (z ekstrapolacijo bi dobili napačne rezultate). Ugotovili smo, da se točke prilegajo 4-parametrični logistični krivulji ( $R^2 > 0,99$ ). Iz enačbe krivulje smo izračunali  $\text{EC}_{50}$  s standardnimi napakami in tako dobili najbolj verjetne rezultate (najmanjša napaka).

Iz preglednice XIV je razvidno, da so testirane spojine mnogo slabši antioksidanti kot standard kvercetin ( $EC_{50} = 7,19 \pm 0,277$ ). Med njimi ima najboljšo antioksidativno kapaciteto spojina **4** ( $EC_{50} = 129,994 \pm 37,7135$ ), ki ima vrednost  $EC_{50}$  večjo od kvercetina za dva velikostna reda. Sledi ji spojina **5** ( $EC_{50} = 1668,27 \pm 619,91$ ), ki ima  $EC_{50}$  vrednost večjo od kvercetina za tri velikostne rede, in spojina **8** ( $EC_{50} = 10.632,39 \pm 601,4428$ ), ki ima  $EC_{50}$  vrednost večjo od kvercetina za štiri velikostne rede.  $EC_{50}$  vrednost spojine **8** smo izračunali z ekstrapolacijo linearne regresijske premice, saj se je absorbanca pri najvišji koncentraciji (5000  $\mu$ M) po 90-minutni inkubaciji zmanjšala le za 21 %. Vse tri omenjene spojine imajo v primerjavi s kvercetinom večji  $EC_{50}$ , torej manjšo antioksidativno kapaciteto. Pri tem je potrebno poudariti, da je  $EC_{50}$  vrednost spojin **5** in **8** večja od 1000  $\mu$ M, kar pomeni, da sta spojini zelo šibka antioksidanta oz. antioksidativne aktivnosti sploh nimata (39). Spojini **1** in **2** tudi pri najvišjih koncentracijah ne reducirata DPPH radikala, zato sklepamo, da nimata antioksidativnih lastnosti. V primeru spojine **3** se absorbanca pri najvišji koncentraciji (2500  $\mu$ M) po 90-minutni inkubaciji zmanjša le za 38 %. Nato reakcija doseže plato (absorbanca ostane konstantna), zaradi česar je vrednost  $EC_{50}$  nesmiselno računati. Sklepali smo, da tudi spojina **3** nima antioksidativnih lastnosti. Iz rezultatov smo torej ugotovili, da od testiranih spojin le spojina **4** izkazuje zmerno antioksidativno kapaciteto.

Vse testirane spojine vsebujejo eno hidroksilno skupino, ki je vezana na različnih mestih aromatskega obroča. Medtem ko imajo spojine **1**, **2** in **8** na aromatski obroč vezano le hidroksilno skupino, je pri spojinah **3**, **4** in **5** na različnih mestih poleg hidroksilne skupine vezana še metoksi skupina.

Pri spojini **1** je hidroksilna skupina vezana na *orto* mestu, pri spojini **2** na *meta* mestu, pri spojini **8** pa na *para* mestu aromatskega obroča. Nobena od spojin ne deluje kot antioksidant, kar pomeni, da ena hidroksilna skupina (ne glede na položaj) ni dovolj za redukcijo radikalov in prekinitev verižnih radikalskih reakcij. To se sklada z ugotovitvami študije Bendary E. in sodelavcev, ki so dokazali, da monofenoli (ena hidroksilna skupina) v primerjavi s polifenoli (več hidroksilnih skupin) izkazujejo veliko slabšo antioksidativno delovanje (37).

Mathew S. in sodelavci so v svoji raziskavi ugotovili, da antioksidativno kapaciteto, poleg uvedbe druge hidroksilne skupine na aromatski obroč, poveča tudi substitucija z metoksi skupino (40). Spojina **3** ima hidroksilno skupino vezano na *orto* mesu in metoksi skupino na *para* mestu (oziroma na *meta* mestu glede na hidroksilno skupino), spojina **4** ima hidroksilno skupino prav tako vezano na *orto* mestu in metoksi skupino na nasprotno ležečem *meta* mestu (*para* mestu glede na hidroksilno skupino), spojina **5** pa ima hidroksilno skupino vezano na



*meta* mestu in metoksi skupino na *para* mestu (*orto* mestu glede na hidroksilno skupino). Metoksi skupina je elektron donorska, torej zmanjša disociacijsko energijo –O–H vezi in hidroksilni skupini omogoči, da lažje odda vodikov atom radikal. Metoksi skupina nato resonančno stabilizira nastali fenoksilni radikal, zaradi česar se poveča antioksidativna kapaciteta spojine. Naši rezultati kažejo, da ima največjo antioksidativno kapaciteto spojina **4**, ki ima metoksi skupino vezano na *para* mestu glede na hidroksilno skupino. Spojina **5**, ki ima metoksi skupino vezano na *orto* mestu glede na hidroksilno skupino, pa izkazuje slabše antioksidativno delovanje. Spojina **3** z metoksi skupino vezano na *meta* mestu glede na hidroksilno skupino ne deluje kot antioksidant. Naš rezultat je potrdil, da prisotnost metoksi skupine poveča elektronsko gostoto na aromatskem obroču in s tem antioksidativno kapaciteto kinazolinonov, saj sta spojini **4** in **5** bolj aktivni od spojin **1**, **2** in **8**, ki vsebujejo le hidroksilno skupino. Medtem ko spojini **4** in **5** (*para* in *orto* mesto) izkazujeta antioksidativno delovanje, spojina **3** (*meta* mesto) ne deluje kot antioksidant, kar nam pove, da je pomemben tudi položaj metoksi skupine glede na hidroksilno skupino. Ali H. M. in ostali so ugotovili, da mora biti metoksi skupina vezana na *orto* ali *para* mestu glede na hidroksilno skupino, da deluje kot močna elektron donorska skupina (spojini **4** in **5**). Nasprotno metoksi skupina na *meta* mestu deluje kot šibka elektron donorska skupina in ne poveča antioksidativne kapacitete (spojina **3**) (41).

Z DPPH testom smo ugotovili, da naše spojine ne reducirajo DPPH radikala (spojine **1**, **2**, **3**, **8**) oz. so slabši reducenti kot standard kvercetin (spojini **4** in **5**). S testom redukcije DPPH radikala dobimo informacijo o reaktivnosti fenolne spojine z enim samim radikalom (DPPH radikalom). Test tako predstavlja le eno od možnosti, s katerimi ugotavljamo, ali spojine delujejo kot antioksidanti. Antioksidanti delujejo na različne načine (različni mehanizmi delovanja), zato z uporabo ene metode ne moremo z gotovostjo trditi, da spojina ne deluje kot antioksidant (kot v našem primeru). Za ugotavljanje celokupne antioksidativne kapacitete spojin bi bila potrebna uporaba več različnih metod (vsaj dve različni metodi), s katerimi bi preverjali več različnih mehanizmov antioksidativnega delovanja. Poleg tega antioksidativno kapaciteto spojin s testom redukcije DPPH radikala preverjamo *in vitro*, pri čemer ne upoštevamo farmakokinetičnih značilnosti spojin *in vivo*. Tudi če bi ugotovili antioksidativno kapaciteto spojine *in vitro*, to ne pomeni, da bi imela spojina antioksidativne učinke tudi *in vivo* (40).

### 5.3. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA TITRACIJA SPOJIN Z BAKROM(II) IN ŽELEZOM(II)

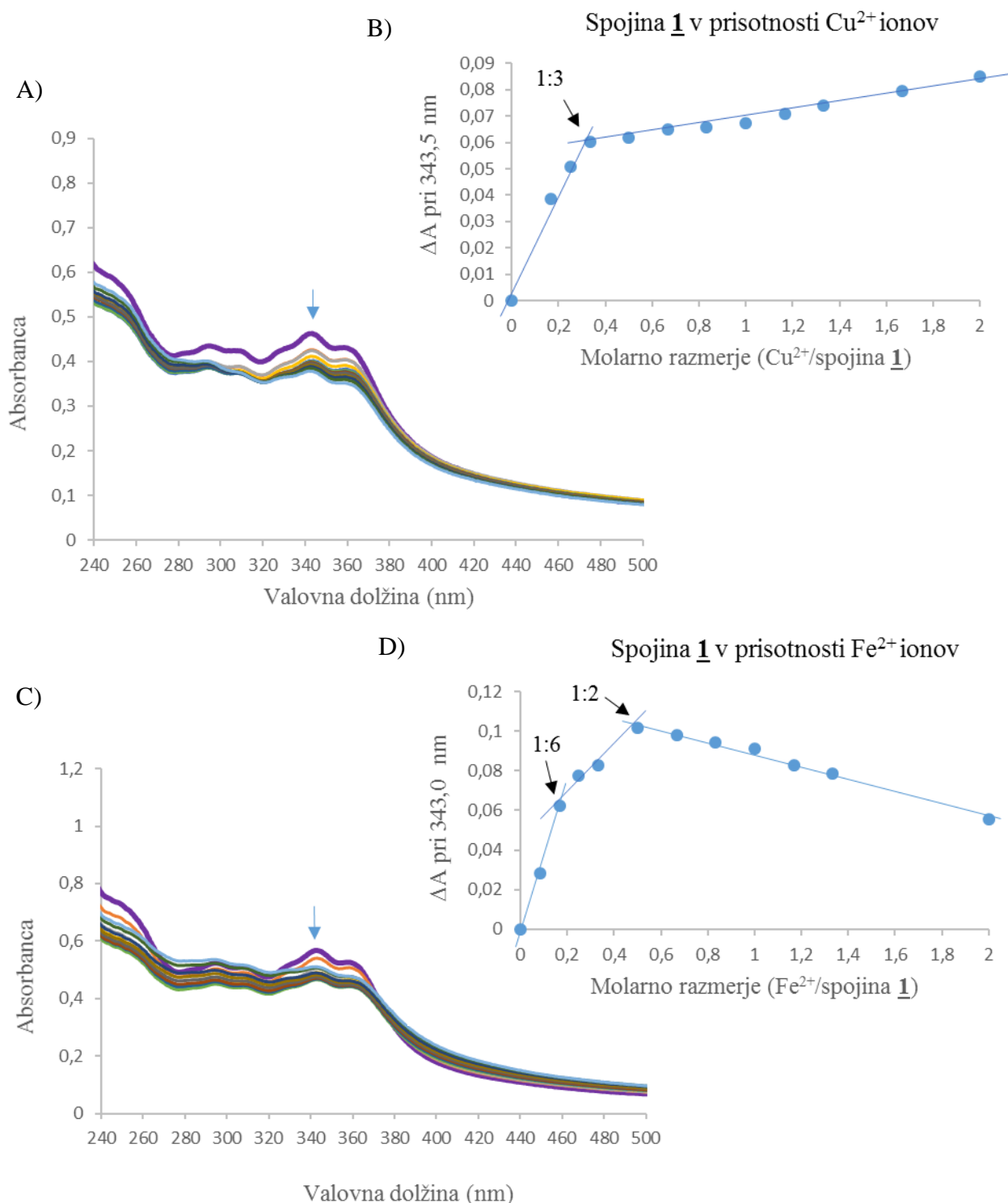
Pomemben mehanizem antioksidativnega delovanja je kelacija bakrovih in železovih ionov. Kelatorji so v primerjavi z reducenti (lovilci radikalov) včasih celo uspešnejši pri zaščiti organizma pred oksidativnim stresom. Z vezavo bakrovih in železovih ionov v telesu zmanjšajo njihovo razpoložljivost in jim preprečijo sodelovanje v redoks reakcijah (Fentonova, Haber-Weissova reakcija) (10, 28).

Z UV-Vis spektrofotometrično titracijo smo želeli preučiti sposobnost sintetiziranih spojin **1-5** in spojine **8** za tvorbo kelatnih kompleksov z bakrom(II) oz. železom(II). V primeru nastanka kompleksa je spojina (kelator oz. ligand) donor elektronov in se na centralni kovinski kation, ki elektrone sprejema, veže s koordinacijsko vezjo. Najpogosteje ima  $\text{Fe}^{2+}$  koordinacijsko število 6,  $\text{Cu}^{2+}$  pa koordinacijsko število 4. To pomeni, da se  $\text{Fe}^{2+}$  na kelatorje, ki so enakomerno razporejeni okoli njega, veže s šestimi koordinacijskimi vezmi,  $\text{Cu}^{2+}$  pa s štirimi. Na koordinacijsko število vpliva vrsta (enovezni ali večvezni) in velikost liganda. Večji kot so ligandi, manj se jih lahko veže na kovinski ion. Kelatorji so polidentatni (večvezni) ligandi, kar pomeni, da se na kation železa ali bakra koordinativno vežejo z več atomi (12, 42).

#### 5.3.1. Testirane spojine

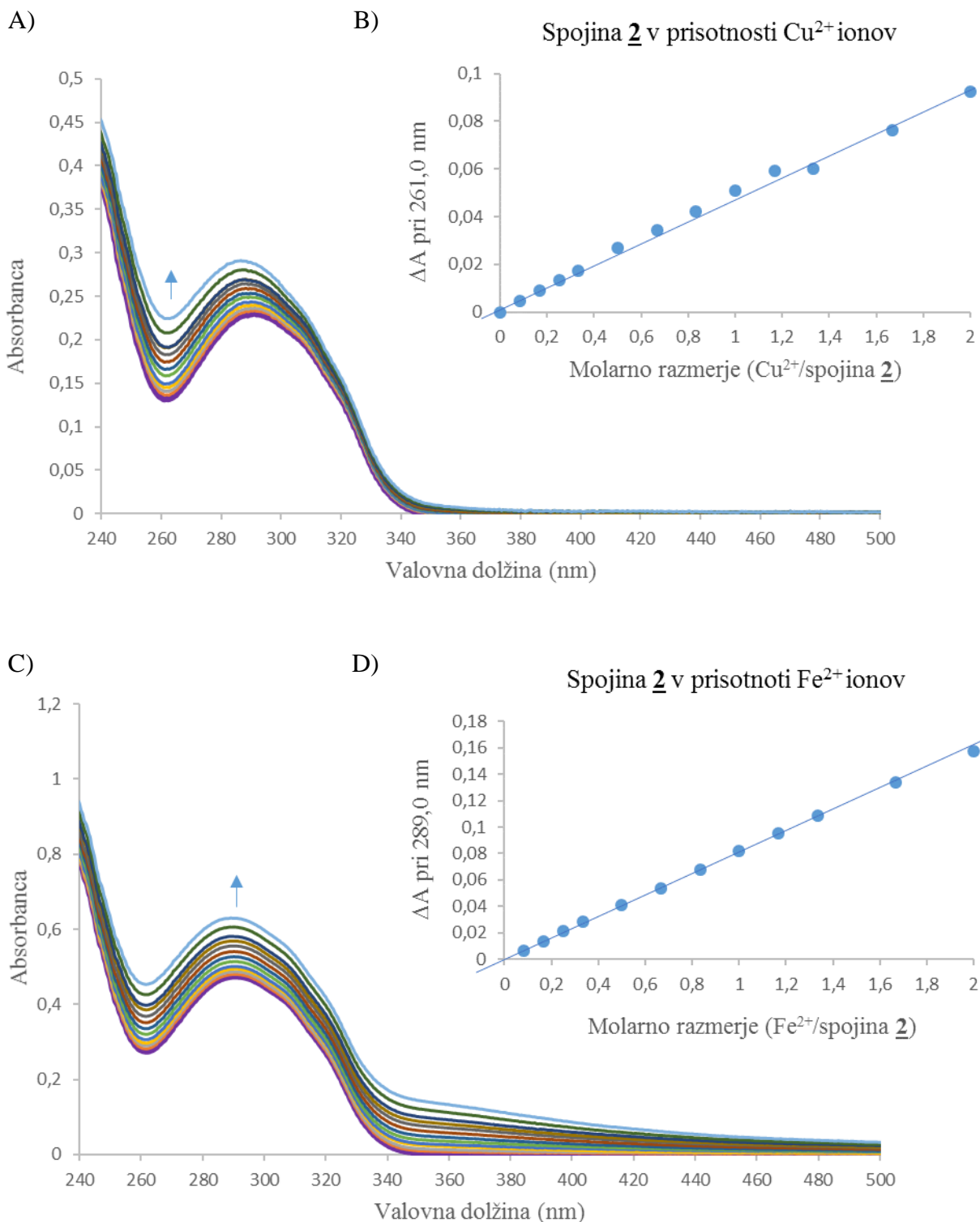
Meritve smo izvedli v 20 mM HEPES pufru s pH 7,5. Najprej smo posneli absorpcijske spektre za posamezne spojine in nato še absorpcijske spektre spojin v prisotnosti določene koncentracije  $\text{Fe}^{2+}$  oz.  $\text{Cu}^{2+}$  ionov. Absorpcijske spektre za posamezno spojino smo združili v en graf (slike 23A, 23C, 24A, 24C, 25A, 25C, 26A, 26C, 27A, 27C, 28A in 28C). Za boljši prikaz rezultatov smo absorpcijski spekter posamezne spojine brez kovinskih ionov na grafih odebelili in označili z vijolično barvo. Morebiten nastanek kompleksov med spojino in  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  ioni smo zaznali kot spremembo v absorpcijskem spektru. Iz spektra smo odčitali valovno dolžino, pri kateri smo zaznali največji premik absorpcijskega maksimuma/minimuma oz. največjo spremembo absorbance. To valovno dolžino smo označili z modro puščico. Narisali smo titracijske krivulje (slike 23B, 23D, 24B, 24D, 25B, 25D, 26B, 26D, 27B, 27D, 28B in 28D). V primeru, da spojina kelira  $\text{Fe}^{2+}$  oz.  $\text{Cu}^{2+}$  ione, smo določili vezavno stehiometrijo  $\text{Cu}^{2+}$ /spojina oz.  $\text{Fe}^{2+}$ /spojina.

## Rezultati analize spojine 1



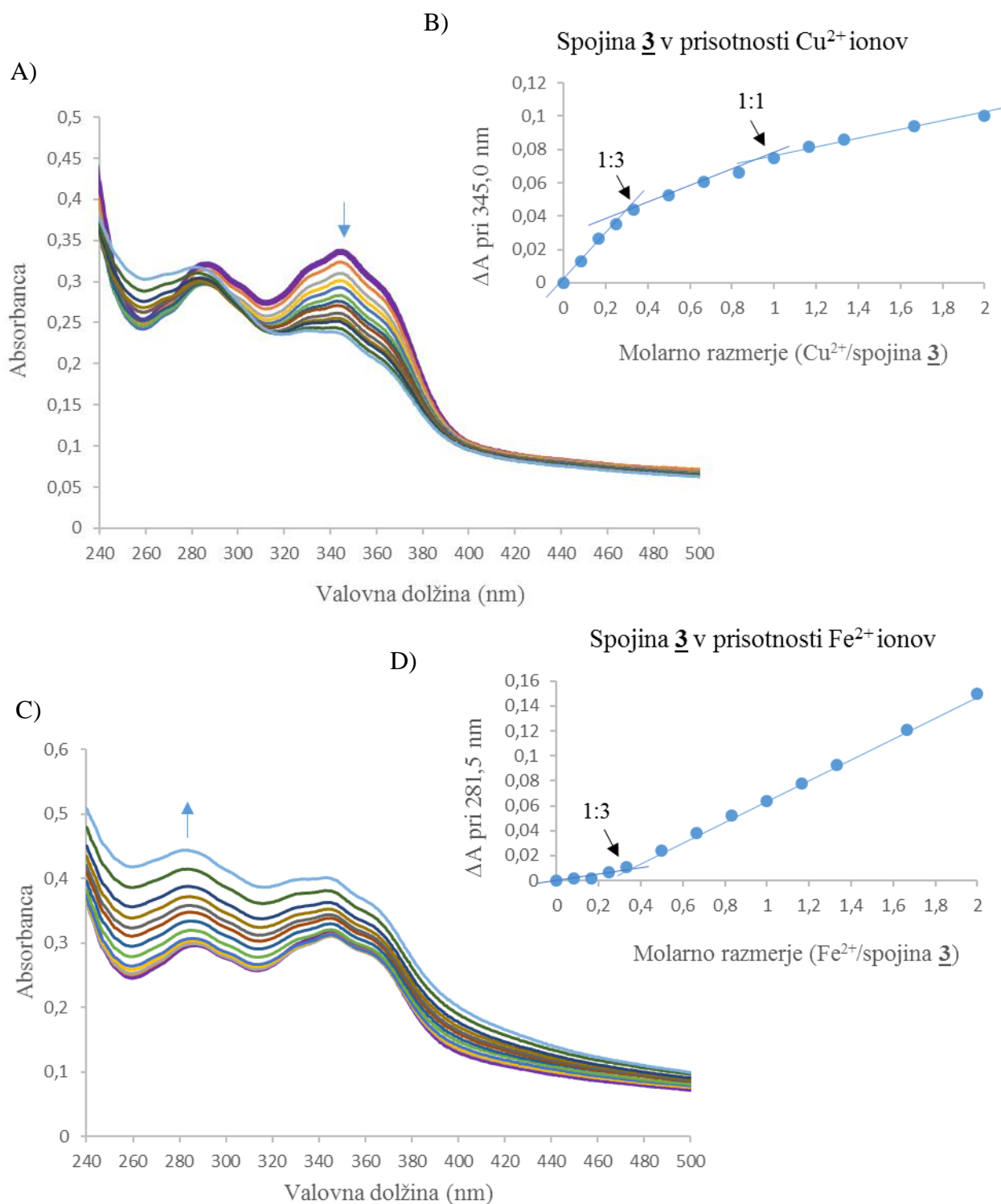
**Slika 23:** A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine 1 v prisotnosti 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . B) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 343,5 nm v odvisnosti od molarne razmerja  $\text{Cu}^{2+}$ /spojina. C) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine 1 v prisotnosti 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ . D) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 343,0 nm v odvisnosti od molarne razmerja  $\text{Fe}^{2+}$ /spojina.

## Rezultati analize spojine 2



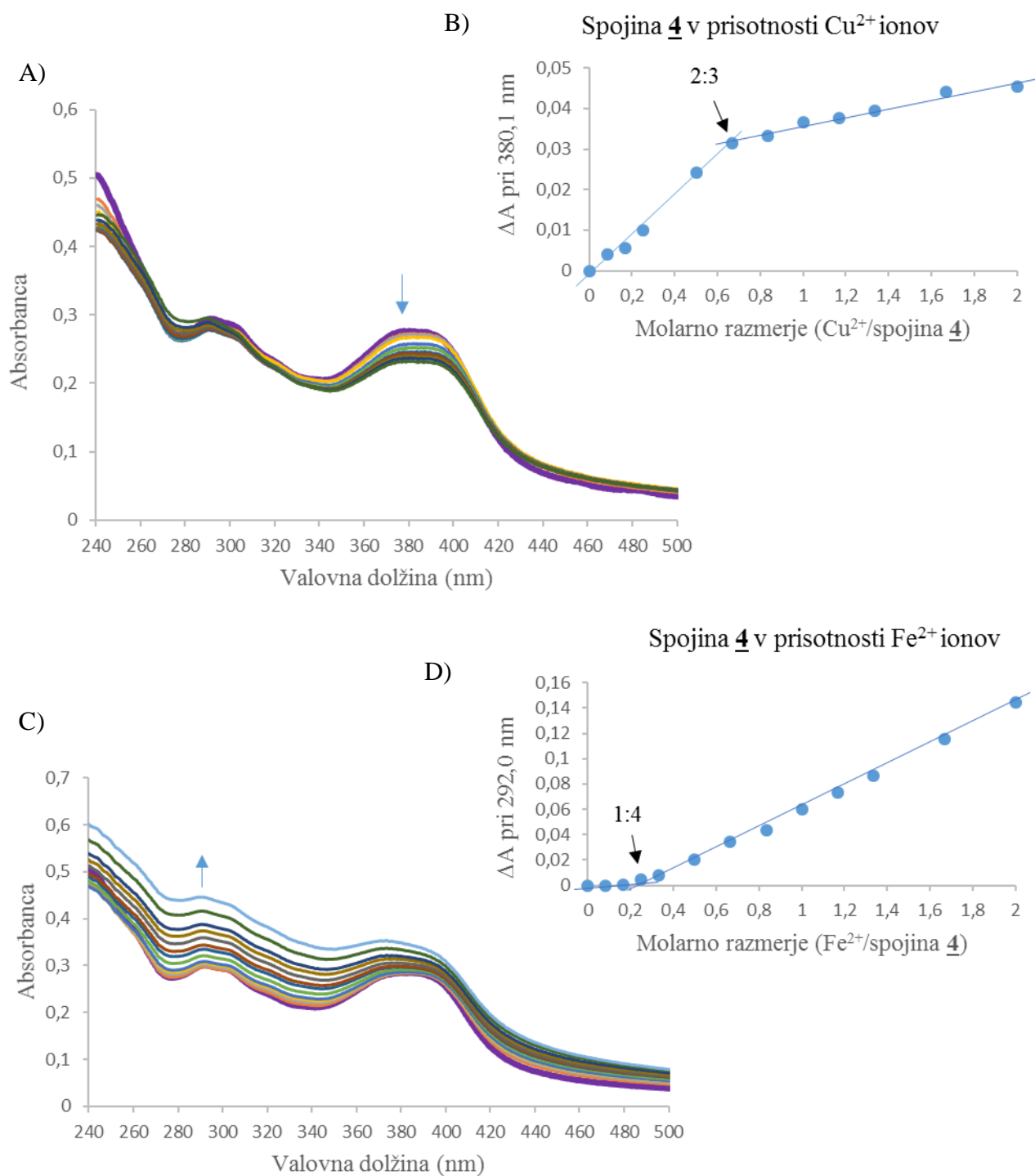
**Slika 24:** A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30 μM spojine 2 v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60 μM Cu<sup>2+</sup>. B) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 261,0 nm v odvisnosti od molarne razmerja Cu<sup>2+</sup>/spojina. C) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30 μM spojine 2 v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60 μM Fe<sup>2+</sup>. D) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 289,0 nm v odvisnosti od molarne razmerja Fe<sup>2+</sup>/spojina.

## Rezultati analize spojine **3**



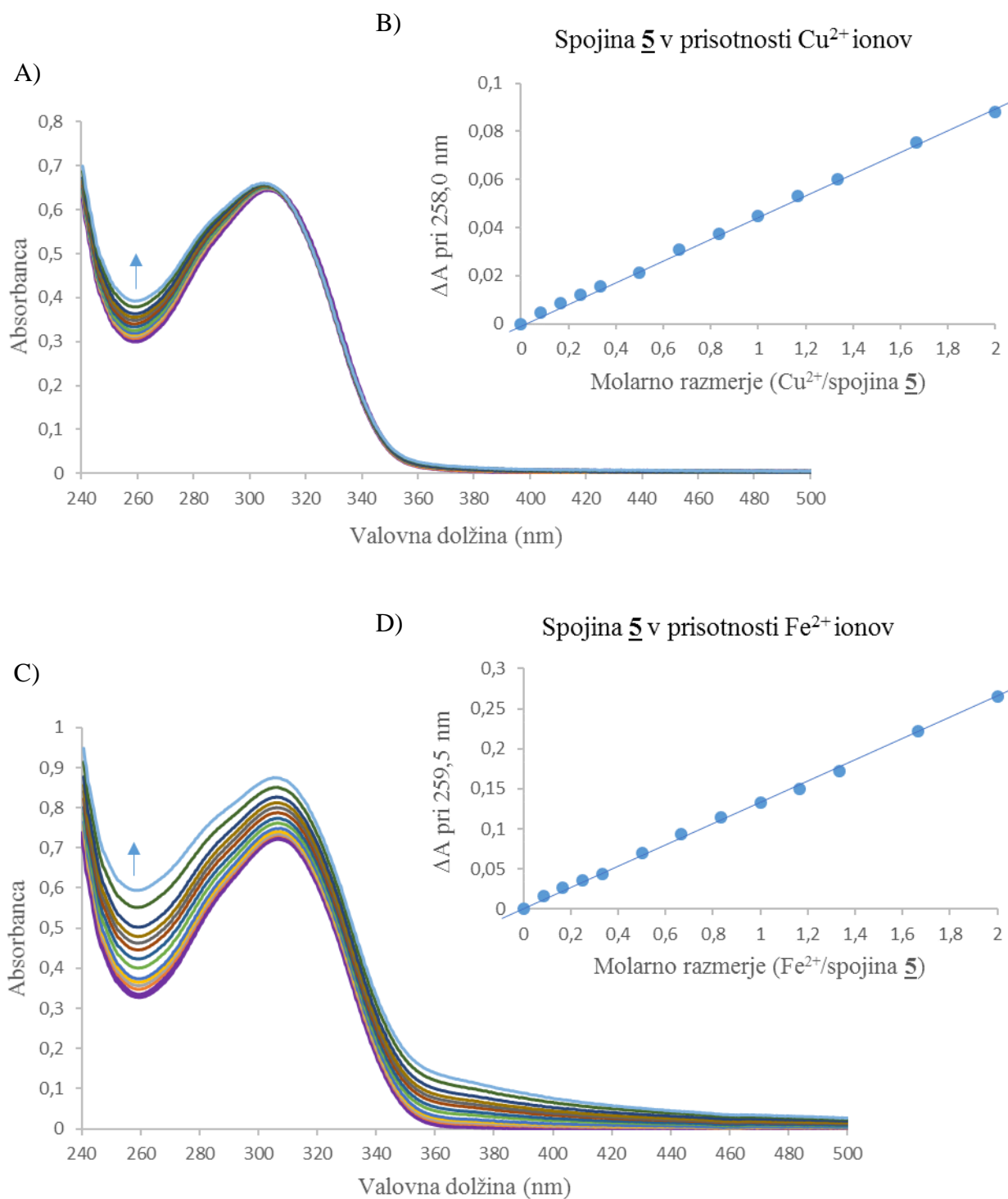
**Slika 25:** A) UV-Vis spektrofotometrična titracija  $30 \mu\text{M}$  spojine **3** v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in  $60 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . B) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 345,0 nm v odvisnosti od molarnega razmerja  $\text{Cu}^{2+}$ /spojina. C) UV-Vis spektrofotometrična titracija  $30 \mu\text{M}$  spojine **3** v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in  $60 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ . D) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 281,5 nm v odvisnosti od molarnega razmerja  $\text{Fe}^{2+}$ /spojina.

## Rezultati analize spojine **4**



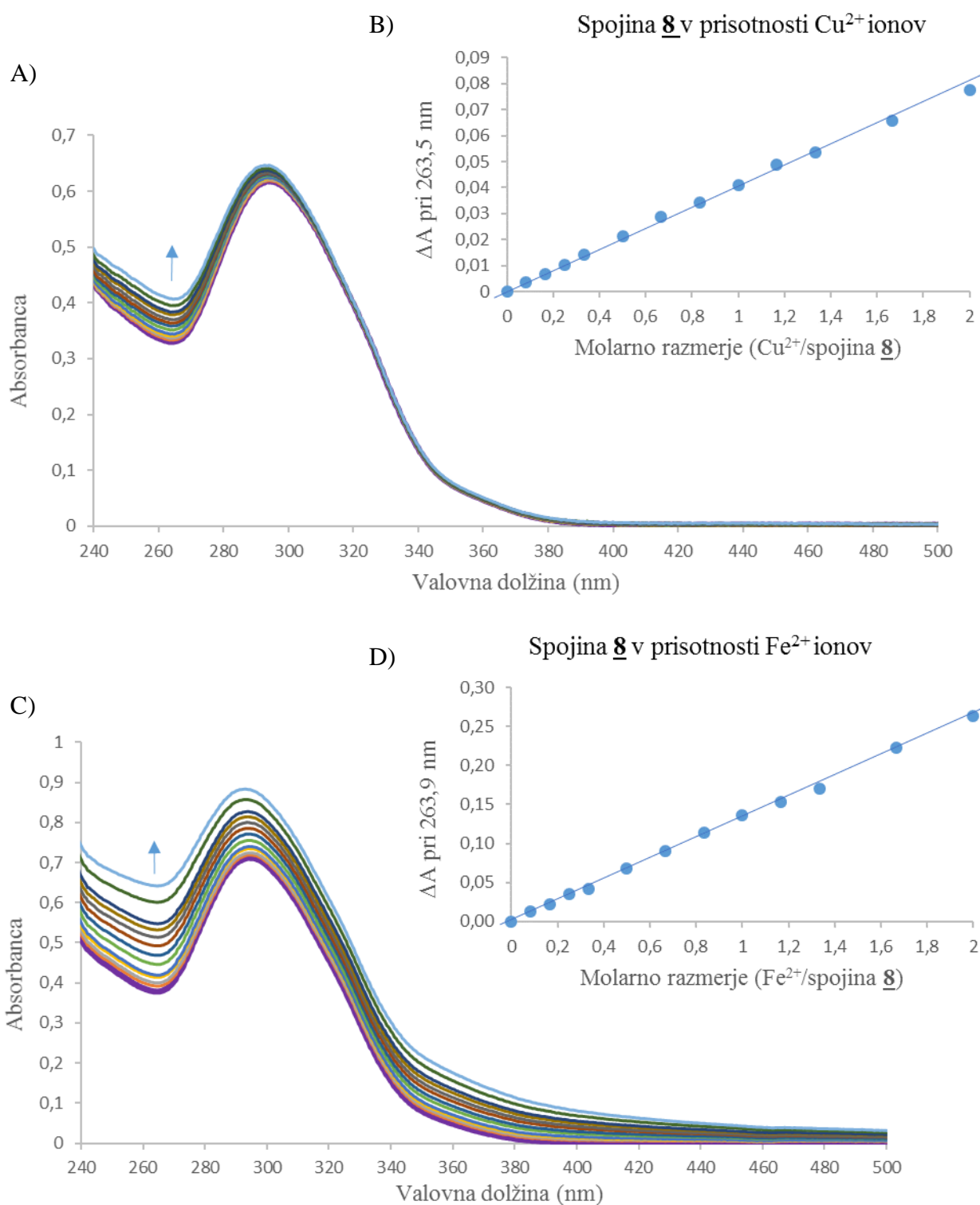
**Slika 26:** A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine **4** v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>. B) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 380,1 nm v odvisnosti od molarne razmerja Cu<sup>2+</sup>/spojina. C) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine **4** v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$  Fe<sup>2+</sup>. D) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 292,0 nm v odvisnosti od molarne razmerja Fe<sup>2+</sup>/spojina.

## Rezultati analize spojine 5



**Slika 27:** A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine 5 v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>. B) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 258,0 nm v odvisnosti od molarne razmerja Cu<sup>2+</sup>/spojina. C) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine 5 v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$  Fe<sup>2+</sup>. D) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 259,5 nm v odvisnosti od molarne razmerja Fe<sup>2+</sup>/spojina.

## Rezultati analize spojine **8**



**Slika 28:** A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine **8** v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>. B) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 263,5 nm v odvisnosti od molarne razmerja Cu<sup>2+</sup>/spojina. C) UV-Vis spektrofotometrična titracija 30  $\mu\text{M}$  spojine **8** v prisotnosti 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 in 60  $\mu\text{M}$  Fe<sup>2+</sup>. D) Titracijska krivulja: sprememba absorbance pri 263,9 nm v odvisnosti od molarne razmerja Fe<sup>2+</sup>/spojina.



### 5.3.2. Komentar rezultatov UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z bakrom(II) in železom(II)

S pomočjo UV-Vis spektrofotometra smo preverili sposobnost spojin za kelacijo  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$  ionov. Z analizo absorpcijskih spektrov z oznako A in titracijskih krivulj z oznako B smo preverjali sposobnost testnih spojin za kelacijo bakrovih(II) ionov, z analizo absorpcijskih spektrov z oznako C in titracijskih krivulj z oznako D pa sposobnost spojin za kelacijo železovih(II) ionov.

Sliki 23A in 23C prikazujeta absorpcijska spektra spojine **1** v prisotnosti različnih koncentracij  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$ . Absorpcijski maksimum smo zaznali pri 343,5 nm (slika 23A) oz. 343,0 nm (slika 23C). Z dodajanjem vedno višjih koncentracij raztopin  $\text{Cu}^{2+}$  je absorbanca postopoma padala. Pri 343,5 nm smo izrisali titracijsko krivuljo (slika 23B) in v točki preloma na x-osi odčitali molarno razmerje. Ugotovili smo, da  $\text{Cu}^{2+}$  ioni s spojino **1** tvorijo komplekse v razmerju 1:3. Z dodajanjem vedno višjih koncentracij  $\text{Fe}^{2+}$  pa je absorbanca pri 343,0 nm najprej padala, pri 15  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ /spojina **1** = 1:2) dosegla minimum in nato začela naraščati. Sprememba absorbance med absorbanco spojine in absorbanco nastalih kompleksov spojine s posameznimi koncentracijami  $\text{Fe}^{2+}$  ionov se je zato v prisotnosti večjih koncentracij  $\text{Fe}^{2+}$  (>15  $\mu\text{M}$ ) manjšala (slika 23D). Razlog je verjetno redčenje reakcijske zmesi. Koncentracijo kovinskih ionov smo namreč večali z dodajanjem določenega volumna 1 mM raztopine  $\text{Fe}^{2+}$  ionov (večanje volumna reakcijske zmesi). Iz titracijske krivulje smo odčitali nastanek kompleksov v razmerju 1:6 in 1:2 ( $\text{Fe}^{2+}$ /spojina **1**).

Absorpcijski spekter spojine **2** je ob dodajanju  $\text{Cu}^{2+}$  (slika 24A) in  $\text{Fe}^{2+}$  naraščal (slika 24C). Pri tem se oblika spektra ni spreminjala. Kljub temu smo narisali titracijski krivulji (sliki 24B in 24D), a spremembe v naklonu nismo opazili. Zaključimo lahko, da spojina **2** ne kelira  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$ . Podobno smo ugotovili pri analizi absorpcijskih spektrov in titracijskih krivulj spojine **5** in spojine **8**. Absorpcijski spektri obeh spojin (sliki 27A in 27C, sliki 28A in 28C), so ob dodajanju  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  naraščali, pri čemer se je absorbanca spreminjala enakomerno. Ker ni opazne spremembe v naklonih titracijskih krivulj (sliki 27B in 27D, sliki 28B in 28D) smo sklepali, da tudi ti dve spojini ne kelirata  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$ . Linearno naraščanje absorbance bi lahko v teh primerih pripisali samemu bakru in železu. Raztopini  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$  sta namreč obarvani, zaradi česar se pri višanju koncentracije ionov absorpcija v območju 240-500 nm povečuje.

Pri analizi spojine **3** smo v absorpcijskem spektru (slika 25A) ob dodajanju vedno višjih koncentracij  $\text{Cu}^{2+}$  zaznali padec absorbance pri 345,0 nm. Pri tej valovni dolžini smo narisali

titracijsko krivuljo (slika 25B), ki je pokazala nastanek kompleksov med  $\text{Cu}^{2+}$  in spojino **3** v razmerju 1:3 in 1:1. Z dodajanjem vedno višjih koncentracij  $\text{Fe}^{2+}$  pa smo v absorpcijskem spektru (slika 25C) zaznali največji porast absorbance pri 281,5 nm. Narisali smo titracijsko krivuljo, določili točko preloma in odčitali molarno razmerje 1:3 med  $\text{Fe}^{2+}$  ioni in spojino **3**.

V UV-Vis spektru spojine **4** (slika 26A) opazimo absorpcijski maksimum pri 380,1 nm. Ob dodajanju naraščajočih koncentracij  $\text{Cu}^{2+}$  pride do padca absorbance pri tej valovni dolžini, kar pomeni, da nastajajo kelatni kompleksi. Narisali smo titracijsko krivuljo, ki je pokazala nastanek kompleksa med  $\text{Cu}^{2+}$  in spojino **4** v razmerju 2:3. Absorpcijski spekter spojine **4** je ob dodajanju vse večjih koncentracij  $\text{Fe}^{2+}$  ionov ves čas naraščal. Največjo spremembo absorbance smo opazili pri 292,0 nm. Pri 292,0 nm smo nato narisali titracijsko krivuljo in ugotovili, da je do spremembe v naklonu prišlo pri molarnem razmerju 1:4 ( $\text{Fe}^{2+}$ /spojina **4**).

Rezultati UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z bakrom(II) in železom(II) so pokazali, da so spojine **1**, **3** in **4** sposobne kelacije  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$ . Kovinski ioni se na spojine najverjetneje vežejo preko karbonilnega kisika (dva nevezna elektronska para) in hidroksilne skupine na aromatskem obroču (po disociaciji vodika na kisiku ostane negativen naboj). Spojine **1**, **3** in **4** imajo hidroksilno skupino vezano na *orto* mestu aromatskega obroča, v neposredni bližini karbonilne skupine, kar jim omogoča tvorjenje dveh koordinacijskih vezi s kovinskim ionom (bidentatna kelacija). Spojine tvorijo komplekse z  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  v različnih molarnih razmerjih, zato predvidevamo, da v manjši meri pri nastanku kompleksov sodeluje tudi metoksi skupina (veliko manj reaktivna), ki ima prav tako dva nevezna elektronska para. Medtem ko spojina **1** nima vezane metoksi skupine, je pri spojini **3** vezana na *para* mestu, pri spojini **4** pa na nasprotno ležečem *meta* mestu hidroksilnega obroča. Poleg tega pri vseh treh spojinah med hidroksilno in karbonilno skupino leži amidni dušik z enim neveznim elektronskim parom, kar lahko omogoči tridentatno kelacijo  $\text{Fe}^{2+}$ . Spojine **2**, **5** in **8** niso sposobne kelacije  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$ , saj je hidroksilna skupina vezana na *meta* oz. *para* mestu, preveč oddaljena od karbonilne skupine.

Pri izvedbi testa nam pri nobeni spojini, ki kelira kovinske ione, ni uspelo doseči platoja (nasičenja spojine z  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$ ), kar kaže na nestabilnost nastalih kompleksov. Vezava med spojino **1**, **3** oz. **4** in  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  je torej šibka (43). Za natančnejše določanje stehiometrije kompleksov, ki so nastali med spojinami in kovinskimi ioni, bi morali uporabiti še druge analitske tehnike (npr. ESI masno spektrometrijo) in rezultate UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  potrditi (28).

## 6. SKLEP

Številne raziskave so pokazale, da so kinazolinoni po uvedbi hidroksilnih skupin na aromatski obroč učinkoviti antioksidanti. V magistrski nalogi smo iz antranilamida in izbranih hidroksibenzaldehidov s postopkom aerobne oksidativne ciklizacije v DMSO sintetizirali pet 2-substituiranih 4(3*H*)-kinazolinonov. Nato smo šestim kinazolinonom (petim sintetiziranim spojinam in eni spojini s podobno kemijsko strukturo) ovrednotili antioksidativne učinke. Najprej smo z DPPH testom preverjali njihovo sposobnost za redukcijo radikalov, nato pa z UV-Vis spektrofotometrično titracijo še zmožnost kelacije bakrovih(II) in železovih(II) ionov.

Z analizo rezultatov DPPH testa smo ugotovili, da testirane spojine, v primerjavi s standardom kvercetinom, niso dobri antioksidanti. Spojine **1**, **2** in **8**, ki imajo hidroksilno skupino vezano na *orto*, *meta* oz. *para* mestu aromatskega obroča, ne reducirajo DPPH radikala, kar pomeni, da ena hidroksilna skupina (ne glede na položaj) ni dovolj za redukcijo radikalov. Med testiranimi spojinami ima najboljšo antioksidativno kapaciteto spojina **4**, ki ima poleg hidroksilne skupine na aromatskem obroču vezano še metoksi skupino. Ta zmanjša disociacijsko energijo –O–H vezi in hidroksilni skupini omogoči, da lažje odda vodikov atom radikal. Metoksi skupina nastali fenoksilni radikal resonančno stabilizira, zaradi česar se poveča antioksidativna kapaciteta spojine. Spojina **4** ima metoksi skupino vezano na *para* mestu glede na hidroksilno skupino. Strukturno podobni sta ji spojina **3** z metoksi skupino vezano na *meta* mestu, in spojina **5** z metoksi skupino vezano na *orto* mestu glede na hidroksilno skupino. Medtem ko ima spojina **5** veliko slabšo antioksidativno kapaciteto kot spojina **4**, spojina **3** ne deluje kot antioksidant. To pomeni, da na antioksidativno kapaciteto vpliva tudi položaj metoksi skupine glede na hidroksilno skupino. Antioksidativno kapaciteto torej najbolj poveča vezava metoksi skupine na *para* mestu, manj vezava na *orto* mestu, vezava na *meta* mestu glede na hidroksilno skupino pa ne poveča antioksidativne kapacitete.

Rezultati UV-Vis spektrofotometrične titracije spojin z bakrom(II) in železom(II) so pokazali, da so spojine **1**, **3** in **4** sposobne tvorjenja šibkih kompleksov z  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$  v različnih molarnih razmerjih. Te spojine imajo hidroksilno skupino vezano na *orto* mestu aromatskega obroča, v neposredni bližini karbonilne skupine, kar jim omogoča tvorjenje dveh koordinacijskih vezi s kovinskim ionom. Spojine **2**, **5** in **8** niso sposobne kelacije  $\text{Cu}^{2+}$  oz.  $\text{Fe}^{2+}$ , saj imajo hidroksilno skupino vezano na *meta* oz. *para* mestu, ki je preveč oddaljena od karbonilne skupine.

## 7. LITERATURA

1. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 11–42, 77–137, 138–241.
2. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L: Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2015; 30(1): 11–26.
3. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393–406.
4. Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2003; 552(2): 335–344.
5. Silva JP, Coutinho O: Free radicals in the regulation of damage and cell death – Basic mechanisms and prevention. *Drug discoveries & therapeutics* 2010; 4(3): 144–67.
6. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al.: Oxidative Stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. Dostopno na spletni strani: <https://doi.org/10.1155/2017/8416763> (maj 2018).
7. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. *Farm Vestn* 2015; 66: 127–132.
8. Obrenovich M, Li Y, Parvathaneni K, Yendluri BB, Palacios H, Leszek J, Aliev G: Antioxidants in Health, Disease and Aging. *CNS & neurological disorders drug targets* 2011; 10: 192–207.
9. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010; 4(8): 118–126.
10. Young I, Woodside J: Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 2001; 54(3): 176–186.
11. Ighodaro OM, Akinloye OA: First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2017; Dostopno na spletni strani: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001> (junij 2018).
12. Lawson M K, Valko M, Cronin M T D et al: *Curr Pharmacol Rep* 2016; 2: 271.
13. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*, 3. izdaja, Oxford University Press Inc., New York, 1999: 172–184.
14. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *critical reviews in food science and nutrition* 2005; 45(4): 287–306.
15. Pandey K B, Rizvi S I: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; 2(5): 270–278.
16. Martin K, Appel CL: Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements* 2010; 2: 1–12.

17. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L: Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011; 50(3): 586–621.
18. Eghbaliferiz S, Iranshahi M: Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother Res.* 2016; 30(9): 1379–1391.
19. Asif M: Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *International Journal of Medicinal Chemistry* 2014. Dostopno na spletni strani: <https://doi.org/10.1155/2014/395637> (junij 2018).
20. Mahato A, Shanthi N, Shrivastava B: Chemistry, Structure Activity Relationship and Biological Activity of Quinazolin-4(3H)-One Derivatives. *Inventi Impact. Med Chem* 2011; 1–6.
21. Hameed A, Al-Rashida M, Uroos M, Ali SA, Arshia, Ishtiaq M, Khan KM: Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011–2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2018; 28(4), 281–297.
22. Rakesh KP, Manukumar HM, Channe Gowda D: Schiff's bases of quinazolinone derivatives: Synthesis and SAR studies of a novel series of potential anti-inflammatory and antioxidants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015; 5(25), 1072–1077.
23. Pisoschi AM, Negulescu GP: Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem* 2011; 1(1), 106.
24. Amorati R, Valgimigli L: Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research* 2015; 49(5), 633–649.
25. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno MV, Igartuburu JM, Garcia Barroso C: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry* 2014; 165: 198–204.
26. 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
27. Boligon AA, Machado MM, Athayde ML: Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med chem* 2014; 4:517–522.
28. Guo M, Perez C, Wei Y, et al; Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton transactions* 2007; 43: 4951–4961.
29. MyCurveFit (Online curve fitting). Dostopno na spletni strani: <https://mycurvefit.com/> (julij 2018).
30. Online Equation Solver (WolframAlpha). Dostopno na spletni strani: <https://www.wolframalpha.com/calculators/equation-solver/> (julij 2018).

31. STEYX function. Dostopno na spletni strani: <https://support.office.com/en-us/article/steyx-function-6ce74b2c-449d-4a6e-b9ac-f9cef5ba48ab> (julij 2018).
32. 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.
33. LibreTexts: Baldwin's Rule for Ring Closure Reactions. Dostopno na spletni strani: [https://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Logic\\_of\\_Organic\\_Synthesis\\_\(Rao\)/02.\\_Rules\\_and\\_Guidelines\\_Governing\\_Organic\\_Synthesis/Baldwin%E2%80%99s\\_Rule\\_for\\_Ring\\_Closure\\_Reactions](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry/Book%3A_Logic_of_Organic_Synthesis_(Rao)/02._Rules_and_Guidelines_Governing_Organic_Synthesis/Baldwin%E2%80%99s_Rule_for_Ring_Closure_Reactions) (julij 2018).
34. Allais F, Martinet S, Ducrot PH: Straightforward Total Synthesis of 2-O-Feruloyl-L-malate, 2-O-Sinapoyl-L-malate and 2-O-5-Hydroxyferuloyl-L-malate. *Synthesis-stuttgart* 2009; 3571–3578.
35. Sak K: Dependence of DPPH Radical Scavenging Activity of Dietary Flavonoid Quercetin on Reaction Environment. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2014; 14.
36. Chen Z, Bertin R, Frolidi G: EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 2013; 138(1): 414–420.
37. Bendary E, Francis RR, Ali HMG, Sarwat MI, El Hady S: Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences* 2013; 58(2), 173–181.
38. Kedare SB, Singh RP: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology* 2011; 48(4):412–422.
39. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M: DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull* 2001; 24(10): 1202–205.
40. Mathew S, Abraham TE, Zakaria ZA: Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *J Food Sci Technol.* 2015; 52(9): 5790–8.
41. Ali HM, Abo-Shady A, Sharaf Eldeen HA, et al.: Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds. *Chemistry Central Journal* 2013; 7:53.
42. Obreza A, Mravljak J, Perdih F: *Farmacevtska kemija I*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2014; 8–11, 39.
43. Jreo AM: Spectrophotometric Determination of the Stability Constant of [Cu<sup>2+</sup>-2-(6-Methyl-2-Benzothiazolylazo)-4-Chloro phenol], [Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>-2-(6-Bromo-2-Benzothiazolylazo)-4-Chloro phenol] Complexes Depending on the Stoichiometric Curves. *Journal of Al-Qadisiyah for Pure Science* 2008; 13: 1–6.