

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KRSTOVA

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KRSTOVA

**SINTEZA IN VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI DERIVATOV 5-BENZILIDEN-*N,N*-DIMETILBARBITURNE IN 5-BENZILIDEN-*N,N*-DIMETILTIOBARBITURNE KISLINE**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF 5-BENZYLIDENE-*N,N*-DIMETHYLBARBITURATES AND 5-BENZYLIDENE-*N,N*-DIMETHYLTIOBARBITURATES**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

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

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. in doc. dr. Nacetu Zidarju, mag. farm. za vse nasvete, vzpodbudne besede in pomoč med izdelavo diplomske naloge.

Posebna zahvala gre mojim najbližjim predvsem očetu Zlatetu za vso moralno podporo, mami Violeti za približanje pomembnosti izobrazbe, sestri Tanji za včasih potrebne tolažilne besede ter fantu Alanu za vso neprecenljivo spodbudo in potrpežljivost. Brez njih mi ne bi uspelo, saj so vsa leta študija verjeli vame in mi stali ob strani.

### **Izjava**

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

Ana Krstova

# VSEBINA

|  |     |
|--|-----|
| VSEBINA.....   | I   |
| KAZALO SLIK.....   | III |
| KAZALO PREGLEDNIC.....   | III |
| POVZETEK .....   | V   |
| ABSTRACT .....   | VI  |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....  | VII |
| 1. UVOD .....  | 1   |
| 1.1. Antioksidanti.....  | 1   |
| 1.1.1. Definicija antioksidantov .....                                       | 1   |
| 1.1.2. Razvrstitev antioksidantov.....                                       | 2   |
| 1.2. Oksidativni stres .....   | 3   |
| 1.3. Koža.....   | 4   |
| 1.3.1. Nastanek reaktivnih spojin v koži .....                               | 4   |
| 1.3.2. Obrambni mehanizmi v koži pred reaktivnimi spojinami .....            | 5   |
| 1.4. Antioksidanti v kozmetiki .....   | 5   |
| 1.4.1. Tehnični antioksidanti.....   | 6   |
| 1.4.2. Antioksidanti kot kozmetično aktivne sestavine .....                  | 6   |
| 1.5. Barbiturna kislina in njeni derivati.....                               | 8   |
| 1.6. Test DPPH .....   | 9   |
| 2. NAMEN DELA.....   | 11  |
| 2.1. Načrtovanje potencialnih antioksidantov .....                           | 11  |
| 2.2. Vrednotenje antioksidativne kapacitete potencialnim antioksidantom..... | 12  |
| 3. MATERIALI IN METODE.....  | 14  |
| 3.1. Topila in reagenti .....  | 14  |
| 3.2. Aparature in laboratorijska oprema .....                                | 14  |

|  |    |
|--|----|
| 3.3. Programska oprema .....   | 14 |
| 3.4. Analizne metode.....  | 15 |
| 3.4.1. Tankoplastna kromatografija (TLC).....                                  | 15 |
| 3.4.2. Jedrska magnetna resonanca (NMR).....                                   | 15 |
| 3.4.3. Infrardeča (IR) spektroskopija.....                                     | 15 |
| 3.4.4. Določanje tališč.....   | 15 |
| 3.4.5. Test DPPH.....  | 15 |
| 4. EKSPERIMENTALNO DELO .....  | 16 |
| 4.1. Sinteza.....  | 16 |
| 4.1.1. Sinteza <i>N,N</i> -dimetil(tio)barbiturne kisline (1,2) .....          | 16 |
| 4.1.2. Sinteza 5-benziliden- <i>N,N</i> -dimetil(tio)barbituratov (8-15) ..... | 17 |
| 4.1.3. Sinteza 4-butoksibenzaldehida (4).....                                  | 22 |
| 4.2. Vrednotenje antioksidativnih lastnosti .....                              | 22 |
| 4.2.2. Priprava vzorcev.....   | 22 |
| 4.2.3. Določanje vrednosti EC <sub>50</sub> .....                              | 23 |
| 5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....  | 25 |
| 5.1. Razlaga reakcijskih mehanizmov .....                                      | 25 |
| 5.1.1. Sinteza <i>N,N</i> -dimetil(tio)barbiturne kisline (1, 2).....          | 25 |
| 5.1.2. Knoevenaglova kondenzacija.....   | 25 |
| 5.1.3. Sinteza 4-butoksibenzaldehida (6).....                                  | 27 |
| 5.2. Rezultati testiranj.....  | 28 |
| 5.3. Komentar rezultatov testiranj .....                                       | 35 |
| 6. SKLEP .....   | 39 |
| LITERATURA .....   | 40 |

## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| Slika 1: Reakcija DPPH in antioksidanta .....   | 9  |
| Slika 2: Prikaz sheme derivatov 5-benziliden- <i>N,N</i> -dimetil(tio)barbiturne kisline .....                  | 12 |
| Slika 3: Reakcijska shema sinteze dimetilbarbiturne kisline 1 (X=O) in dimetiltioarbiturne kisline 2 (X=S)..... | 16 |
| Slika 4: Reakcijska shema sinteze 5-benziliden- <i>N,N</i> -dimetil(tio)barbituratov (8-15) .....               | 17 |
| Slika 5: Reakcijska shema sinteze 4-butoksibenzaldehida (6).....  | 22 |
| Slika 6: Primer nanašanja razredčin vzorcev in reagenta DPPH na mikrotitrsko ploščico. ....                     | 24 |
| Slika 7: Mehanizem reakcije sinteze spojine 1 in 2 .....  | 25 |
| Slika 8: Tvorba nukleofila II (36) .....  | 26 |
| Slika 9: Mehanizem Knoevenaglove kondenzacije (36) .....  | 27 |
| Slika 10: Mehanizem reakcije sinteze spojine 6 .....  | 27 |
| Slika 11: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 8 .....  | 28 |
| Slika 12: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 9 .....  | 29 |
| Slika 13: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 10 .....   | 30 |
| Slika 14: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 11 .....   | 30 |
| Slika 15: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 12 .....   | 31 |
| Slika 16: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 13 .....   | 32 |
| Slika 17: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 14 .....   | 33 |
| Slika 18: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 15 .....   | 33 |
| Slika 19: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije $\alpha$ -tokoferola .....                                   | 34 |
| Slika 20: Strukturna formula $\alpha$ -tokoferola .....   | 34 |
| Slika 21: Strukturna formula spojin 8-15.....   | 35 |
| Slika 22: Histogramski prikaz vrednosti EC <sub>50</sub> testiranih spojin 8-15 in $\alpha$ -tokoferola .....   | 36 |
| Slika 23: Prikaz resonančne stabilizacije radikala spojine 8 .....  | 36 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|  |    |
|--|----|
| Preglednica I: Rezultati meritev absorbanca spojine 8 .....    | 28 |
| Preglednica II: Rezultati meritev absorbanca spojine 9 .....   | 29 |
| Preglednica III: Rezultati meritev absorbanca spojine 10 ..... | 30 |
| Preglednica IV: Rezultati meritev absorbanca spojine 11.....   | 30 |

|  |    |
|--|----|
| Preglednica V: Rezultati meritev absorbanc spojine 12.....                                     | 31 |
| Preglednica VI: Rezultati meritev absorbanc spojine 13.....                                    | 32 |
| Preglednica VII: Rezultati meritev absorbanc spojine 14.....                                   | 32 |
| Preglednica VIII: Rezultati meritev absorbanc spojine 15.....                                  | 33 |
| Preglednica IX: Rezultati meritev absorbanc $\alpha$ -tokoferola .....                         | 34 |
| Preglednica X: Vrednosti EC <sub>50</sub> testiranih spojin 8-15 in $\alpha$ -tokoferola ..... | 35 |

## POVZETEK

Antioksidant je katera koli spojina, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativne poškodbe na tarčni molekuli. Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih imajo dvojno vlogo: lahko so tehnični antioksidanti, ki varujejo kozmetični izdelek pred vplivi iz okolja (predvsem sestavine z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami) ali pa so kozmetično aktivne sestavine, s katerimi podpremo endogeno antioksidativno obrambo kože. Ravno zato so v kozmetologiji pomembni testi, s katerimi vrednotimo antioksidativno kapaciteto posameznih spojin. Eden izmed ključnih testov je test DPPH, ki temelji na principu, da molekula DPPH sprejme H atom iz potencialnega antioksidanta, pri čemer pride do redukcije 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila (DPPH) v stabilen 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin (DPPH-H), vijolično obarvanje se spremeni v rumeno, sočasno pa pride do zmanjšanja absorbance. Rezultate testa največkrat podamo kot vrednost  $EC_{50}$ , ki je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki povzroči 50 % zmanjšanje v absorbanci DPPH. Nižja vrednost  $EC_{50}$  pomeni večjo antioksidativno moč spojine. V današnjem času, ko je kozmetika vedno bolj v uporabi, si potrošnik želi sestavin, ki so varne in učinkovite. Uporaba sintetičnih antioksidantov, kot sta BHT in BHA je sporna, saj so jima dokazali neželene učinke, zato si kozmetična industrija prizadeva, da bi razvila nove, varne in učinkovite antioksidante. Barbiturna kislina in njeni derivati izkazujejo širok spekter biološke aktivnosti, med drugimi delujejo tudi kot močni antioksidanti. S Knoevenaglovo kondenzacijo smo pripravili različne derivate 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbiturne kisline z reakcijo med dimetil(tio)barbiturno kislino in različnimi benzaldehidi. Njihove antioksidativne lastnosti smo vrednotili s testom DPPH in ugotavljali, kako struktura molekule vpliva na antioksidativno kapaciteto. Ugotovili smo, da imata največjo antioksidativno kapaciteto derivata z dvema -OH skupinama, saj lahko donirata 2 vodikova atoma in nevtralizirata 2 molekuli DPPH. Najslabšo antioksidativno kapaciteto ima derivat, ki na fenilnem obroču nima -OH skupin, temveč le butoksi skupino. Ugotovili smo, da na antioksidativno aktivnost vpliva tudi mesto, na katerem je vezana -OH skupina. Večjo aktivnost smo potrdili pri derivatu, ki ima -OH skupino vezano na *para* mestu. Prav tako smo ugotovili, da zamenjava kisika z žveplom v dimetilbarbiturnem obroču nekoliko zmanjša antioksidativno kapaciteto derivatov.

**Ključne besede:** *Antioksidant, Knoevenaglova kondenzacija, derivati 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbiturne kisline, test DPPH,  $\alpha$ -tokoferol*



## ABSTRACT

Antioxidant is any compound that decelerates, prevents or removes oxidation injuries on a targeted molecule. Antioxidants in cosmetic products have two different roles: they can be technical antioxidants that protect the cosmetic product from environmental influences or they can be cosmetically active constituents that support the endogenous antioxidant properties of the skin. These are the reasons why simple and accurate tests for the determination of antioxidative properties of compounds are crucial in the field of cosmetics. One of the most important tests is the DPPH test, which is based on the principle that a DPPH molecule removes an H atom from a potential antioxidant, upon which a reduction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl into a stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine takes place, turning the purple colouring to yellow while also reducing absorption. The results of this test are usually represented as EC<sub>50</sub> value which is defined as the concentration of antioxidant, causing a 50 % reduction of the DPPH absorption. A lower EC<sub>50</sub> value indicates a greater antioxidant potency of the compound. Today, as cosmetic products are more frequently used, a consumer prefers ingredients that are safe and effective. The use of synthetic antioxidants, such as BHT and BHA, is debatable since they were proven to have unwanted effects and thus the cosmetic industry is striving toward developing new and safer antioxidants. Barbituric acid and its derivatives show a wide spectrum of biological activities, among them also antioxidative activities. With the Knoevenagel condensation we prepared a series of 5-benzylidene-*N,N*-dimethyl(tio)barbiturates made from a reaction between the dimethyl barbituric acid and various benzaldehydes. Their antioxidant characteristics were determined with the DPPH test that also showed how molecular structure effects the antioxidant capacity. We discovered that derivatives with two -OH groups have the greatest antioxidant capacity as they can donate two H atoms, and can therefore neutralise two molecules of DPPH. The weakest antioxidant capacity was attributed to the derivative that has no -OH groups, but only a butoxy group. We also discovered that the position of the -OH group on the phenyl ring also affects the antioxidative activity. The derivative that has the -OH group on a *para* position, has greater antioxidant activity. We also noticed that the substitution of oxygen with sulphur on the dimethyl barbituric ring decreases the antioxidative capacity of the derivatives.

**Key words:** *Antioxidant, Knoevenagel condensation, DPPH test, 5-benzylidene-*N,N*-dimethyl(tio)barbiturates,  $\alpha$ -tocopherol*

## SEZNAM OKRAJŠAV

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

AO – antioksidant

RZ – reaktivne zvrsti

LMWA – antioksidanti z nizko molekulsko maso (*low molecular weight antioxidant*)

KI – kozmetični izdelek

UV – ultravijolično

BHT – dibutilhidroksitoluen

BHA – butilhidroksianizol

TBHQ – *terc*-butilhidrokinon

logP – logaritem porazdelitvenega koeficienta

DPPH – 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil

DPPH-H – 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin

TLC – tankoplastna kromatografija

NMR – jedrska magnetna resonanca

IR – infrardeča

EC<sub>50</sub> – 50 % efektivna koncentracija

# 1. UVOD

Antioksidanti (AO) ščitijo našo kožo pred prooksidativnim okoljem, kateremu je naša koža vsakodnevno izpostavljena, predvsem pred ultravijoličnim (UV) sevanjem, cigaretним dimom in okoljskimi onesnaževalci. Antioksidanti nevtralizirajo nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in ostalih radikalov zaradi UV sevanja ter na ta način preprečijo oksidativni stres v koži. Predvsem vitamina E in C v koži preprečujeta škodljivo delovanje ROS. A če je antioksidativna zaščita preobremenjena s povečanim nastajanjem ROS, pride do oksidativnih poškodb proteinov in ostalih molekul v koži, kar vodi v fotokarcinogenezo in fotostaranje (1). Ravno zato je smiselno topikalno nanašanje antioksidantov na kožo, zato se je kozmetična industrija v zadnjem času osredotočila na razvoj kozmetičnih izdelkov (KI) z dodanimi antioksidanti kot kozmetičnimi aktivnimi sestavinami (KAS).

## 1.1. Antioksidanti

### 1.1.1. Definicija antioksidantov

Antioksidant je katera koli spojina, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativne poškodbe na tarčni molekuli. Oksidirana spojina je lahko skoraj vsaka molekula, ki jo najdemo *in vivo* (2).

Funkcija antioksidantov je torej zmanjšati oksidativni stres, mutacije DNA, maligne pretvorbe in ostale poškodbe celic (3).

Najpomembnejšo vlogo imajo v bioloških sistemih, kjer inhibirajo radikalsko verižno oksidacijo organskih spojin z nižanjem koncentracij radikalov, ki lahko nadaljujejo verižno reakcijo. V bioloških sistemih so najpomembnejša tarča za avtooksidacijo lipidi, predvsem večkrat nenasičene maščobne kisline, ki jih najdemo v trigliceridih ali v holesterolskih estrih v celičnih membranah ali v transportnih lipoproteinih (4).

Relativna pomembnost antioksidantov *in vivo* je odvisna od različnih dejavnikov, med drugim od vrste reaktivne zvrsti (RZ), ki nastane in v kakšni meri ter kje ta reaktivna zvrst nastane. Kot primer, če se v krvni plazmi pojavi ozon ( $O_3$ ), deluje urat kot zaščitni antioksidant, če pa se pojavi v krvni plazmi hipoklorova kislina (HOCl), urat ne zagotovi zadostne zaščite. Še en primer, če se v krvni plazmi pojavi oksidativni stres zaradi cigaretne dima, askorbat lahko zaščiti lipide plazme, proteinov pa ne (2).

Antioksidanti najpogosteje prispevajo elektron radikalom in se pri tem pretvorijo (se oksidirajo) v stabilnejše ter manj škodljive molekule, kot pa so radikali. AO tako prestrežejo radikale in ščitijo celice pred oksidativnimi poškodbami, ki vodijo v prezgodnje staranje in bolezni (5).

Antioksidativna zaščita obsega različne mehanizme zaščite, ne le neposredne obrambe pred radikali. Prva možnost je, da se organizmi, ki se niso prilagodili na kisik in ki se potencialno lahko oksidirajo, izogibajo območjem z visokimi koncentracijami kisika v največji meri kot se lahko. To opazimo pri mnogih bakterijah, vključno s *Salmonello typhimurium* in *E. coli*. Druga možnost so encimi, ki katalitično odstranijo RZ, npr. katalaza in superoksid dismutaza. Tretja možnost so spojine, ki zmanjšajo tvorbo RZ. Pod to kategorijo vključujemo tudi proteine, ki zmanjšajo vpliv pro-oksidantov, kot so železovi ioni. Sem spadajo transferini in albumini. Antioksidativno zaščito biomolekul nudijo tudi drugi proteini z različnimi mehanizmi, npr. šaperoni. Četrta možnost zaščite je zamenjava molekul, ki so občutljive na oksidativne poškodbe, z molekulami, ki so nanje odporne. Zadnja in zelo pomembna možnost zaščite so molekule, ki se oksidirajo namesto pomembnih biomolekul. Nekatere molekule se »žrtvujejo« in se tako ne obnovijo več (se ne reducirajo). Sem spadata urat in bilirubin. Med AO, ki se oksidirajo in se nato lahko reducirajo nazaj, pa štejemo glutation,  $\alpha$ -tokoferol, askorbat in albumin. Ker pa sama antioksidativna zaščita ni 100%, imamo v organizmu tudi popravljalne mehanizme, ki popravijo že nastalo škodo (2). Med popravljalne mehanizme štejemo specifične encime, ki popravljajo poškodovane nukleinske kisline, odstranijo oksidirane proteine s proteolitičnimi sistemi in popravljajo oksidirane lipide s fosfolipazami, peroksidazami ali z akil transferazami (3).

### **1.1.2. Razvrstitev antioksidantov**

Antioksidanti predstavljajo obsežno in heterogeno skupino majhnih organskih in anorganskih molekul, pa tudi makromolekul in encimov (4).

Antioksidante delimo na:

- Encimski in ne-encimski,
- Fenolni, amino in imino derivati, ...
- Preventivni in popravljalni sistemi,
- Endogeni in eksogeni,

- Primarni ali pravi in sekundarni,
- Hidrofilni in lipofilni,
- Naravni in sintetični.

Antioksidanti, ki vstopajo v redoks reakcije, so z redoks potencialom regulirane molekule in jih v splošnem razdelimo v dve skupini. V prvo skupino sodijo encimski AO, h katerim prištevamo superoksid dismutazo, glutation peroksidazo, glutation reduktazo, glutation-S-transferazo, tioredoksin reduktazo in katalazo. Drugo skupino AO predstavljajo neencimski antioksidanti z nizko molekulsko maso (*low molecular weight antioxidant*, LMWA). Obe skupini sta sklopljeni v antioksidativno mrežo in delujeta sinergistično (6). LMWA preprečujejo oksidativne poškodbe z neposrednimi ali s posrednimi interakcijami z ROS (7).

Posredni mehanizem imajo tako imenovani sekundarni AO, ki vključujejo kelatorje kovinskih ionov, lovilce singlentnega kisika, oksidativne inhibitorne encime in absorberje UV sevanja (3).

Neposredni mehanizem pa imajo tako imenovani primarni AO, ki donirajo elektron radikal in tako prekinejo verižno reakcijo. Na ta način AO reducirajo radikal in preprečijo oksidacijo tarčne molekule. Slednji mehanizem je mogoč le, če je koncentracija AO dovolj visoka, da lahko tekmuje s tarčno molekulo. Ima številne prednosti pred encimskimi AO, saj zaradi svoje nizke molekulske mase lahko prehajajo membrano, imajo večji spekter delovanja in možnost obnove (3, 7).

## **1.2. Oksidativni stres**

Pomanjkanje antioksidantov v bioloških sistemih vodi v oksidativni stres. Oksidativni stres je kratkotrajno stanje pod strogim nadzorom antioksidativne obrambne mreže, ki jo predstavljajo številni encimski in neencimski sistemi. Poznamo tri glavne poti, ki vodijo v oksidativni stres: energetska, reaktivna in metabolična pot (8). Oksidativni stres nastopi, ko pride do prekomerne produkcije reaktivnih zvrsti, ki jih antioksidanti ne morejo v zadostni količini odstraniti. Reaktivne zvrsti, ki se pojavljajo v bioloških sistemih, so superoksidni radikal, hidroksilni radikal, alkoksilni radikali, lipidni peroksilni radikali, dušikov oksid in peroksinitrit. Oksidativni stres vodi v spremembo strukture in funkcije nukleinskih kislin, lipidov in proteinov. Porušeno ravnotežje med reaktivnimi zvrstmi in antioksidativnim obrambnim sistemom lahko sproži specifične dejavnike, ki so odgovorni za oksidativne poškodbe v celici. Pride do preobsežnega izražanja onkogenov, mutacij, promocije aterogene aktivnosti in

vnetja. To vodi v razvoj raka, nevroloških poškodb, kardiovaskularnih bolezni (ateroskleroze), sladkorne bolezni in v razvoj bolezni ledvic (3).

### **1.3. Koža**

Koža je sestavljena iz treh plasti. Zunanja plast, imenovana epidermis, srednja plast dermis, ki je podporno tkivo prepleteno s številnimi žilami in živci ter kožnimi priveski (znojnicami, lojnicami, lasnimi mešički, nohti) in spodnja plast, subcutis, ki ima »zalogo maščob« in se prožno giblje nad spodaj ležečimi mišicami. Zdrava koža je rezultat številnih biokemičnih in fizikalnih dejavnikov, ki so predmet sprememb tako v telesu ali okolju. Sčasoma lahko sonce, kajenje, stres, bolezen in staranje spremenijo zgradbo kože tako, da postane ohlapna, izgubi sijaj in prožnost. Namen profesionalne nege kože je vzdrževati jo v zdravem stanju in njenem najaktraktivnejšem videzu (9).

Koža je izpostavljena tako eksogenim kot endogenim virom RZ. Eksogeni viri so: onesnažen zrak (izpušni plini iz avtomobila, cigaretni dim), atmosferski plini (ozon), kemikalije (kisline, herbicidi, alkohol), sevanje (UV sevanje, ionsko sevanje). Endogeni viri so: encimi (ksantan oksidaza, NO sinataza), celice (nevtrofilci), bolezni (psoriaza, vnetje, rak) in patološki procesi. V koži so tarče RZ različne, npr. lipidi, DNA in proteini (10).

RZ oziroma radikali v koži povzročajo prezgodnje staranje, izgubo elastičnosti in prožnosti kože, pojav gub, lis in pigmentacije ter maligne transformacije. Če je obremenitev kože z radikali prevelika, se sproži vnetna reakcija (sončne opekline), ki odstrani poškodovano tkivo zaradi delovanja radikalov (9).

Ker so glavni povzročitelji oksidativnega stresa v koži UV žarki, se jim bom v nadaljevanju najbolj posvetila (6).

#### **1.3.1. Nastanek reaktivnih spojin v koži**

Nastanek ROS v koži primarno povzroči UV sevanje. Kateri tip reaktivnih kisikovih spojin se tvori, je odvisno od valovne dolžine UV sevanja. UVB svetloba povzroči cepitev kovalentne vezi, posledica je nastanek para radikalov. UVB spodbudijo predvsem nastanek superoksidnega radikala ( $O_2^{\bullet-}$ ) preko aktivacije NADPH oksidaze in reakcij v dihalni verigi. Posledice UVB sevanja so: poškodbe DNA in proteinov, sprožitev lipidne peroksidacije in oksidativnega stresa, vnetna reakcija, supresija imunskega sistema in fotostarjanje kože (6, 10,

11). UVA svetloba ima premajhno energijo, zato ne cepi kovalentne vezi, povzroči pa nastanek singletnega kisika ( $^1\text{O}_2$ ) preko fotostimulirane reakcije s kromofori v celicah, kot sta riboflavin in porfirin. UVA sevanje pa lahko povzroči tudi nastanek  $\text{O}_2^{\bullet-}$  preko podobnega mehanizma kot pri UVB žarkih. Posledice UVA sevanja so: nastajanje singletnega kisika in ostalih ROS, ki oksidirajo DNA, proteine, lipide in vodijo v oksidativni stres ter fotostaranje. Na površini kože nastane največ singletnega kisika ( $^1\text{O}_2$ ). Tvorijo se pod vplivom UVA žarkov in porfirinov v bakterijah, ki so fiziološko prisotne na površini kože. Singletni kisik oksidira skvalen, holesterol in nenasičene acilne ostanke v sebumu in tako pospeši lipidno peroksidacijo (6, 10, 11).

Nastale RZ neposredno znižajo koncentracijo v koži fiziološko prisotnih AO, npr. vitamina E, glutationa, koencim Q in vitamina C, kar pomeni oslabitev prve obrambne linije kože pred delovanjem radikalov. Poleg tega pride tudi do znižane aktivnosti katalaze in glutation reduktaze, ki sta pomembna encima v obrambi kože pred delovanjem radikalov, ker odstranjujeta vodikov peroksid (9).

### **1.3.2. Obrambni mehanizmi v koži pred reaktivnimi spojinami**

Koža je tekom evolucije razvila številne mehanizme, s katerimi se brani pred škodljivim UV sevanjem (6, 10). Obramba je organizirana na molekularni (lovilci radikalov, AO), encimski in na metabolični ravni (9). Ti mehanizmi vključujejo preprečevanje nastanka ROS iz endogenih virov, učinkovite popravilne mehanizme, pigmentacijo kože, odebelitev kože in antioksidativno zaščito. Antioksidativna zaščita je sestavljena iz encimskih AO in nizkomolekularnih antioksidantov (6, 10). Antioksidanti, med katerimi so v koži najpomembnejši vitamin E, vitamin C, sistem ubikinon/ubikinol, glutation, melanin in drugi, lovijo hidroksilne in druge (C, N) radikale (9).

### **1.4. Antioksidanti v kozmetiki**

Z dermalno apliciranimi antioksidanti v kozmetičnih izdelkih želimo doseči dvoje: zaščititi oksidativno občutljive spojine v izdelku in zaščititi kožo pred oksidativnimi procesi, tako da že v začetni fazi preprečijo oksidativni stres in na ta način podprejo endogeno antioksidativno obrambo kože (9).

### **1.4.1. Tehnični antioksidanti**

Tehnični antioksidanti so pomožne sestavine kozmetičnih izdelkov in ščitijo sestavine kozmetičnih izdelkov pred oksidativnim razpadom. Oksidativni razpad poteka v stiku z zračnim kisikom. Pospesijo ga prisotna svetloba, toplota, kovinski ioni, že prisotne žarke maščobe ali proste maščobne kisline. Oksidativni razpad sestavin kozmetičnih izdelkov vodi v neprijeten vonj samega izdelka in do tvorbe produktov, ki so potencialno lahko nevarni za uporabnika (npr. lahko povzročijo iritacijo kože). Uporaba tehničnih antioksidanti je nujna pri KI, ki vsebujejo veliko nenasičenih maščobnih kislinami. Tehnični AO so tokoferoli, dibutilhidroksitoluen (BHT), butilhidroksianizol (BHA), butilhidrokinon (TBHQ) in alkil galati (12).

Obstajajo dokazi, da sintetični AO, kot sta BHA in BHT, povzročajo bolezni jeter in karcinogenezo. Ravno zato je nujen razvoj novih, varnejših AO, ki prav tako učinkovito preprečijo oksidativni stres (npr. razvoj derivatov barbiturne kisline) (13).

Tehnični antioksidanti se dodajajo v KI posamično ali v kombinaciji, kar poveča učinkovitost antioksidativne zaščite, saj v kombinaciji delujejo sinergistično. V KI lahko dodamo še antioksidativne promotorje, ki s svojo prisotnostjo povečajo učinkovitost AO. Antioksidativni promotorji so citronska kislina, askorbinska kislina in EDTA. Pri uporabi AO in antioksidativnih promotorjev moramo biti pozorni na iritacijo in toksičnost KI ter spremembo barve samega izdelka, prav tako moramo zagotoviti, da je AO topen tako v olju kot v vodi (12).

### **1.4.2. Antioksidanti kot kozmetično aktivne sestavine**

Kozmetični izdelki so komercialno dostopni produkti, ki se uporabljajo ne le za izboljšanje videza kože, temveč tudi za izboljšanje zdravja kože. Na trgu so na voljo izdelki, ki obnovijo, pomladijo, očistijo, zaščitijo in navlažijo kožo. V današnjem času je zato velik poudarek na vključitvi antioksidantov v kozmetične izdelke za nego kože. Koža je naš največji organ in predstavlja glavno bariero pred zunanjimi poškodbami, ki nastanejo zaradi radikalov. UV sevanje in okoljski onesnaževalci povzročijo nastanek radikalov, ki so zelo reaktivne molekule z nesparjenim elektronom. Radikali povzročijo škodo okoliškim molekulam in tkivom. Največ škode povzročijo na bioloških membranah in DNA. Dodatek antioksidantov v kozmetične izdelke naj bi zaščitil in popravil škodo z nevtralizacijo radikalov (14).



Oksidativni stres kože, povzročen z UV žarki, ima za posledico poleg nastanka radikalov tudi zmanjšano aktivnost antioksidantov. Ker ti predstavljajo primarno obrambo pred reaktivnimi spojinami, je njihovo aktivnost smiselno povečati z uporabo izdelkov, ki vsebujejo antioksidante. Antioksidanti primarno preprečujejo nastanek oziroma pospešijo regeneracijo oksidativnih poškodb makromolekul. Poleg tega lahko vplivajo na manjšo aktivnost citokinov in s tem zmanjšajo vnetne procese. Nekateri izmed njih spodbujajo sintezo kolagena in vplivajo na keratinizacijo, zmanjšajo pigmentnajo ter preprečujejo dolgoročne učinke UV žarkov, ki se kažejo v obliki staranja (6, 14). Antioksidanti dokazano ščitijo pred foto-poškodbami in kožnim rakom. Med AO, ki imajo te učinke, vključujemo alfa lipojsko kislino, askorbinsko kislino, vitamin B3, vitamin E in ubikinol (15). Antioksidante kot KAS torej dodajajo KI proti staranju kože in izdelkom za zaščito pred soncem.

Po lokalnem nanosu antioksidanta je ponavadi problematična dostava do njihovega mesta delovanja. Penetracija molekul skozi intaktno roženo plast je za številne molekule ovirana, v splošnem je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti molekul, pri čemur so najpomembnejši velikost, naboj in lipofilnost. Molekule z molekulsko maso do 500 Da navadno dobro prehajajo roženo plast pokožnice, prav tako to velja za molekule brez naboja. Logaritem porazdelitvenega koeficienta ( $\log P$ ) med 1 do 3 je najugodnejši za difuzijo molekul preko kože, optimalen  $\log P$  pa je 2,5. Npr. ubikinol z  $\log P$  10 tako najverjetneje ne bo prehajal plasti kože. Obstajajo pa tudi izjeme, ki po zgornjih pravilih naj ne bi prehajale kože. Mednje sodi vitamin E, ki ima  $\log P$  10, in dokazano 24 h po nanosu difundira do usnjice (6). Zato je potrebnih več študij za povečanje penetracije antioksidantov v kožo. Mogoče je za dostavo AO v kožo potrebna celo invazivna metoda, kot je ionoforeza (14).

Za dosego želenih rezultatov moramo uporabiti zelo učinkovite antioksidante, ki pa so zaradi velike reaktivnosti pogosto nestabilni, tako da je resnično uporabnih antioksidantov v praksi zelo malo (9). Za izboljšanje stabilnosti so pripravili številne derivate AO, ki se pogosto uporabljajo v prehranski in kozmetični industriji. Eden izmed načinov stabilizacije vitamina E je priprava estrov vitamina E z očetno kislino (tokoferil acetat) ali z jantarno kislino (tokoferil sukcinat). Vitaminu C pa stabilnost in lipofilnost povečamo s pripravo estrov z maščobnimi kisljinami, npr. s palmitinsko ali stearinsko kislino: dobimo askorbilpalmitat in askorbilstearat. Drugi način stabilizacije vitamina C je priprava soli askorbilfosfatov in tvorba estra vitamina C in A v retinil askorbat. Pri peroralnem vnosu oz. dermalni aplikaciji stabilnejših derivatov AO je

pomembno, da v črevesju oz. v koži pride do hidrolize esterske vezi, tako da se sprosti aktivna oblika AO (29).

Da je sestavina, v našem primeru AO, v kozmetičnem izdelku koristna za uporabnika, mora biti najprej stabilna v formulaciji, med shranjevanjem in med uporabo. Mora biti netoksična za uporabnika in biti aktivna na tarčnem mestu, ko jo apliciramo (14).

### **1.5. Barbiturna kislina in njeni derivati**

Barbiturna kislina in njeni derivati izkazujejo širok spekter biološke aktivnosti, in sicer hipotenzijo, antisklerozno, uspavalno (hipnotično), protibakterijsko, antikonvulzivno, spazmolitično delovanje, delujejo pa tudi protirakavo, pomirjajoče in protivnetno ter delujejo kot inhibitorji matričnih metaloproteaz (13). Ravno raznolika biološka aktivnost naredi barbiturno kislino in njene derivate zanimive za organsko in farmakološko uporabo (16).

Barbiturati se tradicionalno uporabljajo kot uspavala ali hipnotiki pri bolnikih s shizofrenijo. Tiobarbiturati se med drugim uporabljajo za intravensko anestezijo. Zaradi učinkovitosti barbitala in fenobarbitala pri zdravljenju epilepsije so sintetizirali več kot 2500 različnih analogov barbiturne kisline, od katerih je 25 komercialno dostopnih (5). Prav tako raziskujejo učinke barbiturne kisline kot protirakava zdravila in zdravila za zdravljenje AIDS-a (17). Barbiturna in 2-tiobarbiturna kislina sta začetni komponenti za sintezo različnih heterocikličnih in 5,5-disubstituiranih derivatov, ki so farmakološko najbolj pomembni derivati barbiturne kisline (16).

5-Arilidenbarbiturati so pomembni člani pirimidinske družine. So pomembni prekursorji v pripravi novih heterocikličnih bioaktivnih molekul in so potencialni selektivni antioksidanti (13). Derivati 5-arilidenbarbituratov so zelo pomembni intermediati v organskih reakcijah (18). Poznamo različne postopke za sintezo derivatov barbiturne kisline. 5-Arilidenbarbiturate sintetiziramo s Knoevenaglovo kondenzacijo med barbiturno kislino in različnimi aldehidi ali ketoni (13). Arilidenski derivati barbiturne kisline vsebujejo eksociklično dvojno vez, s pozitivnim delnim nabojem na ogljikovem atomu (16).

V študiji, kjer so vrednotili antioksidativno kapaciteto različnih derivatov arilidenbarbituratov, so ugotovili, da vsi derivati izkazujejo antioksidativno delovanje. Zato so predlagali uporabo arilidenskih barbituratov v prehrambeni in farmacevtski industriji (13). V drugi študiji, ki so jo



dokaj hitra, zanjo potrebujemo le UV-Vis spektrofotometer, kar razloži njeno razširjeno uporabo. Rezultate podamo v vrednosti  $EC_{50}$ , ki je definirana kot koncentracija AO, ki povzroči 50 % zmanjšanje v absorbanco DPPH (21).

Različni raziskovalci so uporabili različne protokole za izvajanje testa DPPH. Razlike so v uporabljenih koncentracijah DPPH, času inkubacije, reakcijskih topilih in pH reakcijske mešanice. Zato imamo različne vrednosti  $EC_{50}$ , tudi za standardne AO kot so BHT, vitamin E, ... V uporabi torej nimamo standardiziranega testa, zato rezultate testov DPPH iz različnih virov ne moremo neposredno primerjati. Prisotnost svetlobe, kisika in sam pH reakcijske mešanice prav tako vplivajo na absorbanco DPPH. Na točnost rezultata vpliva tudi previsoka koncentracija DPPH, saj dobimo absorbanco, ki je nad mejami spektrofotometrične točnosti (izven linearne območja) (22).

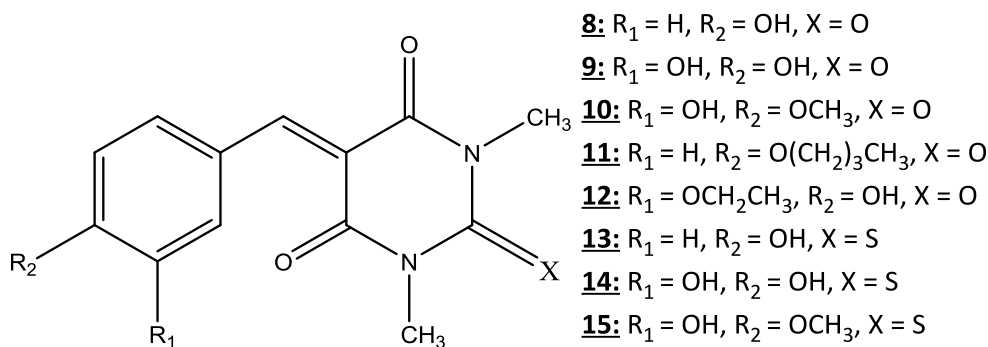
Druge metode za vrednotenje antioksidativnih lastnosti so sposobnost plazme za redukcijo  $Fe^{3+}$  (*Ferric reducing ability of plasma* ali *Ferric ion reducing antioxidant power*, FRAP), kapaciteta absorpcije kisikovih radikalov (*Oxygen radical absorbance capacity*, ORAC test) in antioksidativna sposobnost redukcije  $Cu^{2+}$  (*CUPric Reducing Antioxidant Capacity*, CUPRAC) (21).

## 2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali serijo derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetilbarbiturne in 5-benziliden-*N,N*-dimetiltiobarbiturne kisline iz dimetilbarbiturne kisline oziroma dimetiltiobarbiturne kisline in različnih benzaldehidov. Sintetizirane spojine bomo identificirali z NMR ter IR spektroskopijo in jim določili antioksidativne lastnosti s pomočjo testa DPPH ter ugotavljali, kako struktura spojin vpliva na antioksidativne lastnosti. Derivati barbiturne in tiobarbiturne kisline so zelo zanimivi za farmacevtsko stroko zaradi številnih bioloških učinkov, ki jih izkazujejo (5). Med drugimi izkazujejo antioksidativne lastnosti, zato postajajo vedno bolj zanimivi tudi za kozmetično industrijo, saj bi teoretično lahko zamenjali sintetične antioksidante (npr. BHA in BHT), ki imajo dokazano škodljive učinke (13).

### 2.1. Načrtovanje potencialnih antioksidantov

S pripravo serije derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetilbarbiturne in 5-benziliden-*N,N*-dimetiltiobarbiturne kisline želimo ugotoviti, kako spremembe na fenilnem obroču vplivajo na antioksidativne lastnosti in kako zamenjava kisika z žveplom vpliva na antioksidativno aktivnost derivata. Prav tako želimo ugotoviti, kako substitucija vodika z metilnimi skupinami na dušikih vpliva na antioksidativno lastnost derivatov. Najprej bomo sintetizirali naši izhodni spojini za nadaljnje reakcije, dimetilbarbiturno (spojina **1**) oziroma dimetiltiobarbiturno kislino (spojina **2**) z reakcijo med malonsko kislino in dimetil(tio)sečnino v očetni kislini z aktivatorjem acetanhidridom. S Knoevenaglovo kondenzacijo bomo nato z reakcijo med dimetil(tio)barbiturno kislino in različnimi benzaldehidi pripravili različne derivate 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbiturne kisline. Uporabili bomo naslednje benzaldehide: 4-hidroksibenzaldehid (spojina **3**), 3,4-dihidroksibenzaldehid (spojina **4**), 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehid (spojina **5**), 4-butoksibenzaldehid (spojina **6**) in 4-etoksi-3-hidroksibenzaldehid (spojina **7**) za pripravo derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetilbarbiturne kisline ter 4-hidroksibenzaldehid (spojina **3**), 3,4-dihidroksibenzaldehid (spojina **4**) in 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehid (spojina **5**) za pripravo derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetiltiobarbiturne kisline.



**Slika 2:** Prikaz sheme derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituricne kisline

Najmočnejšo antioksidativno aktivnost pričakujemo pri derivatu, ki ima na fenilnem obroču 2 -OH skupini, eno na *meta* in drugo na *para* mestu (spojina **9** in spojina **14**), nasprotno najmanjšo antioksidativno aktivnost pa pričakujemo pri derivatu, ki ima na fenilnem obroču butoksi skupino (spojina **11**). Za morebitno antioksidativno delovanje slednje spojine bo najverjetneje odgovoren barbiturni del molekule. Derivati, ki imajo na fenilnem obroču -OH skupino, so strukturno podobni fenolnim antioksidantom. Po mehanizmu delovanja jih uvrščamo med prave antioksidante, ki zavirajo oksidacijo tako, da radikalom donirajo H atom in tako zaustavijo potek verižne reakcije. Lahko so naravnega ali sinteznega izvora in spadajo med najpogosteje uporabljene AO v kozmetičnih izdelkih (23).

S pripravo homologov, spojina **10** in spojina **12**, bomo ugotovili, če na antioksidativno lastnost spojine vpliva tudi mesto, na katerem je -OH skupina (*meta* ali *para* mesto), ali je antioksidativna aktivnost odvisna le od števila -OH skupin in možnosti doniranja H atoma. Med seboj bomo primerjali tudi antioksidativno aktivnost derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetilbarbituricne in 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituricne kisline, ki smo jih pripravili iz enakih benzaldehidov (npr. spojina **8** in spojina **13**), in ugotavljali, kako zamenjava kisika z žveplom vpliva na antioksidativne lastnosti.

## 2.2. Vrednotenje antioksidativne kapacitete potencialnim antioksidantom

Osmim sintetiziranim spojinam bomo določali antioksidativno kapaciteto s pomočjo testa DPPH, ki temelji na principu, da molekula 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila (DPPH) sprejme vodikov atom iz potencialnega AO, pri čemer pride do redukcije DPPH v stabilen 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin (DPPH<sub>2</sub>), vijolično obarvanje se spremeni v rumeno, pri tem pa pride do zmanjšanja absorbance sorazmerno s številom doniranih elektronov. Spremembo barve bomo določali

spektrofotometrično z merjenjem absorbanca pri valovni dolžini 515 nm (19, 20). Analiza je preprosta, občutljiva in dokaj hitra, zato je test DPPH med najbolj razširjenimi testi za vrednotenje antioksidantov.

Za pripravo vzorcev bomo najprej izbrali primerno topilo, v katerem bodo vse testirane spojine dobro topne. Rezultate bomo nato podali kot vrednosti  $EC_{50}$ , ki so definirane kot koncentracije AO, ki povzročijo 50 % zmanjšanje v absorbanca DPPH (21). Rezultate bomo primerjali s standardom,  $\alpha$ -tokoferolom, in med seboj ter poskušali ugotoviti, kateri del molekule je najbolj odgovoren za antioksidativno delovanje spojin.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. Topila in reagenti

Pri delu smo uporabili topila in reagente različnih proizvajalcev: Aldrich, Tokyo chemical industry (TCI), Emsure, Merck, Acros organics, Carlo Erba Reagents S.A.S, Sigma-aldrich in Kemika. Deionizirana voda, ki smo jo uporabili pri sintezi, je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo. Reagentov nismo dodatno prečistili.

### 3.2. Aparature in laboratorijska oprema

- Analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245 (Švica)
- Precizna tehtnica: Mettler Toledo PB403 (Švica)
- Polavtomatske pipete: Brand (Nemčija)
- Mikrotitracijska plošča s 96 vdolbinami: Techno Plastic Products (Švica)
- Kivete: 1,5 mL kivete, za enkratno uporabo, dimenzije: 12,5 x 12,5 x 45 mm, Brand (Nemčija)
- Viale: 1,8 mL vial, dimenzije: 12 x 35 mm, Neolab (Nemčija)
- Rotavapor: Büchi 461 WaterBath (Švica)
- UV-svetilka: Camag (Indija)
- Magnetno mešalo: IKA (Nemčija)
- Ultrazvočna kopel: Sonis 3 Iskra (Slovenija)

### 3.3. Programska oprema

Kemijske strukture in kemijske reakcije smo risali z računalniškim programom ChemBioDraw Ultra 14.0 proizvajalca CambridgeSoft. V tem programu smo prav tako izračunali molekulske mase in spojine tudi poimenovali.

Za risanje grafov in analizo meritev absorbanc smo uporabili računalniški program MS Excel 2010. V Excelu smo generirali tudi enačbe umeritvenih krivulij in izračunali vrednosti  $EC_{50}$ .

Pri iskanju lastnosti naših spojin v podatkovnih bazah pa smo si pa pomagali s programom SciFinder Scholar.



## **3.4. Analizne metode**

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

Za TLC analizo smo uporabili kromatografske ploščice z 0,22-milimetrsko plastjo silikagela na aluminijastem nosilcu (Merck, TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>). Spojine smo detektirali s pomočjo UV svetilke (Camag (Indija)) pri valovni dolžini  $\lambda = 254$  nm. Za mobilno fazo smo uporabili etilacetat in petroleter v razmerju 1:1 in diklorometan ter metanol v razmerju 20:1.

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

<sup>1</sup>H NMR spektre smo posneli s spektrometrom Bruker Avance DP<sub>X400</sub> na Fakulteti za farmacijo. Kot topilo smo uporabljali devteriran DMSO-d<sub>6</sub>, spektri pa so bili posneti pri 400 MHz. Spektre smo analizirali s programom MestReC 4.7.0.0.

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

IR spektre sintetiziranih spojin smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo. Najprej smo preiskovano spojino (približno 1 mg) vmešali v kalijev bromid (približno 100 mg), ki je popolnoma transparenten v srednjem IR območju. Zmes smo nato stiskali s stiskalnico pod visokim tlakom in dobili tanko tableto, debelo približno 1 mm, ki smo jo vstavili v nastavek v spektrometer in izmerili IR spekter. Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2 (24).

### **3.4.4. Določanje tališč**

Tališča spojin smo določali s Koflerjevim talilnim mikroskopom proizvajalca Leica z ogrevalno mizico na Fakulteti za farmacijo. Tališča niso korigirana.

### **3.4.5. Test DPPH**

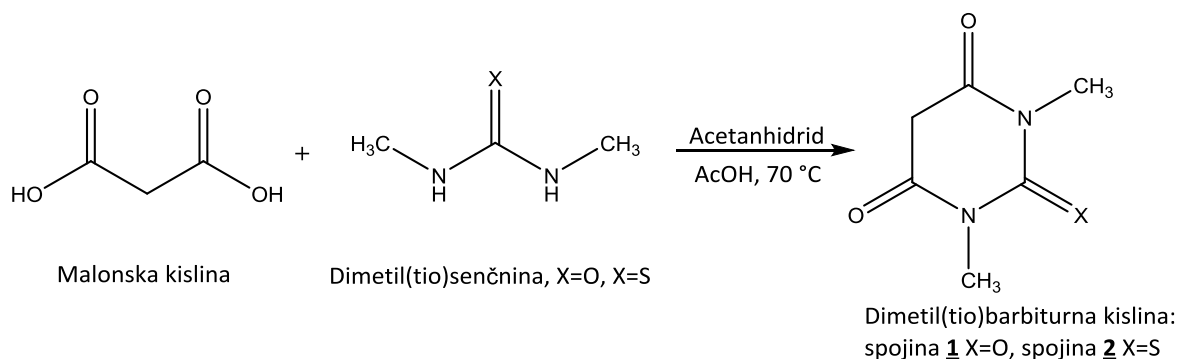
Antioksidativno kapaciteto spojin smo vrednotili s pomočjo testa sposobnosti redukcije radikala DPPH (19,20). Najprej smo metodo optimizirali, da so bile meritve ponovljive, rezultati pa primerljivi z literaturnimi vrednostmi. Za merjenje absorbanc preiskovanih raztopin v končni točki smo uporabljali mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami in mikrotitrski čitalec Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek). Protokol za meritve na mikrotitrskem čitalcu smo pripravili v programu Gen5 (BioTek).

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1. Sinteza

#### 4.1.1. Sinteza *N,N*-dimetil(tio)barbiturne kisline (1,2)

Najprej smo pripravili naši izhodni spojini za nadaljnje reakcije, *N,N*-dimetilbarbiturno (1) in *N,N*-dimetiltiobarbiturno kislino (2).



**Slika 3:** Reakcijska shema sinteze dimetilbarbiturne kisline 1 (X=O) in dimetiltiobarbiturne kisline 2 (X=S)

V 100 mL bučko natehtamo malonsko kislino (1 ekvivalent) in dimetil(tio)sečnino (1 ekvivalent) ter do približno 1/3 bučke napolnimo z očetno kislino. Na koncu dodamo še acetanhidrid (2 ekvivalenta) in magnetno mešalo ter reakcijsko zmes pustimo za 24 ur pri 70 °C. Po 24 urah s pomočjo rotavaporja pri povišani temperaturi (55 °C) in znižanem tlaku odparimo topilo (očetno kislino) dokler ne dobimo oborine na dnu bučke. Dobljeno zmes raztopimo v etanolu in kristaliziramo. Dobljeno raztopino 15 min hladimo na ledu in nato nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem ter sušimo na zraku, da se popolnoma znebimo etanola. Identiteto potrdimo z NMR analizo.

Lastnosti *N,N*-dimetilbarbiturne kisline (1):

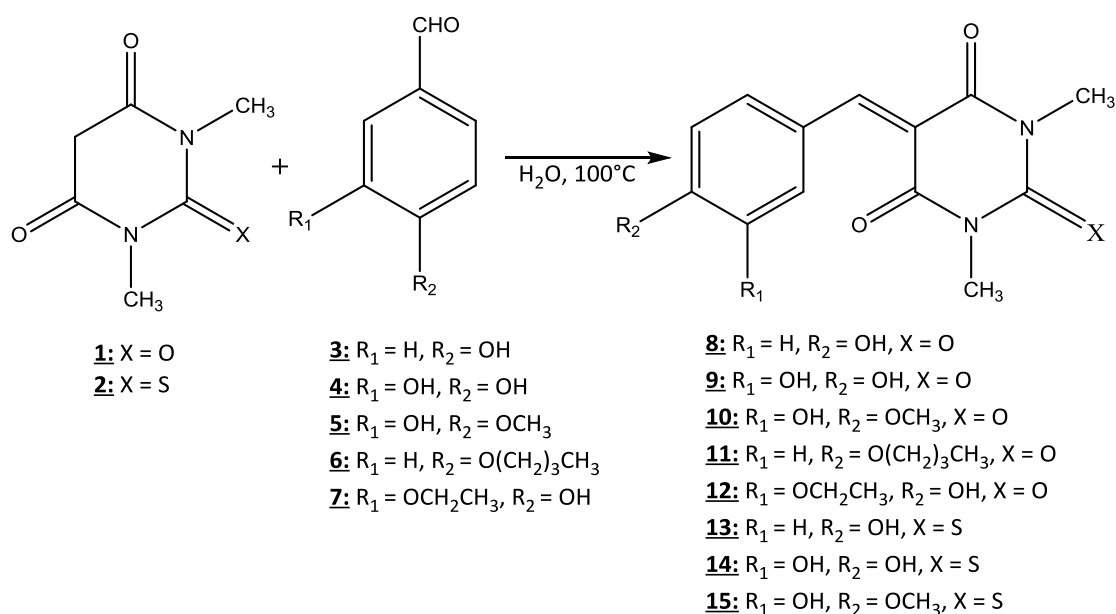
|  |   |
|--|---|
| Izgled   | beli kristali   |
| Molekulska masa  | 156,14 g/mol  |
| Izkoristek   | 49 %  |
| Temperatura tališča  | 120 °C, v literaturi 121 °C (25)                                      |
| <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 3,11 (s, 6H, NCH <sub>3</sub> ), 3,70 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ) ppm |

### Lastnosti *N,N*-dimiltiobarbiturne kisline (**2**):

|                     |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| Izgled              | rumeni kristali                  |
| Molekulska masa     | 172,20 g/mol                     |
| Izkoristek          | 61 %                             |
| Temperatura tališča | 182 °C, v literaturi 183 °C (26) |

#### 4.1.2. Sinteza 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituratov (**8-15**)

Splošni postopek za sinteze 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituratov



**Slika 4:** Reakcijska shema sinteze 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituratov (**8-15**)

100 mg ustreznega benzaldehida (**3-7**) in 1 ekvivalent dimetil(tio)barbiturne kisline (**1** ali **2**) raztopimo v približno 10 mL prečiščene vode. Reakcijsko zmes segrevamo na oljni kopeli za 24 ur pri 100 °C. Oborino izoliramo s filtracijo nastalih kristalov v reakcijski zmesi s presesavanjem, spiramo s prečiščeno vodo in 96% etanolom. Produkt še sušimo v toku zraka, da se v celoti znebimo topila. Produkt analiziramo z <sup>1</sup>H-NMR in IR spektroskopijo.

- **Sinteza 5-(4-hidroksibenziliden)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (**8**)**

Spojino **8** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **3** (78,08 mg; 0,64 mmol) in dimetilbarbiturne kisline (100 mg; 0,64 mmol; **1**).

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | rumeni kristali   |
| <b>Molekulska masa</b>   | 260,25 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 86 %  |
| <b>Temperatura tališča</b>                                       | >250°C, v literaturi 297°C (27)   |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 3,21 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3,23 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 6,89 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH-3,5), 8,29 (s, 1H, CH), 8,32 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH-2,6), 10,84 (s, 1H, OH) ppm |
| <b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> )                               | 3413, 3214, 2956, 2851, 1717, 1675, 1639, 1567, 1509, 1480, 1420, 1388, 1557, 1301, 1260, 1239, 1185, 1159, 1124, 1081, 1014, 972, 857  |

- **Sinteza 5-(3,4-dihidroksibenziliden)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (9)**

Spojino **9** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **4** (88,32 mg; 0,64 mmol) in dimetilbarbiturne kisline (100 mg; 0,64 mmol; **1**).

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | Temno rumeni kristali   |
| <b>Molekulska masa</b>   | 276,25 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 65 %  |
| <b>Temperatura tališča</b>                                       | >280 °C   |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 3,23 (s, 6H, NCH <sub>3</sub> ), 6,87 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz, ArH-5), 7,64 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,4 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1,6 Hz, ArH-6), 8,20-8.21 (m, 2H, ArH-2, CH), 9,52 (s, 1H, OH), 10,46 (s, 1H, OH) ppm, podobno v literaturi (17) |
| <b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> )                               | 3369, 3234, 2956, 1722, 1670, 1633, 1592, 1522, 1470, 1422, 1347, 1295, 1199, 1156, 1115, 1086, 965, 936, 873, 849, 790, 746  |

- **Sinteza 5-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (10)**

Spojino **10** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **5** (97,37 mg; 0,64 mmol) in dimetilbarbiturne kisline (100 mg; 0,64 mmol; **1**).

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | rumeno-oranžni kristali   |
| <b>Molekulska masa</b>   | 290,28 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 77 %  |
| <b>Temperatura tališča</b>                                       | 219 °C, v literaturi 214 – 215 °C (17)  |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 3,22 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3,23 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3,90 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 7,07 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH-5), 7,70 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,0 Hz, ArH-6), 8,11 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz, ArH-2), 8,23 (s, 1H, CH), 9,46 (s, 1H, OH) ppm |
| <b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> )                               | 3442, 3126, 2954, 2852, 1726, 1669, 1578, 1541, 1509, 1466, 1439, 1419, 1385, 1331, 1273, 1251, 1213, 1187, 1133, 1085, 1014, 812, 790  |

- **Sinteza 5-(4-butoksibenziliden)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (11)**

Spojino **11** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **6** (113,92 mg; 0,64 mmol) in dimetilbarbiturne kisline (100 mg; 0,64 mmol; **1**). Sinteza spojine **6** je opisana v spodnjem poglavju: Sinteza 4-butoksibenzaldehida.

|  |  |
|--|--|
| <b>Izgled</b>  | Svetlo rumeni slamnati kristali  |
| <b>Molekulska masa</b>   | 316,36 g/mol   |
| <b>Izkoristek</b>  | 59 %   |
| <b>Temperatura tališča</b>                                       | 128 °C   |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 0,95 (t, 3H, <i>J</i> = 7,6 Hz, CH <sub>3</sub> ), 1,45 (m, 2H, <i>J</i> = 7,6 Hz, CH <sub>2</sub> ), 1,74 (m, 2H, <i>J</i> = 7,6 Hz, CH <sub>2</sub> ), 3,23 (s, 6H, NCH <sub>3</sub> ), 4,12 (t, 2H, <i>J</i> = 7,6 Hz, OCH <sub>2</sub> ), 7,07 (d, 2H, <i>J</i> = 9,2 Hz, ArH-3,5), 8,33-8.35 (m, 3H, ArH-2,6, CH) ppm |
| <b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> )                               | 3850, 3814, 3742, 3417, 2961, 2941, 2875, 1727, 1670, 1604, 1571, 1543, 1509, 1473, 1437, 1416, 1364, 1318, 1273, 1228, 1154, 1084, 1040, 972, 842, 791  |

- **Sinteza 5-(3-etoksi-4-hidroksibenziliden)-1,3-dimetilpirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (12)**

Spojino **12** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **7** (106,36 mg; 0,64 mmol) in dimetilbarbiturne kisline (100 mg; 0,64 mmol; **1**).

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | rumeni kristali   |
| <b>Molekulska masa</b>   | 304,30 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 93 %  |
| <b>Temperatura tališča</b>                                       | 208 °C  |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 1,39 (t, 3H, <i>J</i> = 6,8 Hz, CH <sub>3</sub> ), 3,23 (s, 6H, NCH <sub>3</sub> ), 4,10 (q, 2H, <i>J</i> = 6,8 Hz, OCH <sub>2</sub> ), 6,93 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH-5), 7,82 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,0 Hz ArH-6), 8,29 (s, 1H, CH), 8,38 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz, ArH-2), 10,52 (s, 1H, OH) ppm, podobno v literaturi (17) |
| <b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> )                               | 3847, 3811, 3775, 3682. 3561, 3416, 1720, 1659, 1620, 1562, 1536, 1467, 1449, 1402, 1359, 1296, 1262, 1188, 1086, 1038, 788, 754  |

- **Sinteza 5-(4-hidroksibenziliden)-1,3-dimetil-2-tioksodihidropirimidin-4,6(1H,5H)-diona (13)**

Spojino **13** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **3** (70,76 mg; 0,58 mmol) in dimetiltiobarbiturne kisline (100 mg; 0,58 mmol; **2**). Produkt prečistimo tako, da ga ponovno raztopimo v prečiščeni vodi in etanolu ter ga odnučamo in ga 1 h sušimo v sušilcu. H<sup>1</sup>NMR analiza je potrdila uspešnost čiščenja.

|  |  |
|--|--|
| <b>Izgled</b>  | oranžni kristali   |
| <b>Molekulska masa</b>   | 276,31 g/mol   |
| <b>Izkoristek</b>  | 41 %   |
| <b>Temperatura tališča</b>                                       | 228 °C   |
| <b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) | δ 3,65 (s, 6H, NCH <sub>3</sub> ), 6,92 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH-3,5), 8,35 (s, 1H, CH), 8,37 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz, ArH-2,6), 11,05 (s, 1H, OH) ppm |
| <b>IR</b> (KBr, cm <sup>-1</sup> )                               | 3847, 3740, 3682, 3412, 3234, 1692, 1651, 1617, 1573, 1503, 1444, 1409, 1356, 1298, 1233, 1166, 1113, 1049, 1006, 972, 945, 846, 785                           |

- **Sinteza 5-(3,4-dihidroksibenziliden)-1,3-dimetil-2-tioksodihidropirimidin-4,6(1H,5H)-diona (14)**

Spojino **14** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **4** (80,04 mg; 0,58 mmol) in dimetiltiobarbiturne kisline (100 mg; 0,58 mmol; **2**). Produkt prečistimo tako, da ga ponovno raztopimo v prečiščeni vodi in etanolu ter ga odnučamo in ga 1 h sušimo v sušilcu.  $^1\text{H}$ NMR analiza je potrdila uspešnost čiščenja.

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | oranžni kristali  |
| <b>Molekulska masa</b>                                     | 292,31 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 22 %  |
| <b>Temperatura tališča</b>                                 | 231 °C  |
| <b><math>^1\text{H}</math> NMR</b> (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) | $\delta$ 3,66 (s, 6H, NCH <sub>3</sub> ), 6,90 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, ArH-5), 7,70 (dd, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, ArH-6), 8,24 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, ArH-2), 8,26 (s, 1H, CH), 9,61 (s, 1H, OH), 10,70 (s, 1H, OH) ppm |
| <b>IR</b> (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )                         | 3850, 3485, 2954, 1694, 1647, 1619, 1541, 1515, 1445, 1422, 1376, 1337, 1297, 1187, 1165, 1123, 1107, 1048, 971, 827, 783 768   |

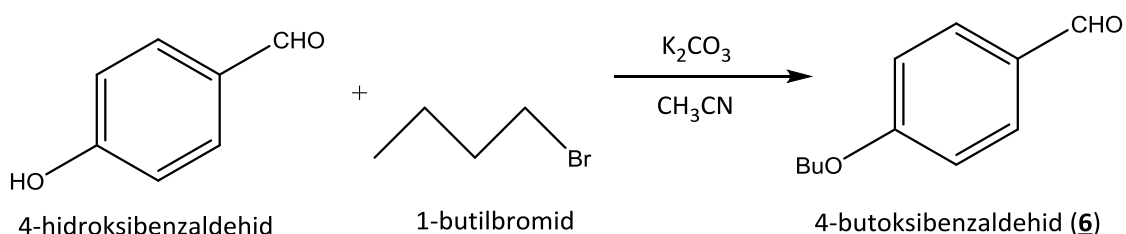
- **Sinteza 5-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-1,3-dimetil-2-tioksodihidropirimidin-4,6(1H, 5H)-diona (15)**

Spojino **15** smo sintetizirali po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden-N,N-dimetil(tio)barbituratov* iz spojine **5** (80,04 mg; 0,58 mmol) in dimetiltiobarbiturne kisline (100 mg; 0,58 mmol; **2**). Produkt prečistimo tako, da ga ponovno raztopimo v prečiščeni vodi in etanolu ter ga odnučamo.  $^1\text{H}$ NMR analiza je potrdila uspešnost čiščenja.

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | oranžni kristali  |
| <b>Molekulska masa</b>                                     | 306,34 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 43 %  |
| <b>Temperatura tališča</b>                                 | 205 °C  |
| <b><math>^1\text{H}</math> NMR</b> (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) | $\delta$ 3,65 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3,66 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3,19 (s, 1H, CH <sub>3</sub> ), 7,10 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, ArH-5), 7,78 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, ArH-6), 8,15 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, ArH-2), 8,29 (s, 1H, CH), 9,53 (s, 1H, OH) ppm |
| <b>IR</b> (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )                         | 3421, 2941, 2838, 2038, 1695, 1658, 1610, 1543, 1500, 1454, 1413, 1361, 1339, 1269, 1194, 1146, 1108, 1023, 974, 931, 884, 810, 767   |

### 4.1.3. Sinteza 4-butoksibenzaldehida (4)

V 25 mL bučki raztopimo 4-hidroksibenzaldehid (500 mg; 4,1 mmol) in kalijev karbonat (1,7 g; 12,3 mmol) v acetonitrilu (10 mL), dodamo magnetno mešalo in nato med mešanjem dodajamo 1-butilbromid (880  $\mu$ L; 8,2 mmol). Celotno zmes segrevamo 24 ur pri 50 °C. Dobimo rdečkasto suspenzijo (suspenzijo zaradi netopnega kalijevega karbonata), katere identiteto potrdimo s tankoplastno kromatografijo (TLC). S pomočjo rotavaporja pri povišani temperaturi in znižanem tlaku odparimo topilo, suhemu zaostanku pa dodamo prečiščeno vodo in vodno fazo ekstahiramo z etilacetatom (10 mL). Organsko fazo speremo z nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in po filtriranju topilo uparimo s pomočjo rotavaporja.  $^1\text{H}$ NMR analiza je potrdila identiteto spojine.



Slika 5: Reakcijska shema sinteze 4-butoksibenzaldehida (6)

|  |   |
|--|---|
| <b>Izgled</b>  | Rumena tekočina, ki začenja kristalizirati  |
| <b>Molekulska masa</b>                                     | 178,23 g/mol  |
| <b>Izkoristek</b>  | 35 %  |
| <b><math>^1\text{H}</math> NMR</b> (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) | $\delta$ 0,94 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, $\text{CH}_3$ ), 1,45 (m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 1,73 (m, 2H, $\text{CH}_2$ ), 4,09 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, $\text{OCH}_2$ ), 7,13 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, ArH-3,5), 7,86 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, ArH-2,6), 9,87 (s, 1H, OH) ppm, podobno v literaturi (28) |
| <b>TLC</b>   | R <sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,85  |

## 4.2. Vrednotenje antioksidativnih lastnosti

### 4.2.2. Priprava vzorcev

Za pripravo osnovnih raztopin DPPH, sintetiziranih spojin **8-15** in standarda  $\alpha$ -tokoferola, smo kot topilo izbrali metanol, saj so vse spojine (ali njihove baze z NaOH) dobro topne v njem. Ko raztopimo spojine, je pomembno, da dobimo bistro raztopino v metanolu, ki pa je lahko obarvana. Sam metanol pa na reakcijo z DPPH-jem ne vpliva (30). Začetna koncentracija



DPPH-ja ne sme imeti absorbanco višjo od 1, saj je to zgornja meja linearnega območja, ki še zagotavlja točnost spektrofotometričnih meritev (30).

Osnovna raztopina DPPH-ja, ki smo jo pripravili, je imela koncentracijo 700  $\mu\text{M}$ . Iz nje smo nato pripravili delovno raztopino, tako da smo osnovno raztopino redčili v razmerju 1:5. Delovna raztopina DPPH-ja je tako imela koncentracijo 140  $\mu\text{M}$ , katere končna koncentracija v reakcijski raztopini je bila po mešanju z vzorcem za polovico nižja, torej 70  $\mu\text{M}$ . Takšna raztopina DPPH ima absorbanco približno 0,7. Osnovno raztopino smo pripravljali vsakodnevno, saj je DPPH v raztopini stabilen le nekaj ur. Ko raztopine nismo uporabljali, smo bučko zavili v aluminijasto folijo in jo hranili v hladilniku. Raztopina DPPH je namreč dokaj občutljiva na svetlobo in kisik (31).

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili  $\alpha$ -tokoferol. Z uporabo pozitivne kontrole spremljamo, ali postopek testa pravilno poteka in omogoča primerjavo vrednosti  $\text{EC}_{50}$  naših sintetiziranih spojin (30).

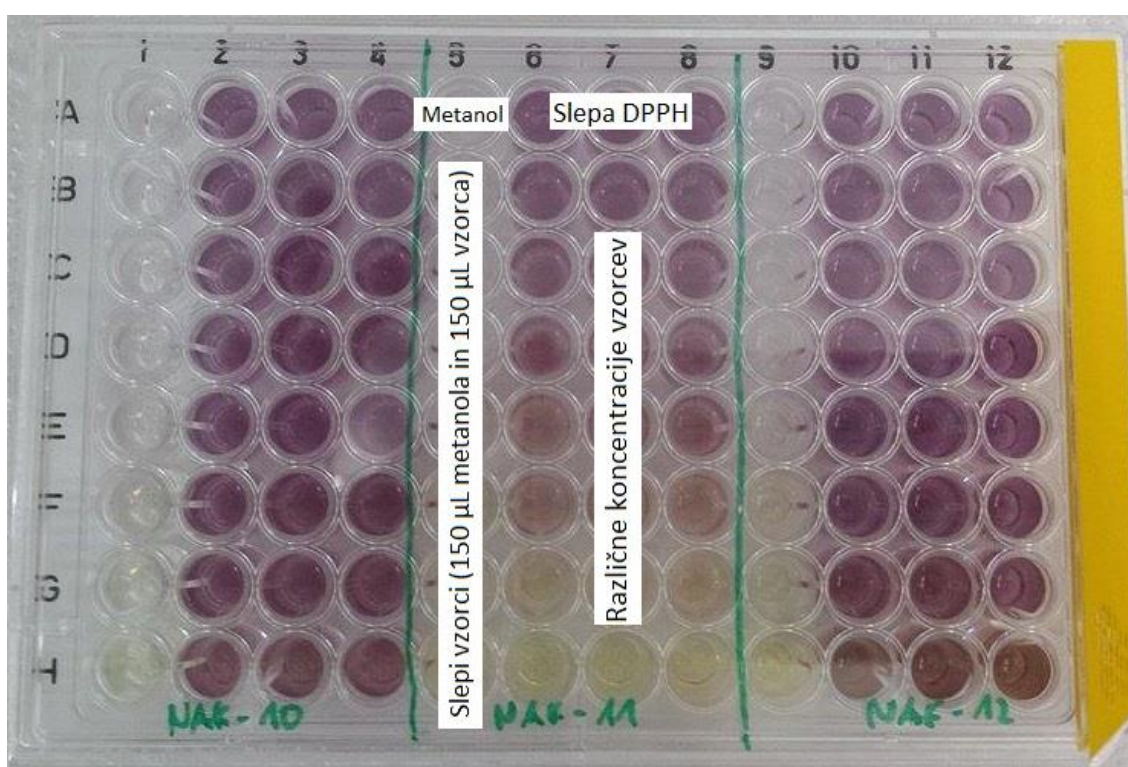
Osnovne 1,4 mM raztopine vseh osmih 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituratov (**8-15**) in  $\alpha$ -tokoferola smo pripravili po enakem postopku kot raztopino DPPH. Z redčenjem osnovnih raztopin smo za vsako spojino pripravili minimalno šest vzorcev različnih koncentracij, ki smo jih nato uporabili za meritve.

#### **4.2.3. Določanje vrednosti $\text{EC}_{50}$**

Sintetiziranim spojinam smo določali 50 % efektivno koncentracijo ( $\text{EC}_{50}$ ). Vrednost  $\text{EC}_{50}$  je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna, da se začetna koncentracija DPPH zniža za 50 %. Nižja vrednost  $\text{EC}_{50}$  pomeni večjo antioksidativno moč spojine (19). Številni raziskovalci so s svojimi eksperimenti dokazali, da obstaja tudi nelinearno razmerje med koncentracijo AO in sposobnostjo lovljenja radikala DPPH. Ravno zato zelo težko določimo vrednost  $\text{EC}_{50}$  (21).

Ko smo pripravili primerne razredčitve, smo jih nanjali na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami kot prikazuje slika 6. Z uporabo mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami smo lahko hkrati testirali 3 spojine v treh paralelkah in 7 različnih koncentracijah. Koncentracije vzorcev, ki smo jih nanašali na ploščo, so bile v intervalu od 3,5  $\mu\text{M}$  do 100  $\mu\text{M}$  (dejanske koncentracije vzorcev pa so bile, zaradi mešanja z osnovno raztopino DPPH v razmerju 1:1, pol manjše). Pri izbiri koncentracije moramo biti zelo previdni, saj bi previsoke ali prenizke koncentracije lahko

pomenile nelinearno razmerje med koncentracijo AO in sposobnostjo lovljenja radikala DPPH. Naše izbrane koncentracije smo izbrali tako, da so še bile v linearnem področju, kar nam je kasneje zelo olajšalo določanje vrednosti  $EC_{50}$ . Ker mikrotitrski čitalec ozadja ne odšteje samodejno, smo na mikrotitrsko ploščo poleg različnih koncentracij vzorcev nanesti tudi slepe vzorce in njihove absorbance pri izračunu  $EC_{50}$  odšteli od absorbance vzorcev. Ko smo vse vzorce, raztopino DPPH in metanol nanesti na ploščo, smo ploščo inkubirali v temnem prostoru pri sobni temperaturi 90 min. Po 90 min smo izmerili absorbance preiskovanih raztopin s pomočjo mikrotitrskega čitalca. Na enak način smo poleg sintetiziranih spojin izmerili antioksidativno delovanje standarda  $\alpha$ -tokoferola.



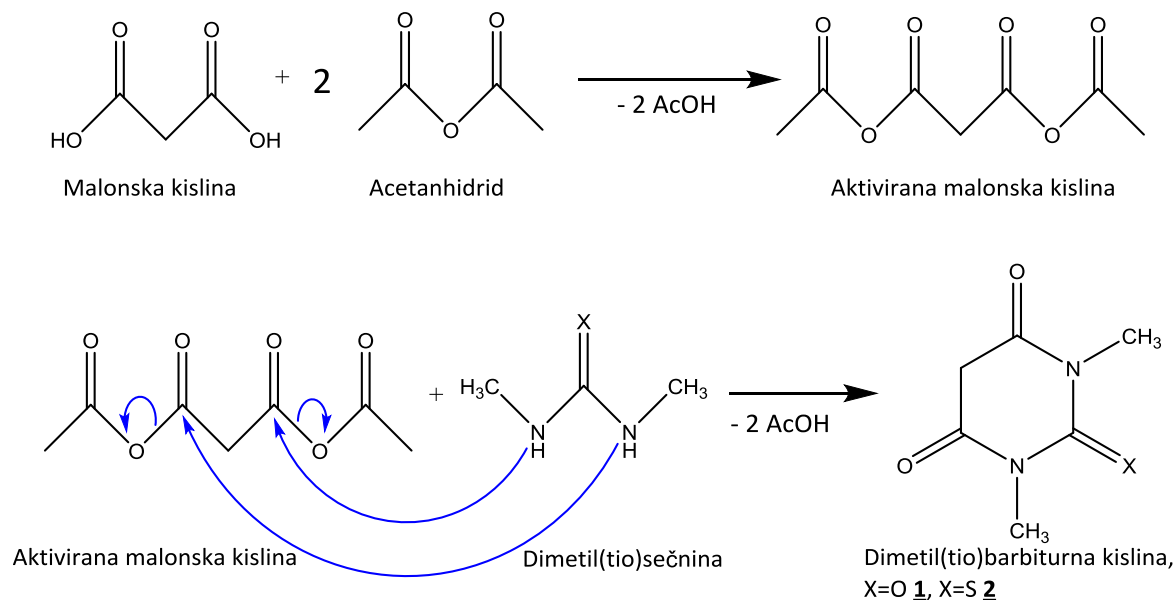
**Slika 6:** Primer nanašanja razredčin vzorcev in reagenta DPPH na mikrotitrsko ploščico. Slepa DPPH: 150  $\mu$ L DPPH in 150  $\mu$ L metanola. Slepi vzorci: 150  $\mu$ L vzorca in 150  $\mu$ L metanola. Vzorci: 150  $\mu$ L razredčine vzorca in 150  $\mu$ L DPPH. V vsaki vdolbinici je končni volumen 300  $\mu$ L.

Ko smo izmerili absorbance različnih koncentracij vzorcev, smo s pomočjo programa Excel narisali graf deleža DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca izračunali enačbo premice in iz enačbe premice izračunali vrednost  $EC_{50}$  ter vrednosti  $EC_{50}$  primerjali med vzorci in standardom.

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. Razlaga reakcijskih mehanizmov

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



Slika 7: Mehanizem reakcije sinteze spojine 1 in 2

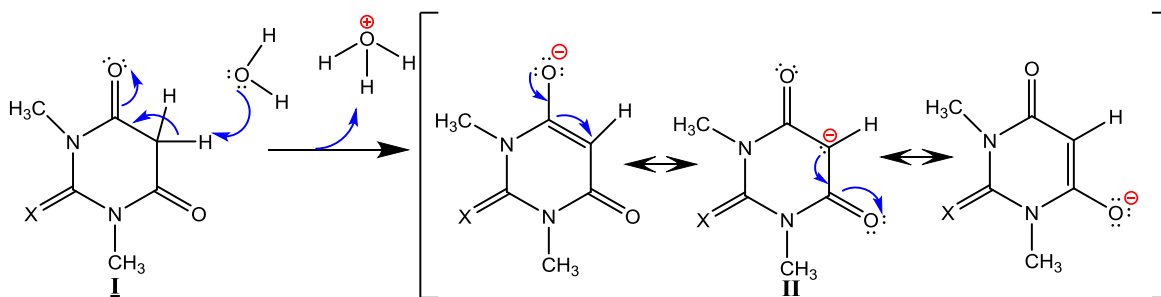
Dimetilbarbiturno (1) in dimetiltiobarbiturno kislino (2) smo sintetizirali z reakcijo malonske kisline z dimetil(tio)sečnino v očetni kislini z aktivatorjem acetanhidridom. Reakcija je sestavljena iz dveh delov, (i) malonsko kislino najprej aktivirata dve molekuli acetanhidrida, pri tem se odcepita 2 molekuli očetne kisline, (ii) mešani anhidrid nato reagira z molekulo dimetil(tio)sečnine, pri tem izstopita 2 molekuli očetne kisline. Malonsko kislino moramo aktivirati, ker sama po sebi ni dovolj reaktivna in z dimetil(tio)sečnino ne bi reagirala. Aktivacijo bi lahko izvedli tudi s tvorbo kislinskega klorida.

#### 5.1.2. Knoevenaglova kondenzacija

Spojine 8-15 smo sintetizirali iz ustreznih benzaldehidov (3-7) in dimetil(tio)barbiturne kisline (1 ali 2) po postopku Knoevenaglove kondenzacije. Knoevenaglova kondenzacija je nukleofilna adicija aktivirane metilenske skupine na karbonilno skupino s sledečo eliminacijo vode in poteče med aldehidi ali ketoni in spojinami z aktivirano metilensko skupino ob prisotnosti baze. Baza odcepi proton iz aktivirane metilenske skupine, pri čemer nastane karboanion, ki se adira na karbonilno skupino. Knoevenaglova kondenzacija je reakcija podobna aldolni

kondenzaciji (32). Reakcija je poimenovana po Emilu Knoevenaglu, ki je prvi opisal reakcijo leta 1894 (33). Pri Knoevenaglovi kondenzaciji so kot katalizatorji navadno uporabljeni amini (npr. trietilamin), a v našem primeru vlogo bazičnega katalizatorja prevzame voda, ki smo jo uporabili kot topilo (34). Knoevenaglova kondenzacija je sestavljena iz dveh delov (i) nukleofilne adicije in (ii) eliminacije vode (kondenzacije).

### **(i) Nukleofilna adicija**

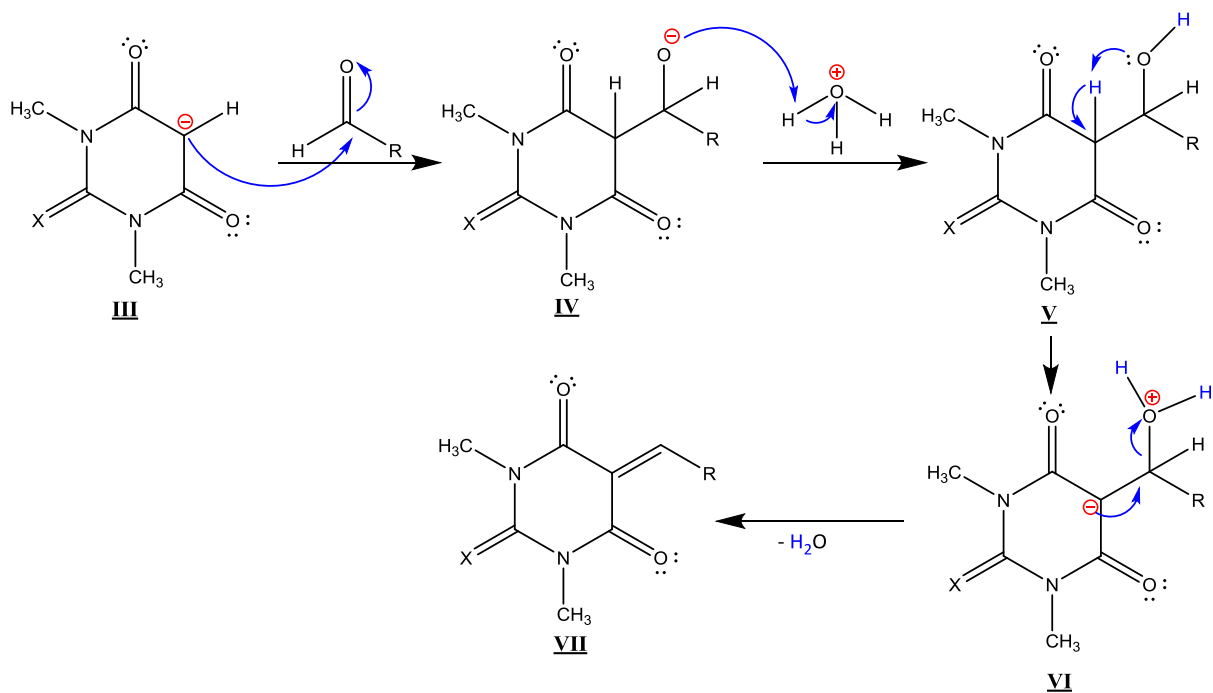


**Slika 8:** Tvorba nukleofila **II** (36)

V prvi stopnji reakcije voda kot baza odtegne proton na  $\alpha$ -ogljikovem atomu iz dimetil(tio)barbiturine kisline, pri čemer nastane resonančno stabiliziran enoladni anion (Slika 8, **II**). Resonančni enoladni anion v drugi stopnji reakcije deluje kot nukleofil in reagira z elektrofilno karbonilno skupino v aldehydu. Produkt nukleofilne adicije je nestabilni intermediat (Slika 9, **IV**), ki v naslednji stopnji odtegne proton iz oksonijevega iona ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Pri tem izstopi molekula vode (35, 36).

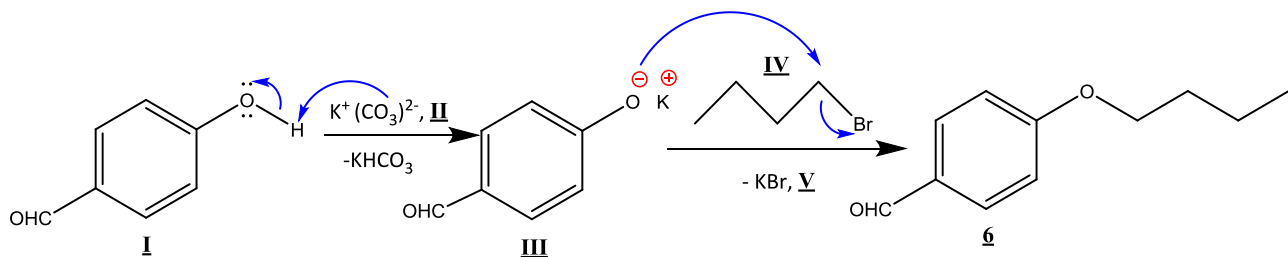
### **(ii) Eliminacija vode**

V naslednji stopnji kisik, vezan na  $\beta$ -ogljik, odtegne še drugi proton, ki je vezan na  $\alpha$ -ogljik in se odcepi v obliki vode. Nastane  $\pi$ -vez med  $\alpha$  in  $\beta$  ogljikom, končni produkt reakcije je  $\alpha,\beta$ -nenasičena karbonilna spojina (Slika 9, **VII**) (36).



Slika 9: Mehanizem Knoevenaglove kondenzacije (36)

### 5.1.3. Sinteza 4-butoksibenzaldehida (**6**)



Slika 10: Mehanizem reakcije sinteze spojine **6**

4-Butoksibenzaldehid (**6**) smo sintetizirali z Williamsonovo sintezo etrov, ki je organska reakcija med alkoholom in halogenoalkani. Reakcijo je opisal Alexander Williamson leta 1850 (37). V prvi stopnji reakcije se iz hidroksi skupine, ki deluje kot šibka kislina, odcepi proton s pomočjo baze (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, slika 10, II). Dobimo fenolatni anion (Slika 10, III), ki deluje kot nukleofil in se poveže s pozitivnim kalijevim ionom v obliki kalijeve soli. V naslednji stopnji fenolatni anion napade elektrofilni α-ogljikov atom v molekuli 1-bromobutana (Slika 10, IV). Pri tem dobimo 4-butoksibenzaldehid (Slika 10, 6), odcepi pa se nam molekula kalijevega bromida (Slika 10, V). Reakcija nukleofilne substitucije poteka po S<sub>N</sub>2 mehanizmu. Največjo oviro za reakcijo po S<sub>N</sub>2 mehanizmu predstavlja sterično oviranje. Bolje je, če v reakciji uporabimo primarne halogenoalkane, ki so najmanj sterično ovirani (38, 39).

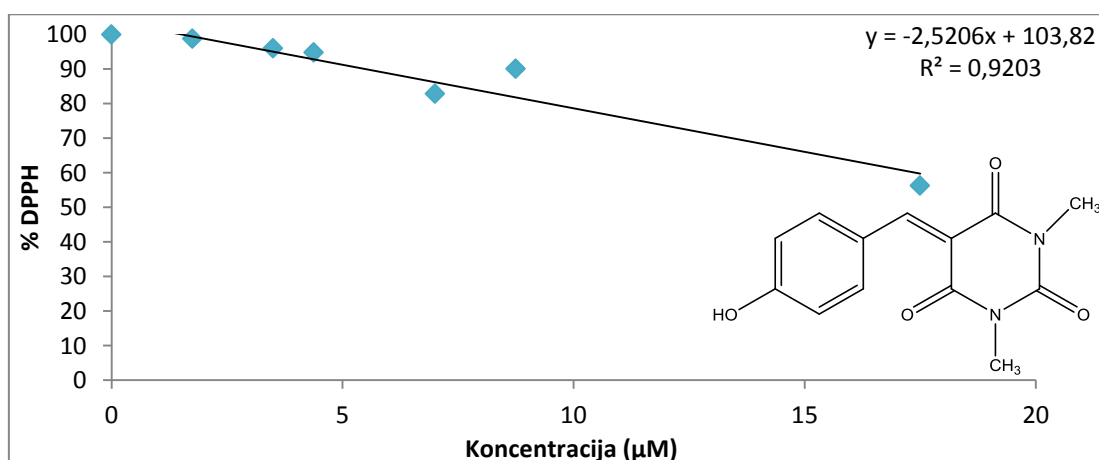
## 5.2. Rezultati testiranja

Po sintezi smo 5-benziliden-*N,N*-dimetil(tio)barbituratom določali antioksidativne lastnosti z testom DPPH. Določali smo vrednosti  $EC_{50}$ . V spodnjih preglednicah so prikazane absorbance in deleži preostalega DPPH-ja v odvisnosti od koncentracije spojin. Rezultate deleža DPPH-ja v odvisnosti od koncentracije spojin smo predstavili v obliki grafov. Za natančen izračun vrednosti  $EC_{50}$  je pomembno, da so dobljene točke čim bolj na premici in enako razporejene. Vrednosti  $R^2$  za vse grafe so blizu 1, kar pomeni, da je razpršenost rezultatov za umeritveno premico primerno majhna. Koncentracije, ki smo jih uporabili se še nahajajo v linearnem območju med koncentracijo AO in sposobnostjo lovljenja radikala DPPH, kar nam je zelo olajšalo določanje vrednosti  $EC_{50}$ .

- **Spojina 8**

| Koncentracija spojine <b>8</b> [ $\mu$ M] | Koncentracija DPPH [ $\mu$ M] | Absorbanca | % DPPH |
|---|-------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                            | 0,638      | 100    |
| 1,75                                      | 70                            | 0,63       | 98,7   |
| 3,5                                       | 70                            | 0,612      | 95,9   |
| 4,38                                      | 70                            | 0,605      | 94,8   |
| 7   | 70                            | 0,528      | 82,8   |
| 8,75                                      | 70                            | 0,575      | 90,1   |
| 17,5                                      | 70                            | 0,359      | 56,3   |

Preglednica I: Rezultati meritev absorbancc spojine **8**

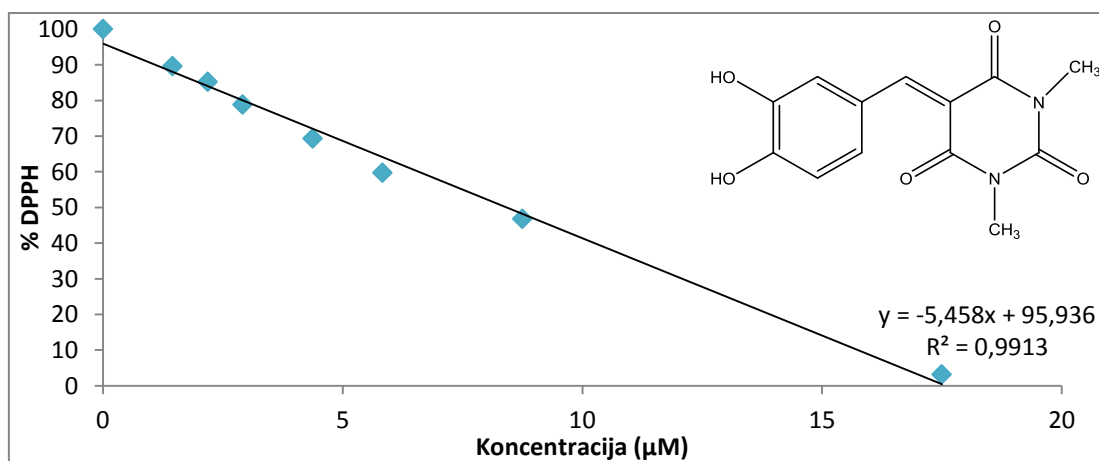


Slika 11: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **8**

- **Spojina 9**

| Koncentracija spojine <b>9</b> [ $\mu\text{M}$ ] | Koncentracija DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|--|--------------------------------------|------------|--------|
| 0  | 70                                   | 0,605      | 100    |
| 1,46   | 70                                   | 0,542      | 89,6   |
| 2,19   | 70                                   | 0,516      | 85,2   |
| 2,92   | 70                                   | 0,477      | 78,8   |
| 4,38   | 70                                   | 0,420      | 69,4   |
| 5,83   | 70                                   | 0,361      | 59,7   |
| 8,75   | 70                                   | 0,283      | 46,8   |
| 17,5   | 70                                   | 0,019      | 3,14   |

**Preglednica II:** Rezultati meritev absorbanca spojine **9**



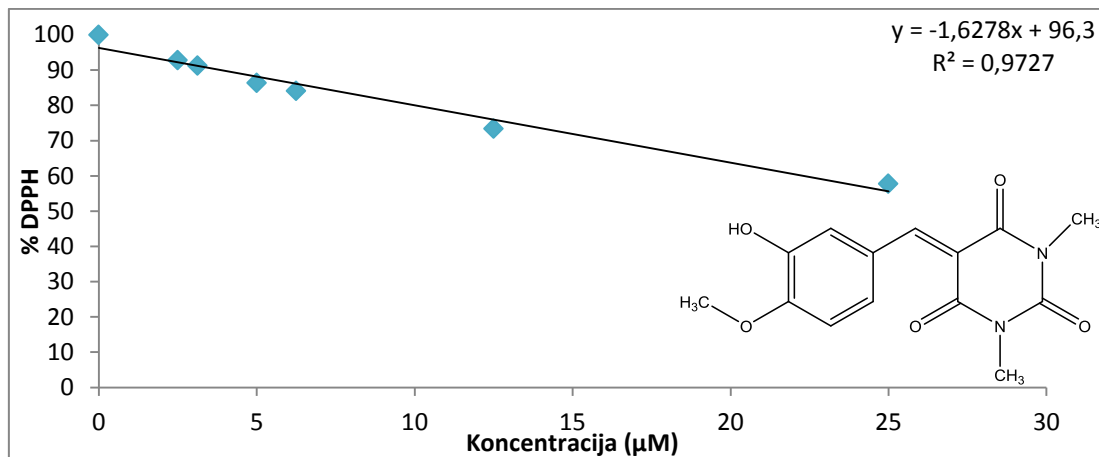
**Slika 12:** Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **9**

- **Spojina 10**

| Koncentracija spojine <b>10</b> [ $\mu\text{M}$ ] | Koncentracija DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|---|--------------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                                   | 0,661      | 100    |
| 2,5   | 70                                   | 0,614      | 92,8   |
| 3,13  | 70                                   | 0,604      | 91,3   |
| 5   | 70                                   | 0,571      | 86,3   |
| 6,25  | 70                                   | 0,556      | 84,1   |
| 12,5  | 70                                   | 0,485      | 73,3   |

|    |    |       |      |
|----|----|-------|------|
| 25 | 70 | 0,382 | 57,7 |
|----|----|-------|------|

Preglednica III: Rezultati meritev absorbcanc spojine 10

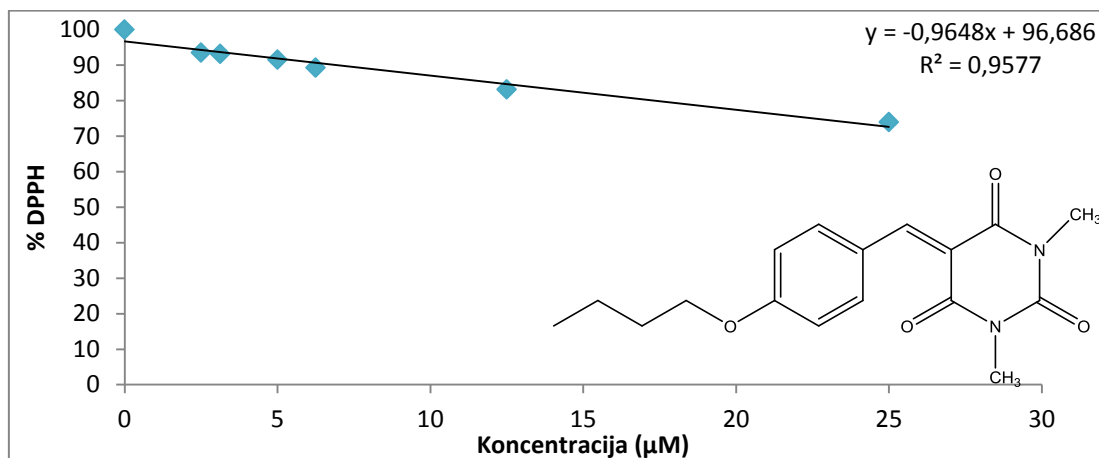


Slika 13: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 10

- **Spojina 11**

| Koncentracija spojine <u>11</u> [µM] | Koncentracija DPPH | Absorbanca | % DPPH |
|--------------------------------------|--------------------|------------|--------|
| 0                                    | 70                 | 0,659      | 100    |
| 2,5                                  | 70                 | 0,616      | 93,5   |
| 3,13                                 | 70                 | 0,613      | 93,1   |
| 5                                    | 70                 | 0,603      | 91,5   |
| 6,25                                 | 70                 | 0,588      | 89,2   |
| 12,5                                 | 70                 | 0,548      | 83,1   |
| 25                                   | 70                 | 0,487      | 73,9   |

Preglednica IV: Rezultati meritev absorbcanc spojine 11



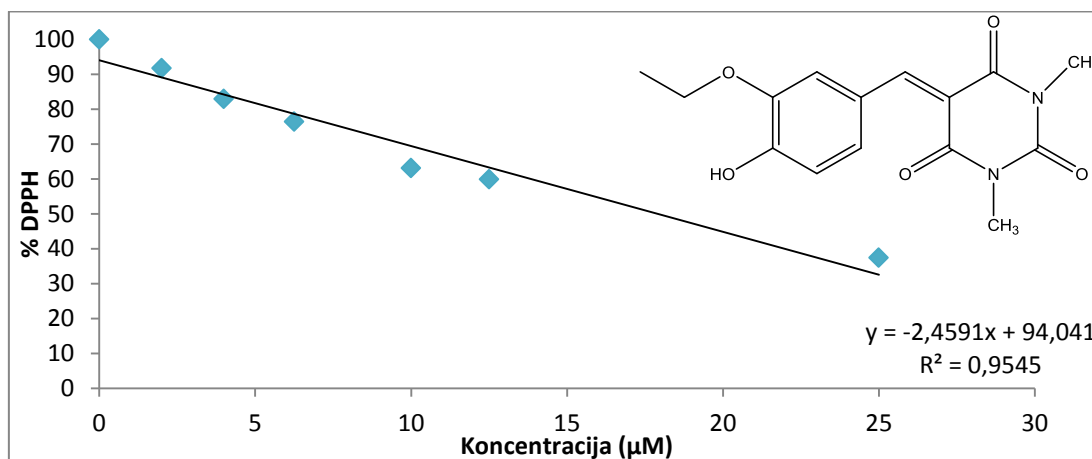
Slika 14: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 11



- **Spojina 12**

| Koncentracija spojine <b>12</b> [ $\mu\text{M}$ ] | Koncentracija DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|---|--------------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                                   | 0,566      | 100    |
| 2   | 70                                   | 0,519      | 91,7   |
| 4   | 70                                   | 0,469      | 82,9   |
| 6,25  | 70                                   | 0,433      | 76,4   |
| 10  | 70                                   | 0,357      | 63,1   |
| 12,5  | 70                                   | 0,339      | 59,9   |
| 25  | 70                                   | 0,212      | 37,4   |

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

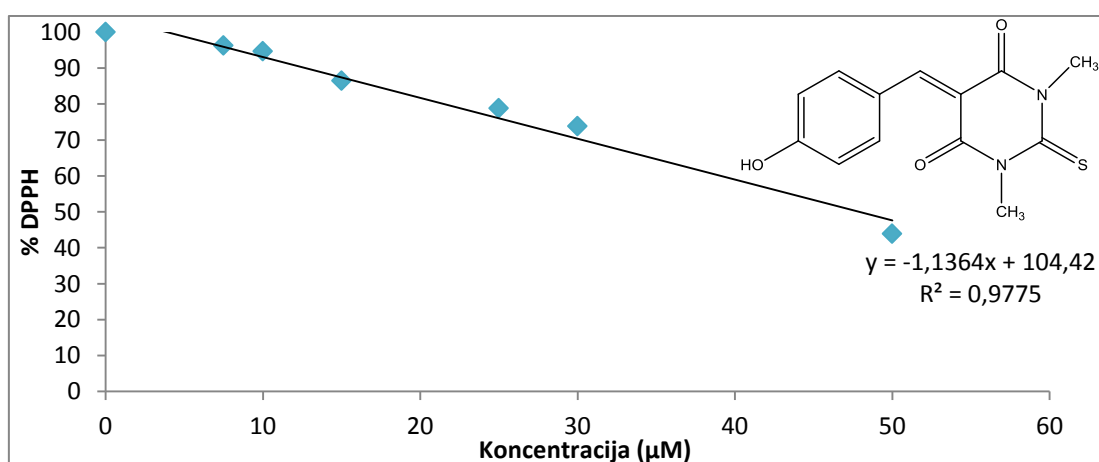


**Slika 15:** Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **12**

- **Spojina 13**

| Koncentracija spojine <b>13</b> [ $\mu\text{M}$ ] | Koncentracija DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|---|--------------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                                   | 0,593      | 100    |
| 3,75  | 70                                   | 0,597      | 101    |
| 7,5   | 70                                   | 0,571      | 96,3   |
| 10  | 70                                   | 0,561      | 94,7   |
| 15  | 70                                   | 0,513      | 86,5   |
| 25  | 70                                   | 0,467      | 78,8   |
| 30  | 70                                   | 0,438      | 73,8   |
| 50  | 70                                   | 0,260      | 43,9   |

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

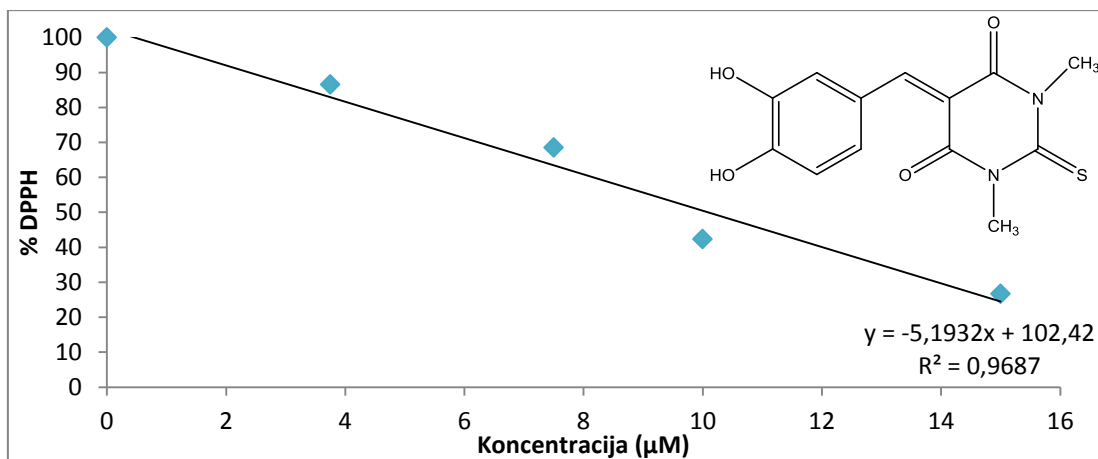


**Slika 16:** Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **13**

- **Spojina 14**

| Koncentracija spojine <b>14</b> [ $\mu\text{M}$ ] | Koncentracija DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|---|--------------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                                   | 0,603      | 100    |
| 3,75  | 70                                   | 0,522      | 86,5   |
| 7,5   | 70                                   | 0,413      | 68,4   |
| 10  | 70                                   | 0,255      | 42,3   |
| 15  | 70                                   | 0,161      | 26,6   |

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

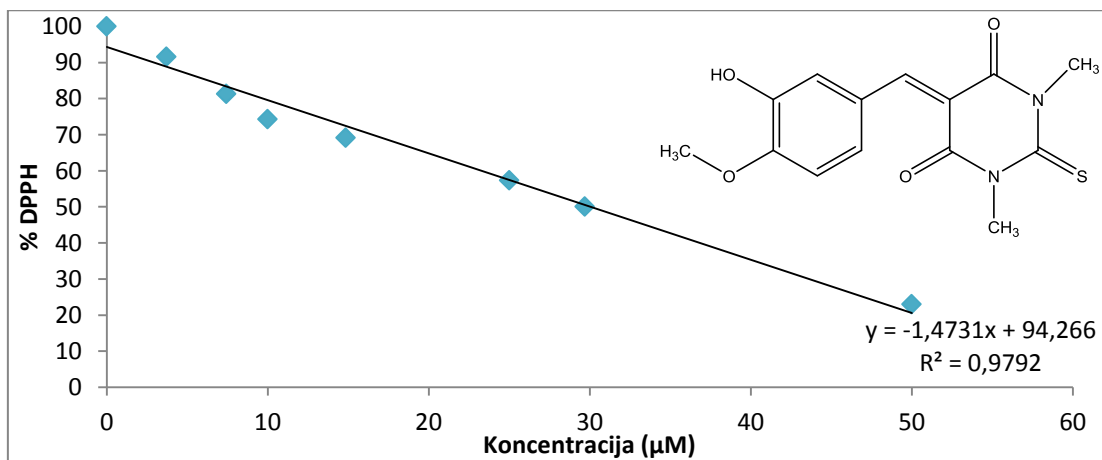


Slika 17: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 14

- **Spojina 15**

| Koncentracija spojine <u>15</u> [ $\mu\text{M}$ ] | Koncentracija DPPH [ $\mu\text{M}$ ] | Absorbanca | % DPPH |
|---|--------------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                                   | 0,614      | 100    |
| 3,72  | 70                                   | 0,563      | 91,6   |
| 7,43  | 70                                   | 0,500      | 81,3   |
| 10  | 70                                   | 0,457      | 74,3   |
| 14,9  | 70                                   | 0,425      | 69,1   |
| 25  | 70                                   | 0,352      | 57,3   |
| 29,7  | 70                                   | 0,308      | 50,1   |
| 50  | 70                                   | 0,141      | 23,0   |

Preglednica VIII: Rezultati meritev absorbcanc spojine 15

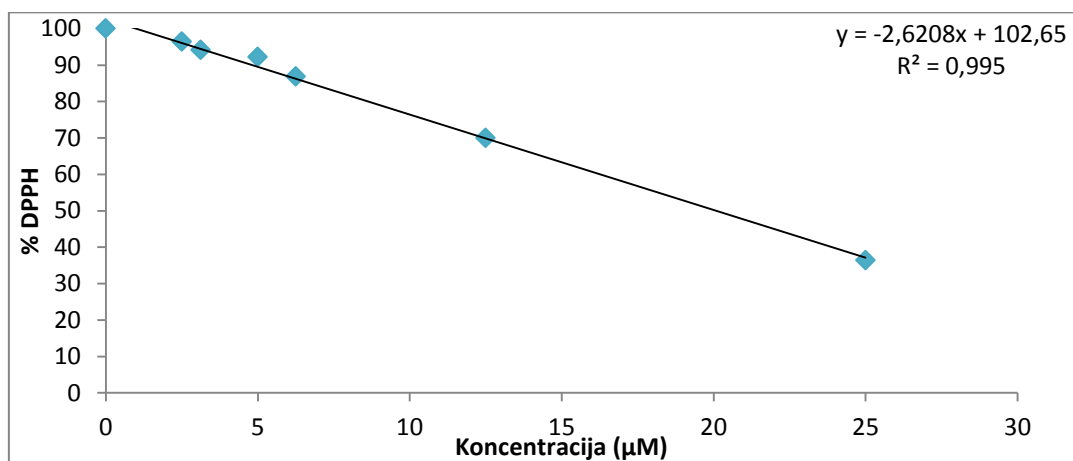


Slika 18: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 15

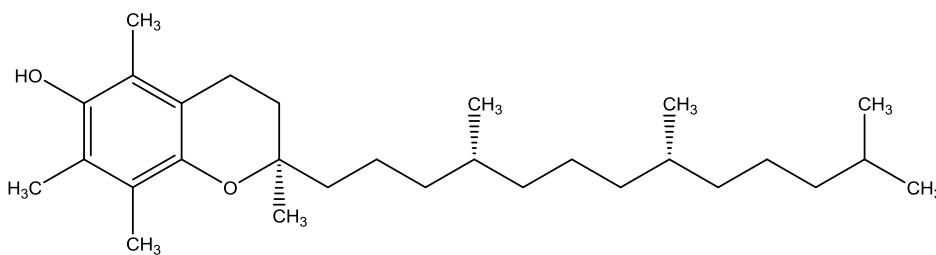
- $\alpha$ -tokoferol

| Koncentracija $\alpha$ -tokoferola [ $\mu$ M] | Koncentracija DPPH [ $\mu$ M] | Absorbanca | % DPPH |
|---|-------------------------------|------------|--------|
| 0   | 70                            | 0,569      | 100    |
| 3,13  | 70                            | 0,535      | 94,1   |
| 2,5   | 70                            | 0,548      | 96,4   |
| 6,25  | 70                            | 0,494      | 86,9   |
| 5   | 70                            | 0,524      | 92,2   |
| 12,5  | 70                            | 0,398      | 69,9   |
| 25  | 70                            | 0,207      | 36,4   |

Preglednica IX: Rezultati meritev absorbcanc  $\alpha$ -tokoferola



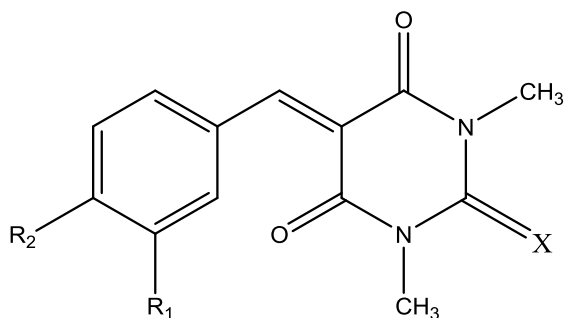
Slika 19: Delež DPPH v odvisnosti od koncentracije  $\alpha$ -tokoferola



Slika 20: Strukturna formula  $\alpha$ -tokoferola

### 5.3. Komentar rezultatov testiranja

Petim derivatom 5-benziliden-*N,N*-dimetilbarbiturne (**8-12**) in trem derivatom 5-benziliden-*N,N*-dimetiltiobarbiturne (**13-15**) kisline smo določali antioksidativne lastnosti s pomočjo testa DPPH. Vsakemu posebej in standardu  $\alpha$ -tokoferolu smo določili vrednosti  $EC_{50}$ , ki smo jih izračunali iz enačb umeritvenih premic. Zanimalo nas je, kako spremembe na fenilnem obroču in zamenjava kisika z žveplom vplivajo na antioksidativne lastnosti derivatov.

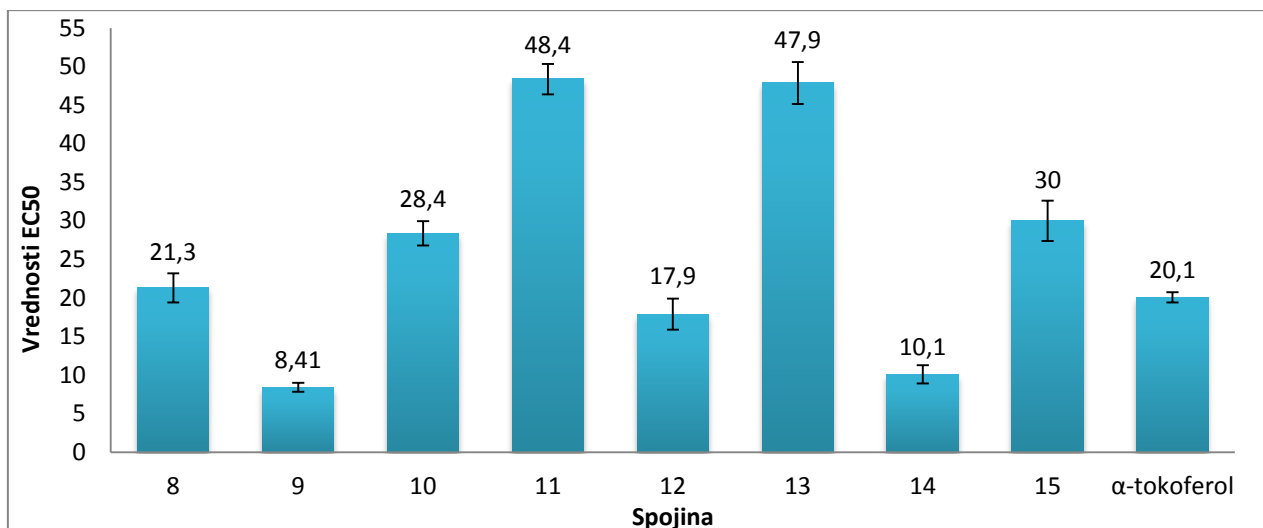


Slika 21: Strukturna formula spojin **8-15**

| Spojina             | R <sub>1</sub>                   | R <sub>2</sub>                                   | X | EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] |
|---------------------|----------------------------------|--|---|-----------------------------|
| <b>8</b>            | H                                | OH   | O | 21,3 $\pm$ 1,88             |
| <b>9</b>            | OH                               | OH   | O | 8,41 $\pm$ 0,568            |
| <b>10</b>           | OH                               | OCH <sub>3</sub>                                 | O | 28,4 $\pm$ 1,57             |
| <b>11</b>           | H                                | O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | O | 48,4 $\pm$ 1,97             |
| <b>12</b>           | OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | OH   | O | 17,9 $\pm$ 2,03             |
| <b>13</b>           | H                                | OH   | S | 47,9 $\pm$ 2,72             |
| <b>14</b>           | OH                               | OH   | S | 10,1 $\pm$ 1,20             |
| <b>15</b>           | OH                               | OCH <sub>3</sub>                                 | S | 30,0 $\pm$ 2,61             |
| $\alpha$ -tokoferol | -                                | -  | - | 20,1 $\pm$ 0,665            |

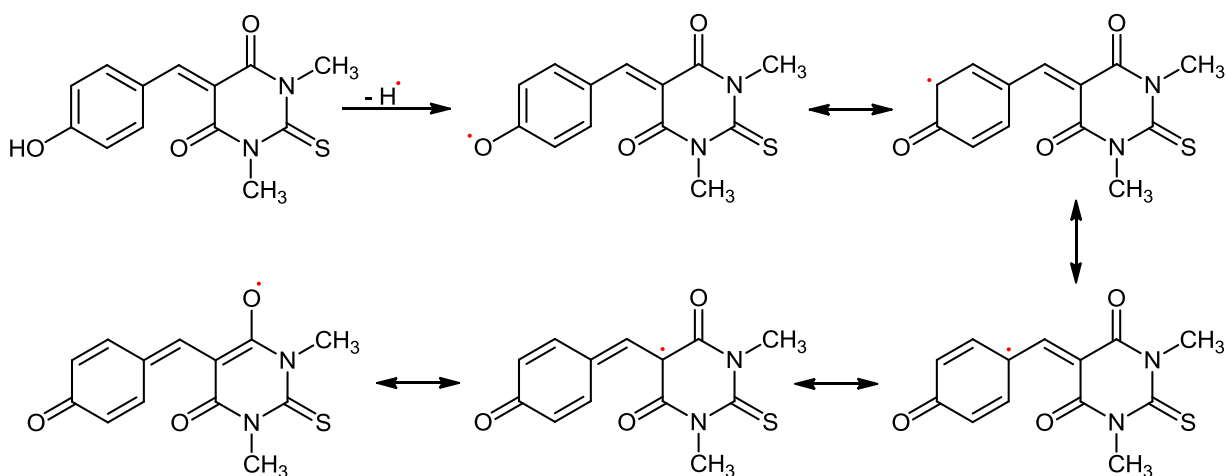
Preglednica X: Vrednosti  $EC_{50}$  testiranih spojin **8-15** in  $\alpha$ -tokoferola

Spojine **9** ( $EC_{50} = 8,41 \pm 0,568 \mu\text{M}$ ), **12** ( $EC_{50} = 17,9 \pm 2,03 \mu\text{M}$ ) in **14** ( $EC_{50} = 10,1 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ) imajo sodeč po rezultatih testa DPPH boljše antioksidativne lastnosti kot standard  $\alpha$ -tokoferol ( $EC_{50} = 20,1 \pm 0,665 \mu\text{M}$ ). Spojini **8** ( $EC_{50} = 21,3 \pm 1,88 \mu\text{M}$ ) in **10** ( $EC_{50} = 28,4 \pm 1,57 \mu\text{M}$ ) imata primerljivo antioksidativno aktivnost kot  $\alpha$ -tokoferol in spojine **11** ( $EC_{50} = 48,4 \pm 1,97 \mu\text{M}$ ), **13** ( $EC_{50} = 47,9 \pm 2,72 \mu\text{M}$ ) ter **15** ( $EC_{50} = 30,0 \pm 2,61 \mu\text{M}$ ) pa izkazujejo slabše antioksidativne lastnosti kot  $\alpha$ -tokoferol (Preglednica X).



Slika 22: Histogramski prikaz vrednosti EC<sub>50</sub> testiranih spojin **8-15** in α-tokoferola

Z določanjem vrednosti EC<sub>50</sub> standarda α-tokoferola smo preverili, če je izbrana testna metoda ustrezna. Literaturne vrednosti EC<sub>50</sub> za α-tokoferol so zelo različne in so zelo odvisne od pogojev testiranja ter se gibljejo od 15 do 25 μM (40, 41), kar pomeni, da je naša testna metoda ustrezna, saj smo izmerili EC<sub>50</sub> za α-tokoferol 20,1 ± 0,665 μM.



Slika 23: Prikaz resonančne stabilizacije radikala spojine **8**

Najmočnejše antioksidativno delovanje ima po pričakovanju spojina **9** (EC<sub>50</sub> = 8,41 ± 0,568 μM), ki ima 2 prosti -OH skupini vezani na fenilni obroč, eno na *meta* in drugo pa *para* mestu, in tako lahko donira 2 H atoma. Spojina **9** tako nevtralizira 2 molekuli DPPH. Najprej nastane fenoksi radikal na aromatskem obroču, ki je stabiliziran s konjugacijo. Antioksidativno delovanje pa je zelo odvisno od možnosti stabilizacije nastalih radikalov (17). Ko spojina **9** odda še drugi H atom, se oksidira do *orto* kinona. Spojina **8** (EC<sub>50</sub> = 21,3 ± 1,88 μM), ki ima le eno -OH skupino vezano na *para* mesto, prav tako deluje kot dokaj močan antioksidant, a

nima tolikšne kapacitete kot spojina **9**. Iz tega lahko sklepamo, da na antioksidativno kapaciteto vpliva število -OH skupin, ki lahko donirajo H atome. Spojina **8** ( $EC_{50} = 21,3 \pm 1,88 \mu\text{M}$ ) ima zelo podobno vrednost  $EC_{50}$  kot standard,  $\alpha$ -tokoferol ( $EC_{50} = 20,1 \pm 0,665 \mu\text{M}$ ). Obe spojini imata namreč eno samo prosto -OH skupino in tako lahko radikalu DPPH donirata le 1 H atom. Na sliki 23 je prikazano, kako poteka resonančna stabilizacija nastalega radikala spojine **8**.

Najmanjše antioksidativno delovanje pa ima po pričakovanju spojina **11** ( $EC_{50} = 48,4 \pm 1,97 \mu\text{M}$ ), ki ima na fenilni obroč vezano butoksi skupino, prostih -OH skupin pa nima. Za antioksidativno delovanje te spojine je najverjetneje odgovoren barbiturni del molekule ali pogojno konjugirana dvojna vez, na katero lahko poteče adicija radikala DPPH. Ker ima barbiturni del strukture na dušikih vezane metilne skupine, vemo, da dušik neposredno ni odgovoren za antioksidativno delovanje.

Iz primerjave vrednosti  $EC_{50}$  spojine **10** ( $EC_{50} = 28,4 \pm 1,57 \mu\text{M}$ ), ki ima na mestu 3 -OH skupino in na mestu 4 metoksi skupino, ter spojine **12** ( $EC_{50} = 17,9 \pm 2,03 \mu\text{M}$ ), ki ima na mestu 3 etoksi skupino in mestu 4 -OH skupino, lahko sklepamo, da na antioksidativno aktivnost vpliva tudi mesto, na katero je vezana prosta -OH skupina. Ko potencialni antioksidant donira H atom radikalu, nastane iz njega radikal in od stabilnosti le tega je odvisna antioksidativna aktivnost. Kot boljši antioksidant se je izkazala spojina **12**, ki ima -OH skupino vezano na *para* mestu. Nastali radikal spojine **12** ima več resonančnih struktur, ki se stabilizirajo z delokalizacijo elektrona po celotni strukturi spojine preko konjugirane dvojne vezi (elektron se prenese tudi na dimetil(tio)barbiturni obroč). Nastali radikal spojine **10** (-OH skupina na *meta* mestu) pa ima manj resonančnih struktur, saj resonančna stabilizacija z delokalizacijo elektrona poteka le po fenolnem obroču in se ne prenese na dimetil(tio)barbiturni obroč.

Zanimalo nas je tudi, kako na antioksidativno delovanje vpliva zamenjava dimetilbarbiturnega obroča z dimetiltiobarbiturnim. Rezultati kažejo, da večjo aktivnost izkazujejo derivati dimetilbarbiturne kisline. Spojina **9** ( $EC_{50} = 8,41 \pm 0,568 \mu\text{M}$ ) in spojina **14** ( $EC_{50} = 10,1 \pm 1,12 \mu\text{M}$ ), ki se razlikujeta le v tem, da ima prva dimetilbarbiturni obroč, druga pa dimetiltiobarbiturni obroč, delujeta kot močna antioksidanta, vrednosti  $EC_{50}$  sta primerljivi, a spojina **9** izkazuje rahlo boljšo aktivnost. Razlog, da so derivati dimetilbarbiturne kisline boljši AO, je verjetno v tem, da imajo radikali, ki nastanejo po donaciji H atoma, več resonančnih struktur in so posledično bolj stabilni. Največjo razliko med derivatom dimetilbarbiturne in

derivatom dimetitiobarbiturne kisline opazimo pri spojini **8** in spojini **13**,  $EC_{50}$  prve je  $21,3 \pm 1,88 \mu\text{M}$  in  $EC_{50}$  druge je  $47,9 \pm 2,72 \mu\text{M}$ . Razlog za tako različna rezultata je verjetno v tem, da ima radikal spojine **8** veliko več resonančnih struktur kot radikal spojine **13**.



## 6. SKLEP

V predstavljenem raziskovalnem delu smo s Knoevenaglovo kondenzacijo pripravili pet derivatov 5-benziliden-*N,N*-dimetilbarbiturne kisline in tri derivate 5-benziliden-*N,N*-dimetiltioarbiturne kisline z reakcijo med dimetil(tio)barbiturno kislino in različnimi benzaldehidi. Nato smo s pomočjo testa DPPH preverjali, kako struktura molekule vpliva na antioksidativno kapaciteto. Test DPPH temelji na tem, da molekula DPPH sprejme vodikov atom iz antioksidanta, pri čemer pride do redukcije DPPH v stabilen 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H), vijolično obarvanje se spremeni v rumeno, sočasno pa pride do zmanjšanja absorbance sorazmerno s številom doniranih vodikovih atomov. Rezultate smo podali kot vrednosti  $EC_{50}$ , ki so definirane kot koncentracije antioksidanta, ki povzročijo 50% zmanjšanje v absorbanci testne raztopine DPPH in jih med seboj lahko primerjamo. Nižja vrednost  $EC_{50}$  pomeni večjo antioksidativno moč spojine.

- Najmočnejše antioksidativno delovanje izkazujeta derivata z dvema prostima -OH skupinama na fenilnem obroču: spojini **9** in **14**, ki lahko donirata 2 H atoma in tako nevtralizirata 2 molekuli DPPH.
- Spojina **8**, ki ima le eno prosto -OH skupino, izkazuje slabše delovanje kot derivat z dvema -OH skupinama, zato lahko sklepamo, da na jakost antioksidativnega delovanja vpliva število -OH skupin, ki jih vsebuje potencialen antioksidant.
- Najšibkejšo antioksidativno delovanje izkazuje derivat, ki na fenilnem obroču nima -OH skupin, vezano pa ima le butoksi skupino (spojina **11**).
- Na antioksidativno jakost poleg števila -OH skupin vpliva tudi mesto, na katero je vezana -OH skupina. To smo ugotovili iz primerjave vrednosti  $EC_{50}$  spojine **10** (višja vrednost  $EC_{50}$ ), ki ima -OH skupino na mestu 3, na mestu 4 pa metoksi skupino ter spojine **12** (nižja vrednost  $EC_{50}$ ), ki ima OH skupino na mestu 4, na mestu 3 pa etoksi skupino.
- Zamenjava kisika z žveplom v dimetilbarbiturnem obroču nekoliko zmanjša antioksidativno kapaciteto spojin. Razlog, da so derivati dimetilbarbiturne kisline boljši antioksidanti, je verjetno v tem, da imajo radikali, ki nastanejo po donaciji H atoma, več resonančnih struktur in so posledično bolj stabilni.

Antioksidanti so zelo pomembne sestavine kozmetičnih izdelkov, saj preprečujejo neželjeno delovanje radikalov in preprečijo oksidativni stres. Ravno zato je razvoj novih AO (tudi derivatov (tio)barbiturne kisline) v farmaciji in kozmetologiji dandanes zelo aktualen.

## LITERATURA

- (1) Junkins-Hopkins J. M.: Antioxidants and their chemopreventive properties in dermatology. *Dialogues in Dermatology* 2010; 62: 663-5
- (2) Halliwell B., Gutteridge J.: *Free radicals in biology and medicine*; 4. izdaja, Oxford University Press Inc., New York, 2007: 30-81
- (3) Pisoschi A. M., Pop A.: The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- (4) Valgimigli L., Pratt D. A.: Antioxidants in Chemistry and Biology. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* 2012; (by John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470971253.rad055)
- (5) Khan K. M., Alia M., Ajaza A., Perveenb S., Choudharya M. I., Atta-ur-Rahmana: Synthesis of 5-Arylidene Barbiturates: A Novel Class of DPPH Radical Scavengers. *Letters in Drug Design & Discovery* 2008; 5: 286-291
- (6) Zvonar A., Kočevar Glavač N.: *Kozmetologija II: koža in sonce: kozmetično aktivne sestavine: izdelki za zaščito in aktivno nego kože: strokovno izobraževanje*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 61-72
- (7) Kohen R., Gati I.: Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging. *Toxicology* 2000; 148: 149–157
- (8) Cornelli U.: Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology* 2009; 27: 175–194
- (9) Kristl J.: *Koža, sonce, zdravje, lepota: [izobraževanje farmacevtov]*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2004: 23-42
- (10) Kohen R.: Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed & Pharmacother* 1999; 53: 181-92
- (11) Masaki H.: Role of antioxidants in the skin - Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science* 2010; 58: 85–90

- (12) Mitsui T.: New cosmetic science, First edition, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997: 157-161 (<http://www.slideshare.net/ivancastaneda925/new-cosmetic-science-t-mitsui-editor>, dostopano: 3.6.2015)
- (13) Sokmen B. B., Ugras S., Sarikaya H. Y., Ugras H. Y., Yanardag R.: Antibacterial, Antiurease, and Antioxidant Activities of Some Arylidene Barbiturates. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 171: 2030–2039
- (14) Lupo M. P.: Antioxidants and Vitamins in Cosmetics. *Clinics in Dermatology* 2001; 19: 467–473
- (15) Ramos-e-Silva M., Celem L. R., Ramos-e-Silva S., Fucci-da-Costa A. P.: Anti-aging cosmetics - Facts and controversies. *Clinics in Dermatology* 2013; 31: 750–758
- (16) Zidar N., Kikelj D.: Preparation and Reactivity of 5-benzylidenebarbituric and 5-benzylidene-2-thiobarbituric Acids. *Acta Chim. Slov.* 2011; 58: 151-157
- (17) Khan K. M., Khan M., Alia M, Tahaa M., Hameeda A., Alia S., Perveenb S., Choudharya M. I.: Synthesis and DPPH Radical Scavenging Activity of 5-Arylidene-*N,N*-dimethylbarbiturates. *Medicinal Chemistry* 2011; 7: 231-236
- (18) Khan K. M., Ali M., Wadoodc A., Zaheer-ul-Haqc , Khan M., Lodhia M. A., Perveend S., Choudharya M. I., Voelttere W.: Molecular modeling-based antioxidant arylidene barbiturates as urease Inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2011; 30: 153–156
- (19) Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. K.: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 2012; 130: 1036–1043
- (20) Hossain S. U., Bhattacharya S.: Synthesis of O-prenylated and O-geranylated derivatives of 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones and evaluation of their free radical scavenging activity as well as effect on some phase II antioxidant/detoxifying enzymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 1149–1154
- (21) Chen Z., Bertin R., Frolidi G.: EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 2013; 138: 414–420
- (22) Sharma O.P., Bhat T.K.: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009; 113: 1202–1205

- (23) Avestic M.: Ocena varne uporabe fenolnih antioksidantov in njihovih derivatov v kozmetičnih izdelkih : diplomska naloga (Ljubljana, 2015) ([http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2015/Avsec\\_Mihael\\_mag\\_nal\\_2015.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2015/Avsec_Mihael_mag_nal_2015.pdf), dostopano 13.6.2015)
- (24) Rihtarič M.: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev vrbovcev in krčnic s transmisijsko infrardečo spektroskopijo : diplomska naloga (Ljubljana, 2010) ([http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2010/Rihtaric\\_Metka\\_dipl\\_nal\\_2010.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2010/Rihtaric_Metka_dipl_nal_2010.pdf), dostopano 21.6.2015)
- (25) Pfeleiderer, Wolfgang, Schundehutte, Heinz K.: Investigations in the pyrimidine series, IV. Reactions of 1,3-dimethyl-6-chlorouracil. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (1957); 612: 158-63
- (26) Shepherd R. G.: Pyrimidine polymethine dyes and their formation by ring cleavage of heterocycle. *Journal of the Chemical Society* (1964); 848: 4410-4419
- (27) Kaupp G., Naimi-Jamal M. R., Schmeyers J.: Solvent-free Knoevenagel condensations and Michael additions in the solid state and in the melt with quantitative yield. *Tetrahedron* 2003; 59: 3753–3760
- (28) Goel M., Jayakannan M.: Supramolecular Liquid Crystalline  $\pi$ -Conjugates: The Role of Aromatic  $\pi$ -Stacking and van der Waals Forces on the Molecular Self-Assembly of Oligophenylenevinylenes. *The Journal of Physical Chemistry B* (2010); 39: 114
- (29) Mravljak J., Pečar S.: Šumi življenja; 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 80-190
- (30) Molyneux P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* (2004); 26: 211-219
- (31) Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B.: Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of food science* (2003); 68: 487-490
- (32) Bundersek A.: Vpliv topil na UV/VIS spektre sintetiziranih iminokumarinov : diplomska naloga (Maribor, 2009) (<https://dk.um.si/lzpisGradiva.php?id=9606>, dostopano 6.8.2015)

- (33) <http://snypa.co.uk/concept/synth/knoevenagel.php>, dostopano 5.7.2015
- (34) Pałasz A., Pałasz T.: Knoevenagel condensation of cyclic ketones with benzoylacetonitrile and *N,N*-dimethylbarbituric acid. Application of sterically hindered condensation products in the synthesis of spiro and dispiropyrans by hetero-Diels-Alder reactions. *Tetrahedron* (2011); 67: 1422-1431
- (35) <http://www.aklectures.com/lecture/knoevenagel-condensation-examples>, dostopano 5.7.2015
- (36) <http://snypa.co.uk/concept/synth/knoevenagel.php>, dostopano 5.7.2015
- (37) <http://web.lemoyne.edu/~giunta/williamson.html>, dostopano 6.7.2015
- (38) <http://www.masterorganicchemistry.com/2014/10/24/the-williamson-ether-synthesis/>, dostopano 6.7.2015
- (39) <https://www.khanacademy.org/science/organic-chemistry/alcohols-ethers-epoxides-sulfides/synthesis-cleavage-ethers/v/williamson-ether-synthesis>, dostopano 6.7.2015
- (40)  
[https://www.academia.edu/9427761/Determination\\_of\\_Inhibition\\_Activity\\_of\\_the\\_Antioxidants\\_Ascorbic\\_Acid\\_and\\_%CE%B1-Tocopherol\\_Using\\_DPPH\\_Assay](https://www.academia.edu/9427761/Determination_of_Inhibition_Activity_of_the_Antioxidants_Ascorbic_Acid_and_%CE%B1-Tocopherol_Using_DPPH_Assay), dostopano 25.7.2015
- (41) Liu J., Hu L., Dong Z., Hu Q.: DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural *p*-Terphenyl Derivatives Obtained from Three Edible Mushrooms Indigenous to China. *Chemistry & Biodiversity* (2004); 1: 601-605