

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA SELJAK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA SELJAK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI
DERIVATOV 5-BENZILIDENBARBITURNE IN 5-
BENZILIDENTIOBARBITURNE KISLINE**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE
PROPERTIES OF 5-BENZYLIDENE BARBITURIC AND 5-
BENZYLIDENETHIOBARBITURIC ACID DERIVATIVES**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Nacetu Zidarju in doc. dr. Janezu Mravljaku za pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem za vso podporo v času študija.

Izjava

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

Lea Seljak

VSEBINA

POVZETEK	II
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1 UVOD	1
1.1 RADIKALI	1
1.2 REAKTIVNE ZVRSTI IN OKSIDATIVNI STRES	2
1.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti	2
1.2.2 Reaktivne dušikove in klorove zvrsti	3
1.2.3 Oksidativni stres	4
1.3 ANTIOKSIDANTI	4
1.3.1 Endogeni antioksidanti	5
1.3.2 Eksogeni antioksidanti	5
1.4 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA	6
1.4.1 DPPH-test	7
1.5 BARBITURATI IN TIOBARBITURATI	11
2 NAMEN IN NAČRT DELA	12
2.1 NAČRTOVANJE POTENCIALNIH ANTIOKSIDANTOV	12
2.2 TESTIRANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
4 EKSPERIMENTALNO DELO	16
4.1 SINTEZA	16
4.1.1 Sinteza 4-butoksibenzaldehida	16
4.1.2 Sinteza 5-benziliden(tio)barbituratov	17
4.2 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI	20
4.2.1 Priprava raztopin	20
4.2.2 Meritve kinetike redukcije DPPH	21
4.2.3 Metoda končne točke	21
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	23
5.1 RAZLAGA REAKCIJSKIH MEHANIZMOV	23
5.1.1 Williamsonova sinteza etrov	23
5.1.2 Knoevenaglova kondenzacija	23
5.2 OPTIMIZACIJA TESTNE METODE	25
5.2.1 Priprava raztopin	25
5.2.2 Meritve kinetike redukcije DPPH	26
5.2.3 Metoda končne točke	26
5.3 REZULTATI VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI	26
5.3.1 Kinetika redukcije DPPH	26
5.3.2 Meritve v končni točki	27
5.3.3 Vrednosti srednjih učinkovitih koncentracij (EC_{50})	31
5.4 KOMENTAR REZULTATOV VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI	32
5.4.1 Komentar vrednosti srednjih učinkovitih koncentracij	32
5.4.2 Komentar kinetike redukcije DPPH	34
6 SKLEP	37
7 LITERATURA	38

POVZETEK

Barbiturna in tiobarbiturna kislina sta pomembni izhodni spojini za sintezo biološko aktivnih molekul. Z uvajanjem benzilidenske skupine na mesto 5 na (tio)barbiturnem obroču dobimo t.i. 5-benziliden(tio)barbiturate, ki poleg drugih bioloških aktivnosti izkazujejo tudi antioksidativne lastnosti.

Porušeno razmerje med oksidativnimi in reduktivnimi procesi v organizmu privede do stanja, imenovanega oksidativni stres. Zaradi novih spoznanj o vpletenosti oksidativnega stresa v različne patološke procese se v zadnjih letih povečuje število raziskav s področja novih antioksidantov.

V sklopu diplomske naloge smo na podlagi v literaturi objavljenih rezultatov po postopku Knoevenaglove kondenzacije sintetizirali serijo šestih derivatov 5-benziliden(tio)barbiturne kisline, jih kemijsko ovrednotili ter izmerili njihovo antioksidativno delovanje. Načrtovane spojine so se razlikovale po substituentih na benzilidenskem fragmentu in po tem, ali so imele vgrajen barbiturni ali tiobarbiturni obroč. S pripravo spojin, ki so imele na fenilnem obroču vezane proste hidroksilne skupine, smo dobili derivate s strukturo, značilno za fenolne antioksidante. Pripravljene spojine so se med seboj razlikovale po številu in položaju hidroksilnih skupin, preverili pa smo tudi, kako na antioksidativno delovanje vpliva, če je ena izmed hidroksilnih skupin na fenilnem obroču zaetrena z metilno ali butilno skupino.

Antioksidativne lastnosti sintetiziranih spojin smo izmerili s pomočjo *in vitro* kolorimetričnega testa, ki temelji na spremljanju redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH-test). Osnovno metodo smo uspešno optimizirali in na podlagi pridobljenih rezultatov kritično komentirali ustreznost različnih parametrov za vrednotenje antioksidativnega delovanja spojin. Pet izmed šestih sintetiziranih spojin je izkazalo odlično antioksidativno delovanje. Jakost antioksidativnega delovanja sintetiziranih spojin se je večala sorazmerno s številom hidroksilnih skupin na fenilnem obroču. Prav tako je bila jakost antioksidativnega delovanja večja pri derivatih tiobarbiturne kisline kot pri derivatih barbiturne kisline.

Sintetizirani 5-benziliden(tio)barbiturati, ki na podlagi rezultatov meritev z DPPH-testom izkazujejo visoko antioksidativno kapaciteto, predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnja testiranja *in vivo*.

Ključne besede: 5-benzilidenbarbiturati, 5-benzilidentioarbiturati, antioksidanti, DPPH

ABSTRACT

Barbituric and thiobarbituric acid are important starting materials for the preparation of many biologically active compounds. With the introduction of benzylidene group to the position 5 of the (thio)barbituric acid ring, 5-benzylidene(thio)barbiturates can be prepared which, along with several other biological activities, possess antioxidative properties.

An altered balance between prooxidative and antioxidative processes leads to a condition called oxidative stress. Recent discoveries describing the involvement of oxidative stress in many pathological processes have resulted in an increased level of scientific research in the field of new antioxidants.

In the present work, based on the literature data, a series of six 5-benzylidene(thio)barbiturates was prepared using Knoevenagel condensation. The compounds were chemically analysed and their antioxidative properties were evaluated. The designed derivatives possessed different substituents on the benzylidene moiety and had incorporated barbituric or thiobarbituric ring. Compounds with free hydroxyl groups on the benzene ring had substructures that are similar to natural phenolic antioxidants. In the designed derivatives, the number of hydroxyl groups and their substitution pattern on the benzene ring was varied. Additionally, antioxidative properties of derivatives in which one of the hydroxyl groups was transformed to methyl or butyl ether were evaluated.

Antioxidative properties of the synthesized compounds were evaluated using an *in vitro* colorimetric assay that monitors the reduction of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH test). The literature-reported assay conditions were successfully optimized, and the obtained results were used to critically evaluate the parameters used to describe antioxidative properties. Five out of six synthesized compounds displayed a very potent antioxidative activity. Antioxidative strength of the prepared derivatives increased with the number of hydroxyl groups on the benzene ring, and was higher in derivatives of thiobarbituric acid, with respect to derivatives possessing the barbituric ring.

Because of the potent antioxidative properties measured by the *in vitro* DPPH assay, the prepared 5-benzylidene(thio)barbiturates represent good basis for further *in vivo* evaluation.

Key words: 5-benzylidenebarbiturate, 5-benzylidenethiobarbiturate, antioxidant, DPPH

SEZNAM OKRAJŠAV

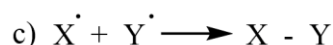
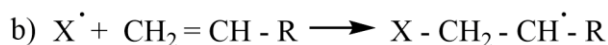
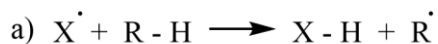
ATP	adenozintrifosfat
d	dublet
dd	dublet dubleta
DMSO- <i>d</i> ₆	devterirani dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DPPH-H	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
EC ₂₀	20-odstotna učinkovita koncentracija
EC ₅₀	50-odstotna učinkovita koncentracija
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HO [•]	hidroksilni radikal
HOO [•]	hidroperoksilni radikal
IR (ATR)	infrardeča spektroskopija, tehnika oslabiljene popolne odbojnosti
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
m	multiplet
NMR	jedrska magnetna resonanca
NO [•]	dušikov oksid
¹ O ₂	singletni kisik
³ O ₂	tripletni kisik
O ₂ ^{-•}	superoksidni radikal
ONOO ⁻	peroksinitrit
R _f	retencijski faktor
ROO [•]	peroksilni radikal
s	singlet
SD	standardna deviacija
SOD	superoksid dismutaza
T	temperatura
t	triplet
TLC	tankoplastna kromatografija
δ	kemijski premik

1 UVOD

1.1 RADIKALI

Radikal je po definiciji vsaka snov, ki ima v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron. V naravi radikali primarno nastanejo s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi, za kar je potrebna dovolj velika energija. Takšno cepitev lahko povzročijo UV-žarki z valovno dolžino, krajšo od 400 nm, visoka temperatura, enoelektronska redoks reakcija ali X-žarki. Produkt homolitske cepitve je par radikalov, pri čemer se skupni elektronski par kovalentne vezi razdeli med oba produkta. Lastnost radikalov je visoka reaktivnost, saj nesparjen elektron teži k zapolnitvi orbitale s pridobitvijo elektrona z nasprotno usmerjenim spinom. Življenjska doba radikalov v naravi je od nekaj milisekund do nekaj sekund, zaradi hitre reakcijske konstante pa so sposobni naključno reagirati s številnimi spojinami v svoji bližini. Poznamo tri različne tipe radikalskih reakcij: (i) radikal lahko odtegne H iz molekule, (ii) radikal se lahko veže na dvojno vez in (iii) radikal lahko reagira z drugim radikalom (Slika 1).

Ker v reakcijah a) in b) nastanejo novi radikali, je že en radikal dovolj za sprožitev verižne reakcije. Ta se navadno zaključi z nastankom neradikalskih produktov v reakciji c).



Slika 1: Trije tipi radikalskih reakcij: a) prevzem vodikovega atoma, b) adicija radikala na dvojno vez, c) reakcija dveh radikalov (prirejeno po (1))

V našem organizmu so radikali vključeni v številne biološke procese. Zaradi pogostih enoelektronskih prenosov so radikali intermediati pri številnih presnovnih procesih, sodelujejo pri prenosu signalov, so aktivatorji nekaterih encimov, levkociti pa se z radikalskimi reakcijami borijo proti patogenim mikroorganizmom. Radikalski procesi so nujni za normalno delovanje organizma, hkrati pa so radikali tudi vzrok staranja in številnih bolezni (1). Presežek radikalov nastaja predvsem pri povečani stopnji celične presnove, ob izpostavitvi sevanju, pri uživanju zdravil in alkohola, pri kajenju, pri pretiranih psihičnih in fizičnih obremenitvah ter pri bolezenskih stanjih, kjer je prisoten vnetni proces. Biološko pomembni so predvsem kisikovi, ogljikovi, dušikovi in klorovi radikali (2).

1.2 REAKTIVNE ZVRSTI IN OKSIDATIVNI STRES

1.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti

Reaktivne kisikove zvrsti so vse spojine, tako radikali kot neradikali, ki vsebujejo reaktivne kisikove atome, in se pojavljajo v različnih procesih v našem organizmu. Reaktivnim kisikovim zvrstem je skupno, da so zelo reaktivne in lahko v svoji okolici oksidirajo številne organske molekule (3).

Kisik je plin, ki je začel v zemeljski atmosferi nastajati pred 500 milijoni let kot posledica fotosinteze in je nujno potreben za sintezo adenozintrifosfata (ATP) v biokemijskem procesu oksidacije glukoze. Najpogostejša oblika kisika v naravi je tripletni kisik ($^3\text{O}_2$), ki je energetsko ugodnejša oblika od singletnega kisika ($^1\text{O}_2$). Tripletni kisik je biradikal, saj vsebuje v dveh π -orbitalah dva nesparjena elektrona z enako usmerjenima spinoma. Pri običajnih pogojih je $^3\text{O}_2$ nereaktiven plin, zato lahko normalno živimo, kljub temu da ga je v zraku 21 %. Če tripletni kisik pride v stik z ogljikovim radikalom, lahko v hitri reakciji nastane zelo reaktiven peroksilni radikal (ROO^\bullet). Na ta način lahko tripletni kisik oksidira lipide, proteine ali pa dedni material. Najbolj je oksidaciji podvržena celična membrana (lipidna peroksidacija), saj je v njej koncentracija $^3\text{O}_2$ višja kot v hidrofilnih delih celice (3). Singletni kisik v naravi pod običajnimi pogoji ni prisoten, lahko pa nastane iz $^3\text{O}_2$ s fotokemično reakcijo, v kateri se en nesparjen elektron pomakne v orbitalo z višjo energijo, ob tem pa se tvori elektronski par z nasprotno usmerjenima spinoma. Singletni kisik ni radikal, a je kljub temu v primerjavi s tripletnim kisikom manj stabilen in zelo reaktiven. $^1\text{O}_2$ je zelo močan oksidant, zato lahko oksidira vsako organsko snov, s katero pride v stik. V telesu se večinoma pojavi v primeru fotodermatoz in je omejen na lokalne predele kože, ki so obsevani z UV-svetlobo (2, 3).

REDUKCIJA KISIKA V PRESNOVNIH PROCESIH

Molekula kisika pri presnovnih procesih deluje kot akceptor elektronov in se v telesu reducira do vode. V prvi stopnji molekula $^3\text{O}_2$ v celičnem mitohondriju sprejme elektron iz verige citokromov, pri tem pa nastane superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$). $\text{O}_2^{\bullet-}$ je dokaj nereaktiven, a se lahko protonira do hidroperoksilnega radikala (HOO^\bullet). Ta je v primerjavi s superoksidnim radikalom bolj reaktiven, saj lahko v nadaljnji reakciji odtegne H-atom iz naključne spojine. Organizem se poskuša pred škodljivimi učinki HOO^\bullet zavarovati z odstranjevanjem superoksida v reakciji, ki jo katalizira metaloencim superoksid dismutaza (SOD). S pomočjo SOD se superoksidni radikal pretvori do vodikovega peroksida (H_2O_2),

ki lahko prosto difundira po celici. H_2O_2 je relativno neškodljiv, a lahko ob stiku z železovim(II) ali bakrovim(I) ionom vstopi v Fentonovo reakcijo. Pri tem se tvori zelo reaktiven hidroksilni radikal (HO^\bullet), ki lahko sproži lipidno peroksidacijo in druge poškodbe celice. Ioni prehodnih kovin, kot so železovi in bakrovi ioni, lahko z lahkoto prehajajo iz reducirane oblike (Fe^{2+} , Cu^+) v oksidirano obliko (Fe^{3+} , Cu^{2+}) in obratno, zato so dober posrednik elektronov. Za obrambo pred Fentonovo reakcijo je v telesu prisoten tudi mehanizem, ki pretvarja H_2O_2 v vodo in kisik. To reakcijo katalizirajo hemoproteini katalaze (3).

RADIKALI V KOŽI

Vir povečanega števila radikalov v koži je vnetna reakcija, ki se sproži ob obsevanju fotosenzibilizatorja z UV-svetlobo. Fotosenzibilizator je snov, ki je lahko endogenega ali eksogenega izvora in se v običajnih pogojih nahaja v singletnem stanju. Če fotosenzibilizator absorbira fotone prave valovne dolžine, se absorbirana energija porabi za obrat enega spina elektrona in tako fotosenzibilizator preide v tripletno stanje (3). Temu sledita dva možna tipa nadaljnjih reakcij. Tip I: Vzburjen fotosenzibilizator neposredno reagira s substratom preko prenosa elektronov ali vodika, kar poveča možnost za tvorbo radikalov. Ob prisotnosti kisika se reakcija nadaljuje do tvorbe superoksidnega aniona. Tip II: Fotosenzibilizator v tripletnem stanju reagira s tripletnim kisikom in nanj prenese energijo. Pri tem se tvori singletni kisik, fotosenzibilizator pa preide nazaj v singletno stanje (3, 4, 5).

1.2.2 Reaktivne dušikove in klorove zvrsti

Izmed vseh reaktivnih dušikovih zvrsti, ki se pojavljajo v organizmu, je najpomembnejši dušikov oksid (NO^\bullet). Slednji lahko za razliko od O_2^\bullet , ki v telesu nastaja po več poteh, nastane le v encimsko katalizirani oksidaciji L-arginina do L-citrulina. V telesu ima dušikov oksid pomembno fiziološko vlogo, saj je aktivator adenilat ciklaze ter je pomemben za delovanje prebavnega, srčnožilnega in imunskega sistema. Če NO^\bullet v telesu reagira s HOO^\bullet , nastane kot produkt neradikalski peroksinitrit (ONOO^-), ki je znan kot najmočnejši oksidant. Njegova prisotnost v organizmu znatno prizadene številne celične funkcije.

Reaktivne klorove zvrsti so vpletene predvsem v obrambne mehanizme za zaščito pred patogenimi mikrobi. Močan oksidant hipoklorit nastaja v levkocitih iz vodikovega

peroksida in kloridnega aniona s pomočjo encima mieloperoksidaze. Levkociti ob napadu na mikroorganizme izrabljajo baktericiden učinek hipoklorita (3).

1.2.3 Oksidativni stres

Porušeno celično razmerje med nastajanjem radikalov in njihovim odstranjevanjem (razmerje med reduktivnimi in oksidativnimi procesi) lahko privede do radikalsko sprožene oksidacije, imenovane oksidativni stres. Celoten proces je sestavljen iz številnih reakcij, med katerimi je najbolj znana lipidna peroksidacija membrane. Posledica te je lahko celična smrt, kar pa je za organizem ugodnejši razplet kot poškodba genskega materiala. Če se v reakciji poškoduje tudi genski material (oksidacija DNA, pretrganje verige DNA, zamenjava baze) in celica s svojimi obrambnimi mehanizmi ni sposobna popraviti poškodb, lahko iz mutiranih genov nastanejo proteini s spremenjeno funkcijo. Posledica takih reakcij je lahko le oslabljena celična funkcija, če pa se genski material spremeni v dovoljšnji meri, se normalna celica lahko spremeni v rakavo (2, 3).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Tekom evolucije so organizmi za zaščito pred oksidativnim stresom razvili tako imenovani antioksidativni obrambni sistem. Antioksidanti so široka skupina spojin, ki zavrejo oksidativne procese in so v primerjavi z možnimi substrati za oksidacijo v organizmu prisotni v nizkih koncentracijah (6). Delimo jih glede na izvor (endogeni, eksogeni), kemijsko strukturo (encimski, neencimski) in topnost (lipofilni, hidrofilni). Od tega, ali so antioksidanti lipofilni ali hidrofilni, je odvisno, kje bodo delovali. Lipofilni antioksidanti delujejo predvsem v celičnih membranah in so prva obramba pred lipidno peroksidacijo, hidrofilni antioksidanti pa reagirajo z oksidanti v citosolu in krvni plazmi (2).

Koncentracija antioksidantov je v telesu za tri velikostne razrede višja od koncentracije radikalov. V organizmu morajo biti antioksidanti stalno prisotni v vseh celicah in tkivih, saj je le tako zaščita pred oksidativnimi procesi optimalna. Antioksidanti lahko verižno oksidacijo preprečijo na več načinov: (i) radikal donirajo H-atom in se pri tem sami pretvorijo v radikal, ki pa je stabilnejši in ne more več reagirati dalje, (ii) na dvojne vezi v njihovi strukturi vežejo singletni kisik ali pa se na njih adirajo radikali, (iii) kompleksirajo ione prehodnih kovin in s tem preprečijo prenos elektronov in (iv) katalitično odstranjujejo radikale ter reaktivne zvrsti (SOD, katalaza, peroksidaza) (2, 3). Pri zaščiti kože, kjer naj bi bilo kar 80 % eksogenega oksidativnega stresa povzročenegega z UV-sevanjem, imajo pomembno vlogo tudi varovalni izdelki za sončenje. Njihove aktivne sestavine so filtri, ki

delujejo kot blokatorji ali absorberji UV-svetlobe in s tem preprečujejo nastanek radikalov (7).

1.3.1 Endogeni antioksidanti

Po hierarhični lestvici so endogeni antioksidanti v človeškem organizmu najpomembnejša vrsta antioksidantov, saj se lahko celica z njihovo pomočjo v skladu z lastnimi potrebami sama brani pred oksidativnim stresom (8). Med **encimske antioksidante** uvrščamo superoksid dismutazo in katalaze. Nekateri redoksní sistemi, kot je npr. glutationski redoksní sistem, vključujejo medsebojno delovanje encimskih in neencimskih antioksidantov, ki so povezani v krožni proces. Encim glutation peroksidaza reducira manjše količine vodikovega peroksida do vode, pri čemer se substrat glutation oksidira do glutation disulfida. Tudi sam glutation je močan antioksidant in lahko deluje neposredno kot lovilec radikalov. Encim glutation reduktaza nato ponovno iz glutation disulfida obnovi reducirano obliko glutationa. Predstavniki skupine **neencimskih antioksidantov** delujejo po različnih mehanizmih. Proteini transferin, laktoferin in feritin vežejo ione prehodnih kovin ter s tem preprečijo nastanek hidroksilnega radikala. Ostali pomembni neencimski endogeni antioksidanti, kot so sečna kislina, ubikvinon Q10, bilirubin in melanin, delujejo kot donorji vodika (2).

1.3.2 Eksogeni antioksidanti

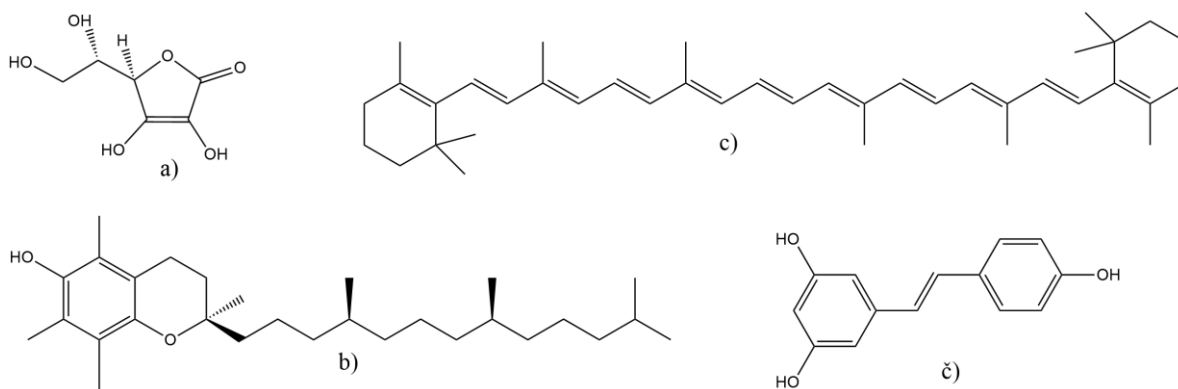
Poleg endogenih antioksidantov so za delovanje organizma nujno potrebni tudi antioksidanti, ki jih v telo vnesemo sistemsko ali lokalno. Med njimi so pomembni predvsem vitamini z antioksidativnim delovanjem. Prav tako kot ima na telo negativen vpliv primanjkljaj antioksidantov, ima lahko zaradi prooksidativnega učinka tak vpliv tudi njihov presežek. Temu se izognemo z uživanjem mešanice antioksidantov, saj mnogi izmed njih delujejo sinergistično in se v organizmu obnavljajo (3). Na področju kože so pozitivni učinki antioksidantov bolj izraženi pri dermalni uporabi kot pri sistemskem vnosu (9). V fizioloških procesih imajo med antioksidanti najpomembnejšo vlogo askorbinska kislina, α -tokoferol, karotenoidi in fenolni antioksidanti. (Slika 2)

Askorbinska kislina ali vitamin C je najpomembnejši vodotopen antioksidant v zunajcelični tekočini. Sposoben je neposredno reagirati s superoksidom, hidroksilnim radikalom in drugimi peroksidi, pri čemer se oksidira do askorbilnega radikala. Po končani reakciji se lahko askorbil radikal ponovno regenerira do askorbinske kisline s pomočjo encimov ali pa glutaciona in lipojske kisline.

Alfa-tokoferol je ena izmed osmih izomernih oblik vitamina E, ki jih najdemo v naravi. Je najpomembnejši lipofilni vitamin, ki se nahaja v celičnih membranah, kjer deluje kot zaščita pred oksidacijo nenasičene maščobne kisline. V reakciji z radikalom se oksidira do tokoferilnega radikala, ki se lahko ponovno regenerira do α -tokoferola s pomočjo vitamina C in glutationa (2).

Karotenoidi so skupina lipofilnih antioksidantov, za katere je značilna dolga alifatska veriga s konjugiranimi dvojnimi vezmi, ki delujejo kot lovilci singletnega kisika. Glavni izmed predstavnikov je β -karoten, ki je prekurzor vitamina A (9).

Fenolni antioksidanti so široka skupina antioksidantov rastlinskega izvora. Vsem je skupna kemijska struktura z enim ali več šestčlenskimi aromatskimi obroči, hidroksilnimi skupinami in konjugiranimi dvojnimi vezmi. So močni antioksidanti, ki delujejo kot donorji vodika ali kelatorji kovinskih ionov. Za razliko od vitaminov, za človeški organizem niso esencialni (10).



Slika 2: Strukture najpomembnejših eksogenih antioksidantov: a) askorbinska kislina, b) α -tokoferol, c) β -karoten, č) resveratrol, predstavnik fenolnih antioksidantov

1.4 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Za vrednotenje antioksidativnih učinkov spojin so na voljo številne *in vitro* ter *in vivo* metode, katerih principi merjenja antioksidativnega delovanja zajemajo različne možne tipe reakcij antioksidantov z reaktivnimi zvrstmi. Najpogosteje se v laboratorijih izvajajo *in vitro* testi, ki skušajo posnemati kemijske reakcije antioksidantov v živih organizmih. Primeri metod, s katerimi vrednotimo *in vitro* antioksidativno delovanje, so:

- Reakcije s stabilnimi radikali: merjenje sposobnosti antioksidanta za odstranjevanje radikalov
- Redukcija kovinskih ionov: merjenje redukcijskih sposobnosti antioksidanta

- Metode na osnovi lipidne peroksidacije: merjenje sposobnosti antioksidanta, da zavre lipidno peroksidacijo
- Kompetitivne metode: spremljanje tekmovanja med antioksidantom in substratom za reakcije z reaktivnimi zvrstmi
- Keliranje kovinskih ionov: spremljanje sposobnosti antioksidanta, da tvori komplekse s kovinskimi ioni (6, 11).

Slabost *in vitro* testov je, da testirane spojine zaradi različnih možnih mehanizmov antioksidativnega delovanja pogosto ne izkazujejo učinkovitosti po vseh testnih metodah, zato lahko dejansko aktivnost spojine podcenimo. Naslednja stopnja vrednotenja antioksidativnih lastnosti potencialnih antioksidantov je testiranje njihove učinkovitosti na celičnih kulturah, kjer je pomemben še parameter biološke razpoložljivosti. Pomembno je tudi, da spojina v koncentraciji, pri kateri izkazuje antioksidativno delovanje, ni citotoksična. Rezultatov, pridobljenih z *in vitro* metodami, ne moremo neposredno prenesti na žive organizme, saj imajo na *in vivo* antioksidativno delovanje spojin vpliv tudi absorpcija, porazdelitev, presnova in izločanje učinkovine. Prav tako lahko antioksidanti v živih organizmih med seboj delujejo sinergistično (6, 12). Metode za *in vivo* vrednotenje antioksidantov temeljijo na meritvah biomarkerjev oksidativnega stresa v tkivih in telesnih tekočinah ter najpogosteje zajemajo dva pristopa:

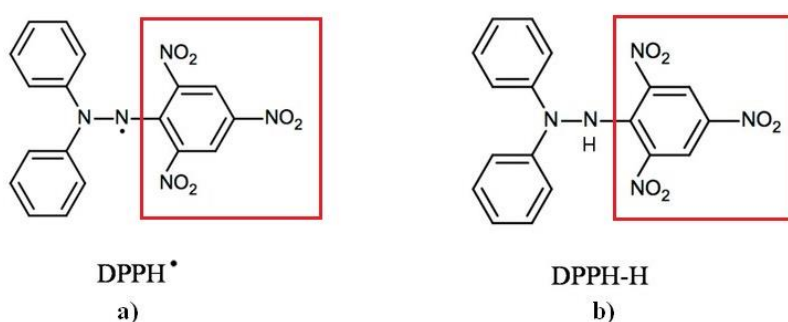
- merjenje biomarkerjev oksidativnih poškodb: produktov lipidne oksidacije, oksidativnih sprememb proteinov, sladkorjev ter nukleotidnih baz
- merjenje razmerja med reducirano in oksidirano obliko endogenih antioksidantov

In vivo učinkovitost antioksidantov je težko merljiva, saj mora biti testni organizem v stanju oksidativnega stresa, da se koncentracija biomarkerjev ob zaužitju spojine spremeni. Zaradi kompleksnosti reakcij v človeških in živalskih organizmih ne poznamo modela, ki bi zagotavljal optimalno oceno oksidativne kapacitete spojine, zato se priporoča uporabo več metod. *In vitro* testi tako predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnja vrednotenja (6).

1.4.1 DPPH-test

Test, ki temelji na spremljanju redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH), je dobro uveljavljen kolorimetričen test za *in vitro* vrednotenje antioksidativnih lastnosti spojin. Temelji na redukciji radikala DPPH do stabilnejše neradikalske oblike 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH-H), ki poteče ob prisotnosti antioksidanta. Potek reakcije spremljamo spektrofotometrično.

DPPH je v raztopini stabilen radikal z nesparjenim valenčnim elektronom na enem izmed dušikovih atomov (13). Nesparjen elektron je delokaliziran vzdolž N–N–C mostu in po aromatskem obroču, zaradi česar molekula DPPH ne more dimerizirati kot večina ostalih radikalov, kar je razlog za njeno relativno veliko stabilnost (14). Zaradi možnosti delokalizacije elektronov po celotni molekuli raztopina DPPH absorbira vidno svetlobo in je značilne vijoličaste barve, ki tekom redukcije izgine. Absorbanca produkta pri valovni dolžini 515-520 nm močno pade, raztopina pa se obarva rumeno. Rumena obarvanost produkta je posledica pikrilne skupine, ki je še vedno prisotna v reducirani molekuli DPPH-H (Slika 3) (15).



Slika 3: Strukturi a) radikala DPPH in b) reducirane molekule DPPH-H. Znotraj rdečega okvirja se nahaja pikrilna skupina (prirejeno po (15)).

Boljše antioksidativne lastnosti kot izkazuje testirana spojina, večji delež molekul DPPH se reducira in manj intenzivna je obarvanost testne raztopine po poteku reakcije (16). Hkrati s spremembo barve iz vijoličaste v rumeno se raztopini spremeni tudi jakost absorbance pri valovni dolžini 515-520 nm, kar izkoriščamo za spektrofotometrično vrednotenje antioksidativnega delovanja spojin.

Prvi je test, ki temelji na spremljanju redukcije DPPH, leta 1958 opisal Mardsen Blois. Na vzorčnem primeru reakcije s cisteinom je pokazal, da je radikal DPPH sposoben sprejeti H-atom, ki mu ga donira antioksidant cistein (15, 17). Njegovi nasledniki so teorijo dopolnili in dokazali, da lahko antioksidant z DPPH reagira na dva načina: (i) s prenosom elektrona in (ii) s prenosom vodikovega atoma. Reakciji v testni raztopini potekata vzporedno, končna produkta pa sta v obeh primerih enaka. Kateri reakcijski mehanizem prevlada, je odvisno od narave spojin (18). Spojine, ki reducirajo DPPH v manj kot 30 s, delujejo preko prenosa elektronov, pri spojinah s počasnejšo reakcijsko kinetiko pa prevladuje mehanizem prenosa vodika, ki je prikazan na Sliki 4 (19).

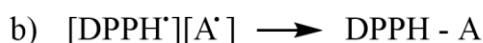


Slika 4: Prikaz reakcije prenosa vodika iz antioksidanta na DPPH

Produkta reakcije prenosa vodika iz antioksidanta na DPPH sta reducirana molekula DPPH-H in stabilnejši radikal A^\bullet . Stehiometrija kemijske reakcije je v tem primeru 1:1, saj ena molekula antioksidanta reducira eno molekulo DPPH. Če bi imel antioksidant možnost oddajanja dveh vodikov, bi bilo lahko stehiometrično razmerje reaktantov 2:1 (ena molekula antioksidanta in dve molekuli DPPH) (15).

Ugotovili so, da se stehiometrično razmerje v praksi ne ujema vedno s številom H-atomov, ki jih lahko antioksidant teoretično odda. Razmerje je lahko večje ali manjše, le redko pa je celo število, zato je stehiometrija reakcije pri mnogih spojinah le teoretičen parameter (17). Eden izmed vzrokov za spremenljivost stehiometrije je reverzibilnost primarne reakcije. Na stehiometrijo lahko vplivajo tudi sekundarne reakcije, ki sledijo primarni. Pojav sekundarnih reakcij je odvisen od kemijskih lastnosti spojin in njihove konfiguracije. Predvidevajo, da je posledica kompleksnejših sekundarnih reakcij, poleg spremenjene stehiometrije, tudi počasnejša reakcijska kinetika (20).

Če je v primarni reakciji nastali radikal A^\bullet manj stabilen, lažje reagira dalje. Na Sliki 5 sta prikazani možni sekundarni reakciji: dimerizacija radikala A^\bullet in kompleksacija radikala A^\bullet z DPPH^\bullet (17, 21).



Slika 5: Sekundarni reakciji radikala A^\bullet : a) dimerizacija, b) kompleksacija

Naslednji mejnik v razvoju DPPH-testa je leta 1995 postavil Brand-Williams, ki je z namenom standardizacije metode uvedel nov parameter, imenovan 50-odstotna efektivna koncentracija (EC_{50}). EC_{50} predstavlja koncentracijo spojine, ki reducira 50 odstotkov molekul DPPH v reakcijski raztopini (50-odstotni padec začetne absorbanse). Potreba po uvedbi tega parametra se je pokazala ob ugotovitvi, da nekatere spojine tudi v visokih koncentracijah ne reducirajo več kot 75 % prisotnega DPPH v testni raztopini (17, 21).

Vrednost EC_{50} omogoča medsebojno primerjavo učinkovitosti antioksidantov ne glede na njihov mehanizem redukcije radikala. Nižja kot je vrednost EC_{50} , boljše antioksidativne lastnosti ima spojina (15).

PRIPOROČILA ZA IZVEDBO DPPH-TESTA

Po številnih modifikacijah prvotne metode se danes za oceno jakosti antioksidativnega delovanja pogosto uporabljata dve vrsti parametrov, ki spojine okarakterizirata ločeno: vrednost EC_{50} in parametri reakcijske kinetike. Vrednost EC_{50} podaja antioksidativno kapaciteto spojin, z meritvami reakcijske kinetike pa lahko izmerimo hitrost reakcije med antioksidantom in DPPH ter tako predvidimo mehanizem antioksidativnega delovanja.

Kot topilo za pripravo raztopin se pri DPPH-testu najpogosteje uporabljajo metanol, etanol, aceton, benzen in dimetilsulfoksid (17). Pri izbiri topila je pomembno, da so vse testirane spojine v njem dobro topne.

Test temelji na spremljanju padca absorbance raztopine DPPH po dodatku različnih koncentracij antioksidanta. Končne absorbance primerjamo z absorbanco čiste raztopine DPPH in na podlagi teh rezultatov v nadaljevanju določimo številčne parametre za vrednotenje antioksidativnih lastnosti spojin. Vse meritve absorbanc izvajamo pri koncentracijah reagentov, ki zagotavljajo točnost spektroskopskih meritev. Začetna absorbanca raztopine DPPH ne sme preseči vrednosti 1, zato je priporočena koncentracija DPPH med 50 in 100 μM . Valovna dolžina, pri kateri izvajamo meritve, mora biti v območju absorpcijskega maksimuma DPPH, t.j. med 515 in 520 nm (15, 16).

Za meritve absorbanc reduciranega DPPH se uporabljata dva pristopa: (i) meritev absorbanc v izbrani časovni točki in (ii) meritev absorbanc v končni točki po vzpostavitvi dinamičnega ravnotežja. Pri metodi izbrane časovne točke se absorbanco najpogosteje meri po 30 min, saj večina spojin v tem času že popolnoma reducira DPPH. Nekateri antioksidanti, zlasti fenolni, za potek reakcije potrebujejo dalj časa. Antioksidante lahko glede na čas, ki ga potrebujejo za redukcijo DPPH, razdelimo v tri skupine: (i) antioksidanti s hitro reakcijsko kinetiko (< 30 min), (ii) antioksidanti s srednje hitro kinetiko (30-60 min) in (iii) antioksidanti s počasno kinetiko (> 60 min).

Z medsebojno primerjavo rezultatov meritev absorbanc v izbrani oz. v končni točki so ugotovili, da se vrednosti EC_{50} pri spojinah s hitro kinetiko ne razlikujejo bistveno, pri spojinah s počasno kinetiko pa so vrednosti EC_{50} , izmerjene v izbrani časovni točki, izrazito višje. Vzrok za to je meritev absorbance v času, ko reakcija redukcije še ni končana, zato tak rezultat podcenjuje dejansko moč antioksidanta (17). Na podlagi te ugotovitve je za natančnejšo določitev vrednosti EC_{50} priporočeno izvajanje vseh meritev v končni točki.

1.5 BARBITURATI IN TIOBARBITURATI

Barbiturati in tiobarbiturati so derivati barbiturne (pirimidin-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trion) oz. tiobarbiturne kisline (2-tioksodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-dion). Barbiturna in tiobarbiturna kislina sta pomembni izhodni spojini za sintezo številnih biološko aktivnih molekul. Sintezno ju lahko pripravimo z reakcijo med malonsko kislino in sečnino oz. tiosečnino ter sta v nesubstituirani obliki farmakološko neaktivni. Z uvedbo dveh substituentov na mesto 5 v (tio)barbiturnem obroču dobimo potencialne hipnotike, antiepileptike in anestetike, ki predstavljajo trenutno uveljavljene skupine (tio)barbituratov v terapevtski rabi. Vsem (tio)barbituratom je skupno, da so šibko kisli, zato jih lahko v reakciji z natrijevim hidroksidom pretvorimo v vodotopne soli (22).

Prvi barbiturati so bili kot potencialni zaviralci centralnega živčnega sistema sintetizirani v začetku 20. stoletja in so bili v uporabi vse do pojava benzodiazepinov v poznih 1960-ih letih (23). Slabost barbituratov je, da lahko njihovo dolgotrajno uživanje vodi v zasvojenost in toleranco, ob previsokem odmerku zdravila pa je zaradi ozkega terapevtskega okna velika nevarnost zastrupitve. Danes sta zato v rutinski rabi le še tiobarbiturata tiopental in tiamilal, ki se uporabljata kot sredstvi za uvod v splošno anestezijo, saj je njuno delovanje hitro in kratkotrajno (22).

V zadnjih desetletjih so raziskave na področju biološko aktivnih (tio)barbituratov usmerjene predvsem v pripravo novih derivatov ter odkrivanje novih tarčnih mest njihovega delovanja. V literaturi lahko med drugim zasledimo podatke o njihovi sposobnosti inhibicije metaloproteinaz in o njihovem protibakterijskem, protiglivičnem ter protitumornem učinku (24, 25).

Če mesto 5 na (tio)barbiturnem obroču substituiraemo z benzilidensko skupino, dobimo t.i. 5-benziliden(tio)barbiturate (26). Ti derivati so v zadnjih letih pritegnili pozornost raziskovalcev, saj izkazujejo različne biološke učinke, kot so protibakterijsko in antioksidativno delovanje ter sposobnost inhibicije encimov tirozinaze in ureaze (27, 28, 29). Prav zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti in sposobnosti inhibicije tirozinaze bi bili lahko 5-benziliden(tio)barbiturati potencialno uporabni tudi kot učinkovine v kozmetičnih izdelkih.

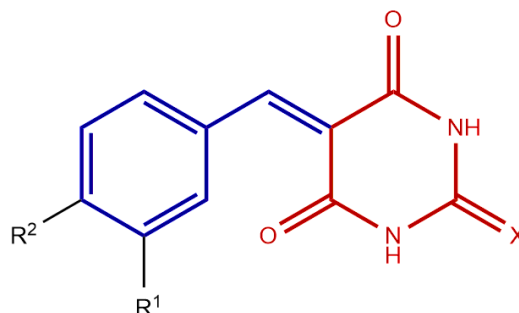
2 NAMEN IN NAČRT DELA

V zadnjih letih se zaradi novih spoznanj o vpletenosti oksidativnega stresa v različne patološke procese veča tudi zanimanje za raziskave na področju novih antioksidantov. V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali serijo derivatov 5-benzilidenbarbiturne in 5-benzilidentiobarbiturne kisline, jih kemijsko ovrednotili ter izmerili njihovo antioksidativno delovanje. Antioksidativne lastnosti 5-benziliden(tio)barbituratov so bile v literaturi že opisane, objavljeni rezultati pa nam bodo služili kot izhodišče za načrtovanje serije podobnih spojin (29).

2.1 NAČRTOVANJE POTENCIALNIH ANTIOKSIDANTOV

S pripravo serije derivatov 5-benzilidenbarbiturne in 5-benzilidentiobarbiturne kisline želimo ugotoviti, kako spremembe na osnovnem skeletu vplivajo na antioksidativno delovanje spojin. Sintetizirali bomo šest končnih spojin. V prvem delu se bomo osredotočili na benzilidenski fragment, ki je na Sliki 6 obarvan z modro barvo. S pripravo derivatov, ki bodo na fenilnem obroču vsebovali H-donorske OH skupine, bomo posnemali strukturo, značilno za fenolne antioksidante. Predvidevamo, da bodo na jakost antioksidativnega delovanja naših derivatov najbolj vplivale prav spremembe na tem delu molekule. Najprej bomo pripravili spojino, ki bo imela na mestih 3 in 4 na fenilnem obroču vezani dve OH skupini (Slika 6, spojina **9**). Temu derivatu so v sklopu antioksidativnega testiranja serije podobnih spojin že dokazali antioksidativno delovanje (29). Če je jakost antioksidativnega delovanja odvisna predvsem od števila H-atomov, ki jih lahko spojina odda, predvidevamo, da bo spojina **9** učinkovala kot najboljši antioksidant v seriji. V nadaljevanju bomo sintetizirali dva izomera, ki bosta na mestih 3 in 4 na fenilnem obroču vsebovala eno prosto OH skupino in eno OH skupino, zaetreno z metilno skupino (Slika 6, spojini **10** in **11**). Primerjava delovanja spojin **10** in **11** bo pokazala, ali je jakost antioksidativnega delovanja spojin odvisna od položaja OH skupin na fenilnem obroču ali le od njihovega števila. Pripravili bomo tudi derivat, ki ne bo na fenilnem obroču vseboval nobene proste OH skupine, temveč bo imel na mestu 4 vezano butiloksi skupino (Slika 6, spojina **12**). Za morebitno antioksidativno delovanje spojine **12** bo tako najverjetneje odgovoren del molekule, ki pripada barbiturni kislini in je na Sliki 6 označen z rdečo barvo. V zadnjem delu bomo dvema derivatoma 5-benzilidenbarbiturne kisline barbiturni obroč zamenjali s tiobarbiturnim (Slika 6, spojini **13** in **14**). Na ta način bomo preverili, če

ima zamenjava kisikovega atoma v barbiturni kislini z žveplom vpliv na antioksidativno delovanje.



- 9:** $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OH}, X = \text{O}$
10: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}, X = \text{O}$
11: $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OMe}, X = \text{O}$
12: $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OBu}, X = \text{O}$
13: $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OH}, X = \text{S}$
14: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}, X = \text{S}$

Slika 6: Struktura načrtovanih derivatov 5-benziliden(tio)barbiturne kisline. Z modro barvo je označena benzilidenska skupina, z rdečo pa (tio)barbiturna kislina.

2.2 TESTIRANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Antioksidativne lastnosti spojin bomo preverili s testom sposobnosti redukcije radikala DPPH (DPPH-test) po prirejeni Brand-Williamsovi metodi. Ta test sodi med najpogosteje izvajane *in vitro* metode za vrednotenje antioksidativnega delovanja spojin, saj je preprost, pridobljeni rezultati pa so ponovljivi. Za pripravo vzorcev bomo najprej izbrali primerno topilo, v katerem bodo vse testirane spojine dobro topne. Vrednotenje antioksidativnih lastnosti bo temeljilo na primerjavi izračunanih vrednostih EC_{50} , zato se bomo osredotočili na meritve absorbanc v končni točki. Reakcijsko kinetiko bomo izmerili le za eno izbrano spojino. Ker imajo načrtovani derivati podobno kemijsko strukturo, predvidevamo, da bo primerljiv tudi čas, ki ga bodo potrebovali za redukcijo DPPH. Na podlagi pridobljenih podatkov o kinetiki kemijske reakcije bomo pripravili postopek za meritve absorbanc v končni točki. Rezultate testiranj bomo najprej primerjali s standardom α -tokoferolom, nato pa poskušali razložiti, kateri dejavniki vplivajo na antioksidativno delovanje sintetiziranih derivatov.

3 MATERIALI IN METODE

TOPILA IN REAGENTI

Uporabljali smo reagente in topila proizvajalcev Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluka, Merck in Carlo Erba. Deionizirana voda je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo. Metanol, namenjen izvajanju DPPH-testa, je ustrezal analitskim standardom.

LABORATORIJSKA OPREMA IN DELOVNI PRIBOR

- **Analitska tehtnica:** Mettler Toledo AG245
- **Polavtomatske pipete** proizvajalcev Thermo Scientific in BRAND
- **Mikrotitrna ploščica** s 96 vdolbinami (Techno Plastic Products)
- **Kivete:** 1,5 mL semi-mikro kivete za enkratno uporabo, dimenzije: 12,5 × 12,5 × 45 mm (BRAND)

RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA

- Za risanje kemijskih struktur, poimenovanje spojin in izračune molekulskih mas smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 14.0.
- Rezultate meritev absorbanca smo analizirali s programom MS Excel 2010. V istem programu smo izrisali pripadajoče grafe in izračunali statistične parametre. Vrednosti EC₅₀ smo z uporabo različnih regresijskih modelov izračunali s programom GraphPad Prism 5.

KARAKTERIZACIJA SINTETIZIRANIH SPOJIN

- **TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC):** uporabljali smo kromatografske plošče z 0,22-milimetrsko plastjo silikagela na aluminijastem nosilcu (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck). Za detekcijo smo uporabljali UV-svetilko ($\lambda = 254$ nm) in orositvene reagente.

Mobilni fazi: etilacetat/petroleter = 1/1 ter diklorometan/metanol = 20/1

- **JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA (NMR):** ¹H in ¹³C spektre smo posneli s spektrometrom Bruker Avance DPX 400 na Fakulteti za farmacijo. Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan, vzorci pa so bili posneti v devteriranem topilu DMSO-*d*₆. Spektre smo analizirali s programom MestReC 4.7.0.0.
- **INFRARDEČA (IR) SPEKTROSKOPIJA:** IR-spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo z

uporabo tehnike oslABLJENE popolne odbojnosti (ATR). Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

- **DOLOČANJE TALIŠČ:** Tališča spojin smo določili z mikroskopom z ogrevalno mizico proizvajalca Leica in so nekorrigirana.

VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

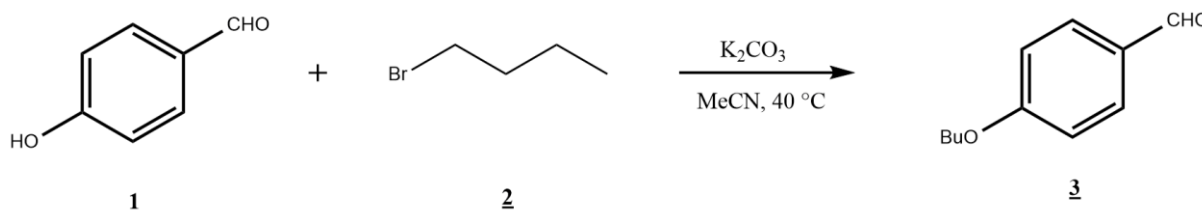
Antioksidativne lastnosti spojin smo vrednotili s pomočjo testa sposobnosti redukcije radikala DPPH po prilagojeni Brand-Williamsovi metodi (21). Metodo smo v začetku eksperimentalnega dela optimizirali, da so bile meritve ponovljive, rezultati pa primerljivi z literaturnimi vrednostmi. Reakcijsko kinetiko smo merili v plastičnih kivetah s pomočjo UV-Vis spektrofotometra Cary 50 (Varian). Za meritve absorbanc testnih raztopin v končni točki smo uporabljali mikrotitrne ploščice in čitalec Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek). Protokol za meritve smo pripravili v programu GEN5 (BioTek).

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA

4.1.1 Sinteza 4-butoksibenzaldehida (**3**)

4-Butoksibenzaldehid (**3**) smo pripravili po postopku Williamsonove sinteze etrov (Slika 7) in ga kasneje uporabili kot izhodno spojino v drugi sintezni stopnji.



Slika 7: Reakcijska shema sinteze spojine **3**

4-Hidroksibenzaldehid (200 mg; 1,64 mmol; **1**) in kalijev karbonat (453 mg; 3,28 mmol) smo raztopili v acetonitrilu (10 mL) in dodali 1-bromobutan (247 mg; 1,80 mmol; **2**). Reakcijsko zmes smo mešali na magnetnem mešalu 24 h pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (TLC). Ker reakcija ni potekla do konca, smo v reakcijsko zmes dodali 4 ekvivalente 1-bromobutana (898 mg; 6,55 mmol; **2**) ter 2 ekvivalenta kalijevega karbonata (453 mg; 3,28 mmol), na bučko namestili povratni hladilnik in zmes čez vikend segrevali na oljni kopeli pri temperaturi $40\text{ }^\circ\text{C}$. S pomočjo TLC smo potrdili, da je reakcija v celoti potekla. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, suhemu zaostanku dodali vodo (10 mL) in vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom (10 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušili z Na_2SO_4 in po filtriranju topilo uparili pod znižanim tlakom.

Lastnosti produkta:

Izgled: rjavo olje

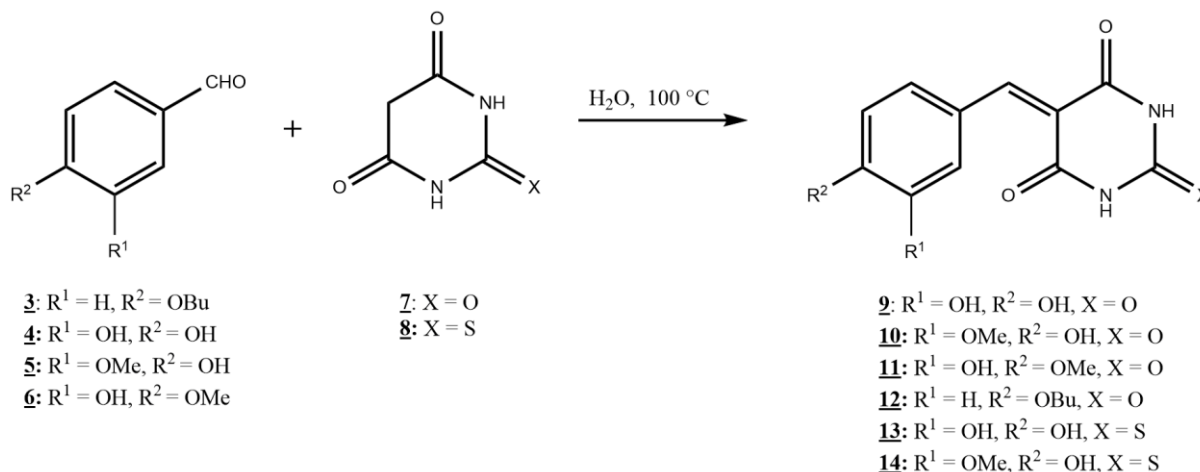
Izkoristek reakcije: 209 mg ($\eta = 72\%$)

TLC: R_f (etilacetat/petroleter = 1/1): 0,74

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.87 (s, 1H, CHO), 7.86 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, ArH-2,6), 7.13 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, ArH-3,5), 4.10 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, OCH_2), 1.77-1.70 (m, 2H, CH_2), 1.50-1.40 (m, 2H, CH_2), 0.95 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_3)

4.1.2 Sinteza 5-benziliden(tio)barbituratov

Splošni postopek za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov



Slika 8: Reakcijska shema sinteze 5-benziliden(tio)barbituratov

Ustrezen benzaldehid (100 mg; **3-6**) in (tio)barbiturno kislino (1 ekvivalent; **7** ali **8**) smo raztopili v vodi (10 mL) ter reakcijsko zmes čez noč (16 h) segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 100 °C. Nastalo oborino smo odnučali, sprali z etanolom (10 mL) in sušili v sušilniku 1 h pri temperaturi 80 °C.

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

Spojino **9** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov* iz 3,4-dihidroksibenzaldehida (100 mg; 0,72 mmol; **4**) in barbiturne kisline (93 mg; 0,72 mmol; **7**).

Lastnosti produkta:

Izgled: rjavi kristali

Izkoristek reakcije: 129 mg ($\eta = 72\%$)

T tališča: >250 °C, po literaturi >250 °C (28)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.24 (s, 1H, NH), 11.17 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H, OH), 9.50 (s, 1H, OH), 8.21 (d, 1H, ⁴*J* = 2.0 Hz, ArH-2), 8.12 (s, 1H, CH), 7.64 (dd, 1H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz, ArH-6), 6.86 (d, 1H, ³*J* = 8.4 Hz, ArH-5)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.18, 162.24, 155.95, 152.32, 150.22, 144.80, 131.32, 124.22, 121.25, 115.33, 113.63

IR (ATR) ν [cm^{-1}] = 3190, 3055, 2847, 2361, 1671, 1543, 1501, 1402, 1295, 1114, 970, 790, 696

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

Spojino **10** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov* iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida (100 mg; 0,66 mmol; **5**) in barbiturne kisline (84 mg; 0,66 mmol; **7**).

Lastnosti produkta:

Izgled: rumeni kosmi

Izkoristek reakcije: 115 mg ($\eta = 67\%$)

T tališča: $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$, po literaturi $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.28 (s, 1H, NH), 11.15 (s, 1H, NH), 10.58 (s, 1H, OH), 8.49 (d, 1H, $^4J = 2.0\text{ Hz}$, ArH-2), 8.23 (s, 1H, CH), 7.82 (dd, 1H, $^3J = 8.4\text{ Hz}$, $^4J = 1.6\text{ Hz}$, ArH-6), 6.91 (d, 1H, $^3J = 8.4\text{ Hz}$, ArH-5), 3.84 (s, 3H, OCH_3)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.15, 162.46, 155.84, 153.01, 150.19, 146.90, 132.51, 124.15, 117.94, 115.27, 113.93, 55.45 (OCH_3)

IR (ATR) ν [cm^{-1}] = 3266, 3061, 2857, 1747, 1657, 1537, 1492, 1400, 1311, 1278, 1163, 948, 824, 789

Sinteza 5-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (11)

Spojino **11** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov* iz 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehida (100 mg; 0,66 mmol; **6**) in barbiturne kisline (84 mg; 0,66 mmol; **7**).

Lastnosti produkta:

Izgled: oranžni kristali

Izkoristek reakcije: 141 mg ($\eta = 82\%$)

T tališča: $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$, po literaturi $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.29 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, OH), 8.16* (s, 1H, CH), 8.13* (d, 1H, $^4J = 2.4\text{ Hz}$, ArH-2), 7.73 (dd, 1H, $^3J = 8.8\text{ Hz}$, $^4J = 2.4\text{ Hz}$, ArH-6), 7.07 (d, 1H, $^3J = 8.8$, ArH-5), 3.89 (s, 3H, OCH_3) *signala se prekrivata

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.99, 162.11, 155.50, 152.86, 150.20, 145.74, 130.31, 125.35, 120.37, 115.02, 111.26, 55.75 (OCH_3)

IR (ATR) ν [cm^{-1}] = 3176, 3052, 2837, 1655, 1541, 1503, 1446, 1383, 1263, 1142, 1008, 813, 691

Sinteza 5-(4-butoksibenziliden)pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (12)

Spojino **12** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov* iz spojine **3** (50 mg; 28 mmol) in barbiturne kisline (36 mg; 0,28 mmol; **7**). Ker je $^1\text{H-NMR}$ analiza po reakciji pokazala ostanek nezreagirane izhodne spojine **3**, smo surov produkt očistili tako, da smo ga suspendirali v dietil etru (10 mL), suspenzijo stresali na ultrazvoku, oborino odnučali in sprali z etanolom (10 mL). Očiščen produkt smo sušili 1 h pri temperaturi 80 °C. Ponovna $^1\text{H-NMR}$ analiza je potrdila uspešnost čiščenja.

Lastnosti produkta:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek reakcije: 14 mg ($\eta = 17\%$)

T tališča: 238 – 242 °C, po literaturi 239 – 242 °C (30)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.31 (s, 1H, NH), 11.19 (s, 1H, NH), 8.37(d, 2H, $J = 9.0$ Hz, ArH-3,5), 8.25 (s, 1H, CH), 7.06 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, ArH-2,6), 4.14 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, OCH₂), 1.77-1.70 (m, 2H, CH₂), 1.50-1.41 (m, 2H, CH₂), 0.95 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃)

IR (ATR) ν [cm^{-1}] = 3186, 3050, 2954, 2859, 1731, 1666, 1508, 1398, 1277, 1171, 998, 839, 792

Sinteza 5-(3,4-dihidroksibenziliden)-2-tioksodihidropirimidin-4,6(1H,5H)-diona (13)

Spojino **13** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov* iz 3,4-dihidroksibenzaldehyda (100 mg; 0,72 mmol; **4**) in tiobarbiturne kisline (104 mg; 0,72 mmol; **8**).

Lastnosti produkta:

Izgled: oranžni kristali

Izkoristek reakcije: 152 mg ($\eta = 80\%$)

T tališča: >250 °C, po literaturi >250 °C (28)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.33 (s, 1H, NH), 12.25 (s, 1H, NH), 10.62 (s, 1H, OH), 9.61 (s, 1H, OH), 8.29 (d, 1H, $^4J = 2.4$ Hz, ArH-2), 8.14 (s, 1H, CH), 7.68 (dd, 1H, $^3J = 8.4$, $^4J = 2.4$ Hz, ArH-6), 6.88 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, ArH-5)

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 178.07 (C=S), 162.50, 159.99, 157.03, 153.23, 144.97, 132.26, 124.46, 121.37, 115.50, 113.64

IR (ATR) ν [cm^{-1}] = 3364, 3259, 3111, 1650, 1612, 1509, 1387, 1196, 965, 855, 772, 729

Sinteza 5-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-2-tioksodihidropirimidin-4,6(1H,5H)-diona (14)

Spojino **14** smo pripravili po *Splošnem postopku za sintezo 5-benziliden(tio)barbituratov* iz 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida (100 mg; 0,66 mmol; **5**) in tiobarbiturne kisline (95 mg; 0,66 mmol; **8**).

Lastnosti produkta:

Izgled: oranžni kristali

Izkoristek reakcije: 139 mg ($\eta = 76 \%$)

T tališča: $>250 \text{ }^\circ\text{C}$, po literaturi $>250 \text{ }^\circ\text{C}$ (28)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.37 (s, 1H, NH), 12.27 (s, 1H, NH), 10.77 (s, 1H, OH), 8.51 (d, 1H, $^4J = 2.0 \text{ Hz}$, ArH-2), 8.25 (s, 1H, CH), 7.89 (dd, 1H, $^3J = 8,4 \text{ Hz}$, $^4J = 2.0 \text{ Hz}$, ArH-6), 6.93 (d, 1H, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, ArH-5), 3.85 (s, 3H, OCH_3)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 178.05 (C=S), 162.46, 160.21, 156.91, 153.82, 147.02, 133.23, 124.38, 118.18, 115.44, 113.99, 55.50 (OCH_3)

IR (ATR) ν [cm^{-1}] = 3447, 3238, 2915, 1657, 1490, 1385, 1284, 1219, 1026, 948, 850, 782

4.2 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

4.2.1 Priprava raztopin

Za pripravo osnovne raztopine DPPH, raztopin sintetiziranih spojin **9-12** in raztopine standarda α -tokoferola smo kot topilo izbrali metanol, 5-benzilidentioarbiturna derivata **13** in **14** pa smo raztopili v metanolu z 1,67 % (v/v) 1 M NaOH.

Pripravili smo 140 μM osnovno raztopino DPPH, katere končna koncentracija v testni raztopini je bila po mešanju z vzorcem za polovico nižja, torej 70 μM .

Osnovne 1,4 mM raztopine vseh šestih 5-benziliden(tio)barbituratov (**9-14**) in standarda α -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 spektroskopske meritve.

4.2.2 Meritve kinetike redukcije DPPH

4.2.2.1 Priprava na meritve kinetike redukcije

V kiveto smo odpipetirali 900 μL osnovne raztopine DPPH in 900 μL metanola ter z meritvijo absorbanc pri različnih valovnih dolžinah posneli absorpcijski spekter razredčene raztopine DPPH. Iz njega smo odčitali maksimum absorpcije, ki je znašal 516 nm. Valovno dolžino maksimuma absorpcije smo nato uporabili za izvajanje vseh nadaljnjih meritev.

Z isto raztopino smo preverili stabilnost radikala DPPH v metanolu. 90 min smo na vsake 0,1 s posneli njeno absorbanco, ki je morala ostati ves čas nespremenjena. Med potekom vseh meritev je bila kiveta pokrita s teflonskim pokrovčkom, da topilo ni izhlapevalo iz kivete.

4.2.2.2 Meritve kinetike redukcije DPPH ob prisotnosti testirane spojine

S spremljanjem kinetike reakcije med DPPH in različnimi koncentracijami spojine **10** smo opazovali, kako koncentracija spojine **10** vpliva na hitrost in končni delež redukcije radikala DPPH.

Pred izvedbo testa smo za vsako izmed petih izbranih koncentracij spojine **10** posneli ozadje. Kot ozadje nam je služil slepi vzorec, ki smo ga pripravili tako, da smo v kiveto odpipetirali 900 μL vzorca z ustrežno koncentracijo in 900 μL metanola. Končna koncentracija slepega vzorca je sovpadala s paralelno koncentracijo vzorca v testni raztopini.

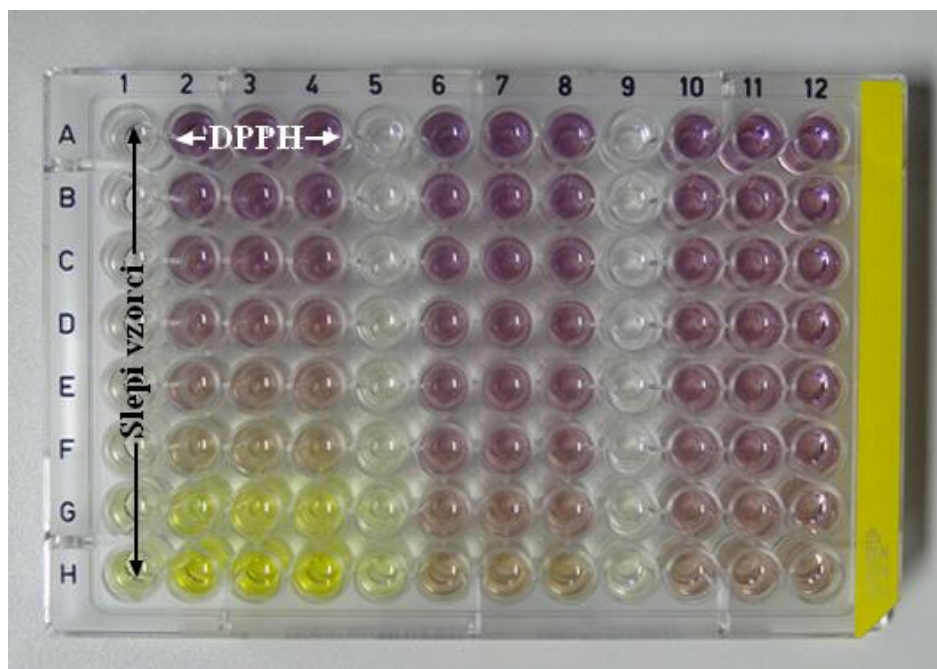
Postopek meritve reakcijske kinetike: V kiveto smo odpipetirali 900 μL vzorca, jo vstavili v spektrofotometer, 10 s pred začetkom meritve pa vanjo dodali še 900 μL osnovne raztopine DPPH. Meritve pri vseh petih izbranih koncentracijah spojine **10** (350, 140, 70, 35 in 17,5 μM) smo izvedli po enakem postopku pri konstantni T 24 °C. 90 min smo v 0,1-sekundnih intervalih spremljali padec absorbance, rezultat pa predstavili kot graf izmerjene absorbance v odvisnosti od časa za vsako izbrano koncentracijo spojine **10**.

4.2.3 Metoda končne točke

Meritve v končnih točkah smo izvajali na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. Tako smo lahko izvedli istočasne meritve treh spojin v sedmih različnih koncentracijah, ki smo jih nanašali v treh alikvotih. Rezultate absorbanc vseh testnih raztopin v končni točki smo podali kot povprečne vrednosti absorbanc treh alikvotov. Poleg sintetiziranih spojin smo

vzporedno merili tudi antioksidativno delovanje standarda α -tokoferola. Z meritvijo jakosti antioksidativnega delovanja standarda smo preverili ustreznost analizne metode za vrednotenje antioksidativnih lastnosti sintetiziranih spojin.

Koncentracije vzorcev, ki smo jih nanašali na mikrotitrsko ploščico, so bile v intervalu med 2,19 μM in 140 μM . V vdolbinice mikrotitrsko ploščice smo vzorce dodajali po enakem postopku kot v kivete, le da smo na mikrotitrsko ploščico nanašali manjše volumne, t.j. 150 μL osnovne raztopine DPPH in 150 μL vzorca z ustrežno koncentracijo. Ker mikrotitrski čitalec ozadja ne odšteje samodejno, smo morali poleg vsakega vzorca v kolono dodati tudi slepi vzorec in njegovo absorbanco na koncu odšteti od absorbance testne raztopine. Primer mikrotitrsko ploščice po končani reakciji je prikazan na Sliki 9.



Slika 9: Mikrotitrsko ploščica po končani reakciji med DPPH in različnimi koncentracijami treh testiranih spojin. Koncentracija vzorca od vdolbinice B proti vdolbinici H narašča. Meritev je bila izvedena v treh alikvotih.

Za določitev časovne točke, ki smo jo nato uporabili za izvedbo meritev v končni točki, smo izmerili absorbance prve serije testnih raztopin po 30 min, 2 h, 4 h in 6 h. Do zadnje meritve smo mikrotitrsko ploščico pokrito inkubirali v temnem prostoru pri konstantni T 24 °C, pred meritvijo pa ploščico s pomočjo mikrotitrskega čitalca stresali 10 s. Kot končno točko smo za vse serije spojin upoštevali absorbanco po 6 h.

Iz vrednosti absorbancc v končni točki smo z uporabo Enačbe 1 izračunali deleže preostalega DPPH v reakcijski raztopini po vzpostavitvi dinamičnega ravnotežja. Te smo v nadaljevanju potrebovali za določitev parametra EC_{50} .

$$\% \text{ preostalega DPPH} = \frac{A_{516}(\text{testna raztopina})}{A_{516}(\text{raztopina DPPH})} \times 100 \quad \text{Enačba 1}$$

A_{516} (testna raztopina) – absorbanca testne raztopine v končni točki pri valovni dolžini 516 nm

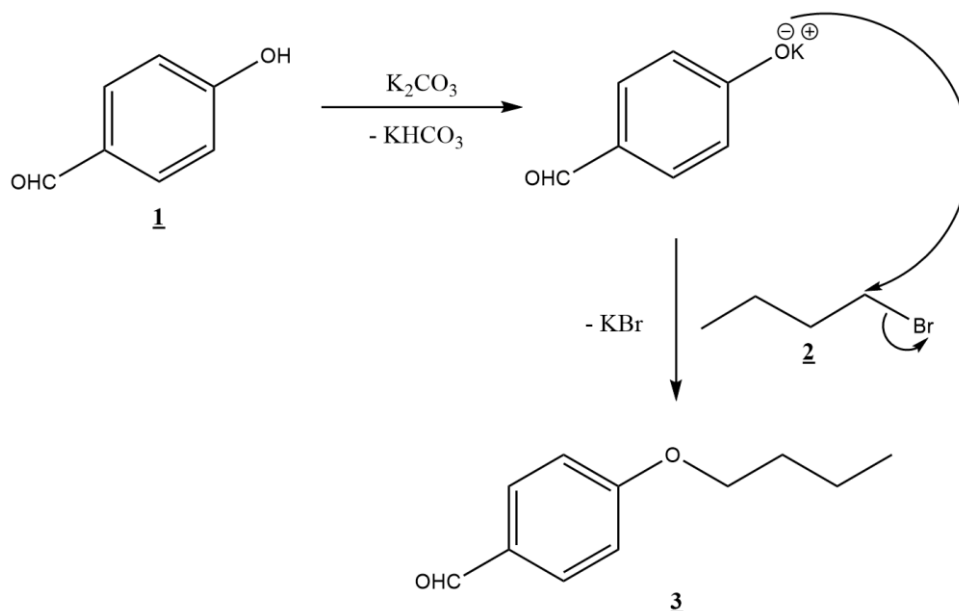
A_{516} (raztopina DPPH) – absorbanca 70 μM raztopine DPPH pri valovni dolžini 516 nm

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 RAZLAGA REAKCIJSKIH MEHANIZMOV

5.1.1 Williamsonova sinteza etrov

Spojino **3** smo pripravili po postopku Williamsonove sinteze etrov. Reakcija je sestavljena iz dveh stopenj: (i) priprave fenolatnega aniona iz spojine **1** ter (ii) sledečega nukleofilnega napada fenolatne O^- skupine na 1-bromobutan (**2**), pri čemer izstopi bromid (Slika 10).



Slika 10: Mehanizem reakcije sinteze spojine **3**

Za odcep protona iz hidroksilne skupine v spojini **1** smo kot bazo uporabili kalijev karbonat, reakcijo pa smo izvedli v aprotičnem topilu acetonitrilu. Fenolatni anion, ki nastane v prvi stopnji, v nadaljevanju kot nukleofil napade elektrofilen α -ogljikov atom v molekuli 1-bromobutana (**2**). Reakcija nukleofilne substitucije poteče po $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu (31, 32).

5.1.2 Knoevenaglova kondenzacija

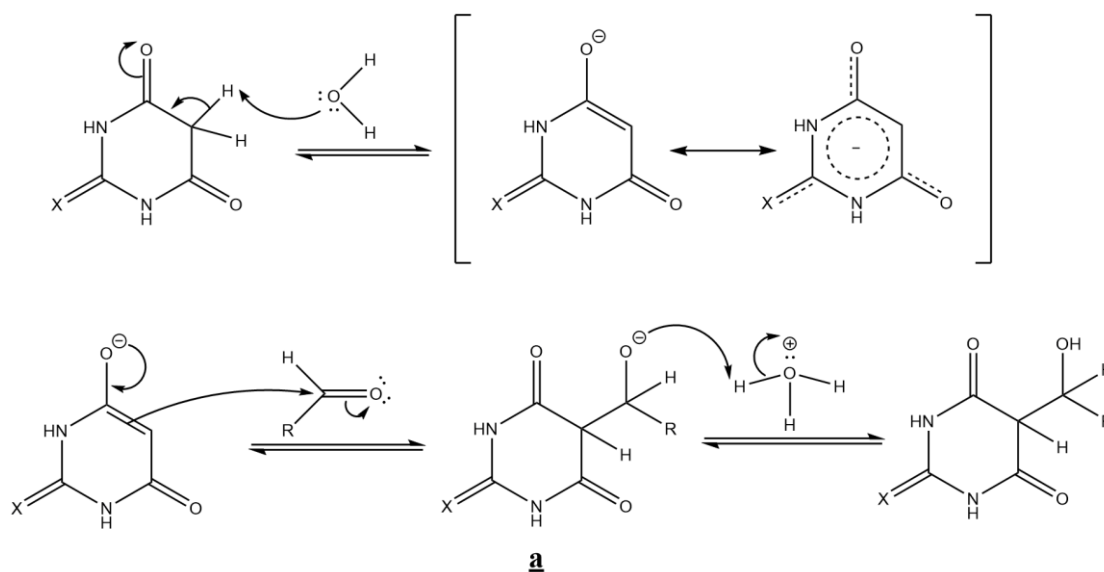
Spojine **9–14** smo pripravili iz ustreznih benzaldehidov (**3–6**) in barbiturne oz. tiobarbiturne kisline (**7, 8**) po postopku Knoevenaglove kondenzacije. Knoevenaglova

kondenzacija je reakcija med aldehydom ali ketonom in spojino z aktivirano metilensko skupino ter je običajno bazično katalizirana. Uvrščamo jo med aldolni kondenzaciji sorodne reakcije (33). Aktivnost metilenske skupine v barbiturni oz. tiobarbiturni kislini je posledica dveh elektron privlačnih karbonilnih skupin, ki sta vezani na sosednja ogljikova atoma.

Pri Knoevenaglovi kondenzaciji kot katalizatorji običajno nastopajo amini, v našem primeru pa je vlogo bazičnega katalizatorja prevzela voda, ki smo jo uporabili kot topilo. Knoevenaglova kondenzacija je sestavljena iz dveh delov: (i) nukleofilne adicije in (ii) eliminacije vode (kondenzacije).

I Nukleofilna adicija

V prvi stopnji voda kot baza odtegne enega izmed protonov na α -ogljikovem atomu v barbiturni oz. tiobarbiturni kislini, pri čemer nastane resonančno stabiliziran enolatni anion. Nastali anion v naslednjem koraku kot nukleofil napade elektrofilno karbonilno skupino v aldehydu. Produkt nukleofilne adicije je negativno nabit intermediat **a**, ki se v naslednji stopnji protonira s prenosom protona iz oksonijevega iona. Pri tem izstopi molekula vode, ki v reakciji sodeluje kot katalizator. (Slika 11).

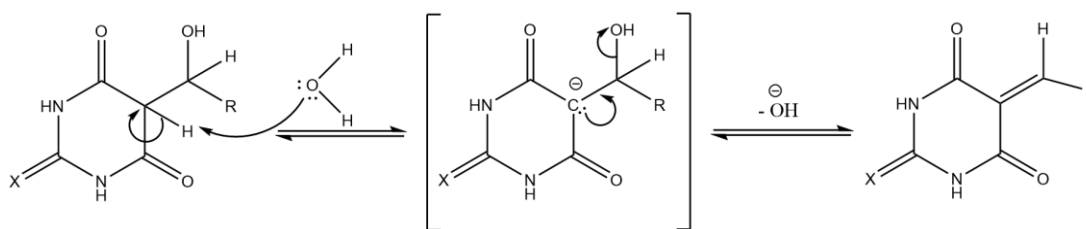


Slika 11: Mehanizem 1. stopnje Knoevenaglove kondenzacije

II Kondenzacija

V naslednji stopnji voda odtegne še drugi proton iz obročne CH-skupine na barbiturni oz. tiobarbiturni kislini. S premikom neveznega elektronskega para se nato tvori π -vez med α -

in β -ogljikom, hkrati pa poteče eliminacija hidroksilne skupine. Končni produkt reakcije je α,β -nenasičena karbonilna spojina (Slika 12) (32, 34).



Slika 12: Mehanizem 2. stopnje Knoevenaglove kondenzacije.

5.2 OPTIMIZACIJA TESTNE METODE

5.2.1 Priprava raztopin

Za pripravo testnih raztopin smo najprej izbrali primerno topilo, v katerem so DPPH, sintetizirani derivati in α -tokoferol dobro topni. Odločili smo se za metanol, ki je bil kot topilo uporabljen tudi v DPPH-testu, po katerem smo metodo povzeli.

Derivati tiobarbiturne kisline so v primerjavi z derivati barbiturne kisline v metanolu slabše topni, saj žveplov atom poveča njihovo lipofilnost (22). Prav tako so zaradi elektronskih vplivov žvepla tiobarbiturati bolj kisli. Da bi povečali topnost spojin **13** in **14**, smo z dodatkom 1 M NaOH tvorili v metanolu dobro topni soli, pri čemer sta se oranžni suspenziji pretvorili v rdeči raztopini.

V primerjavi z etanolnimi raztopinami imajo metanolne višjo absorbanco, zaradi česar je večja tudi občutljivost meritev (13). Pri izbiri ustrezne koncentracije za pripravo osnovne raztopine DPPH smo upoštevali, da je lahko njena absorbanca največ 1. To je zgornja meja, ki še zagotavlja točnost spektrofotometričnih meritev, kar je povezano z omejenim intervalom veljavnosti Beer-Lambertovega zakona (15). Absorbanca 70 μ M raztopine DPPH, izmerjena z UV-Vis spektrofotometrom Cary 50, ima vrednost približno 0,7. Če absorbanco 70 μ M raztopine izmerimo s pomočjo mikrotitrskega čitalca Synergy, je njena vrednost 0,6, kar je posledica krajše optične poti žarka skozi vzorec v vdolbinici mikrotitrskе ploščice (35). Obe vrednosti absorbance ustrezata kriteriju izbora koncentracije.

Vsak dan smo pripravili svežo raztopino DPPH, saj je radikal v njej stabilen le nekaj ur. V času, ko raztopine nismo uporabljali, smo jo hranili v temnem in hladnem prostoru, da se njena absorbanca ob izpostavitvi svetlobi ne bi znižala (36, 37).

5.2.2 Meritve kinetike redukcije DPPH

V prvem delu testiranja antioksidativnega delovanja spojin smo določali kinetiko redukcije DPPH ob prisotnosti testirane spojine. Pred prvim dodatkom spojine z antioksidativnim delovanjem smo morali zagotoviti, da je bila vrednost absorbanca 70 μM raztopine DPPH v času meritve kinetike redukcije (90 min) konstantna. Na ta način smo potrdili, da bo vsak padec absorbanca v naslednjih meritvah le posledica dodatka testirane spojine.

Za spremljanje reakcijske kinetike med DPPH in antioksidantom je pomembno, da obe raztopini v kiveti združimo tik pred izvajanjem meritev, saj je zaradi hiperbolične odvisnosti med absorbanco in časom meritve padec absorbanca v prvih sekundah največji.

5.2.3 Metoda končne točke

Ker imajo pripravljene derivati 5-benziliden(tio)barbiturne kisline podobno kemijsko zgradbo, predvidevamo, da je podobna tudi njihova hitrost, s katero reducirajo radikal DPPH. Zaradi možnosti hkratne meritve večjega števila vzorcev in ker je spojina **10** za doseg dinamičnega ravnotežja potrebovala več kot 90 min (poglavje 5.3.1), smo meritve v končnih točkah izvajali s pomočjo mikrotitrskega čitalca, ki nam omogoča delo na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami.

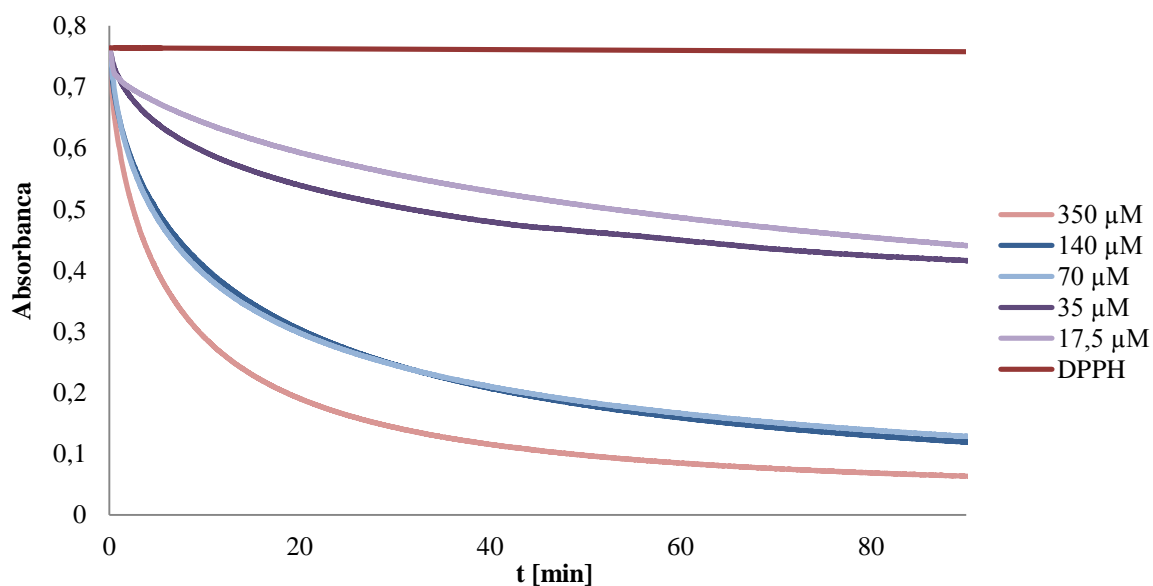
Po izvajanju meritev absorbanca v različnih časovnih točkah smo ugotovili, da reakcijska krivulja ne doseže platoja niti po 6 h, a je med četrto in šesto uro padec absorbanca zanemarljivo majhen. Zato smo se odločili, da bomo kot končno točko upoštevali absorbanco po 6 h.

Prednost reakcij s počasno kinetiko, pri katerih prevladuje reakcijski mehanizem doniranja H-atomov, je, da je prenos vodika neodvisen od pH (19). Zato tudi izbor topila z dodatkom NaOH na končni rezultat ni imel vpliva.

5.3 REZULTATI VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

5.3.1 Kinetika redukcije DPPH

Rezultate meritev kinetike redukcije DPPH predstavljajo grafi izmerjenih absorbanca v odvisnosti od časa za vsako izbrano koncentracijo spojine **10** (Slika 13).



Slika 13: Kinetika redukcije DPPH s spojino **10**

Iz grafov na Sliki 13 je razvidno, da sta vrednost končne absorbance in naklon krivulje odvisna od koncentracije vzorca. Bolj kot je vzorec koncentriran, hitreje poteka reakcija in več DPPH se reducira. Reakcija poteče z vzpostavitvijo dinamičnega ravnotežja, ko reakcijska krivulja doseže plato. Pri vseh koncentracijah testirane spojine opazimo, da ima krivulja po 90 min še vedno naklon. Spojine, ki za doseg platoja potrebujejo več kot 60 min, uvrščamo med spojine s počasno reakcijsko kinetiko (17).

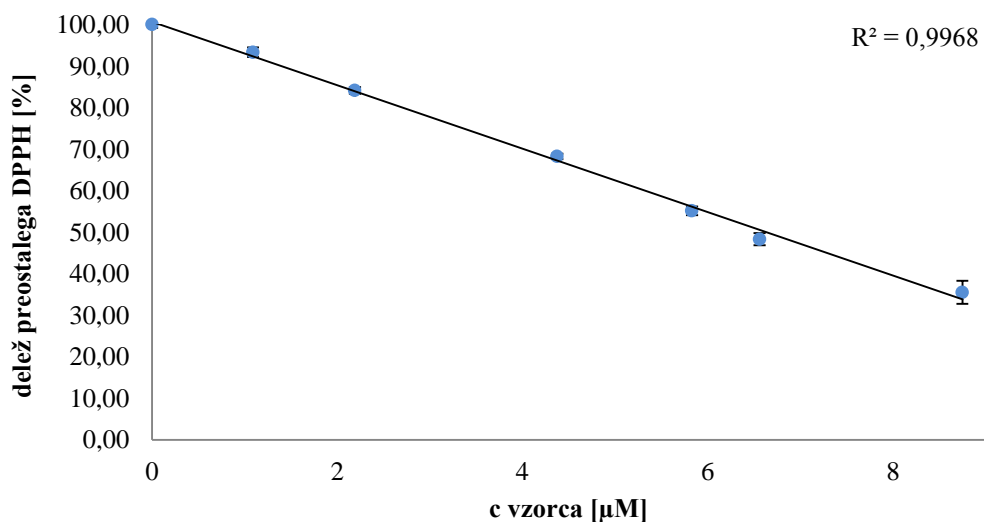
5.3.2 Meritve v končni točki

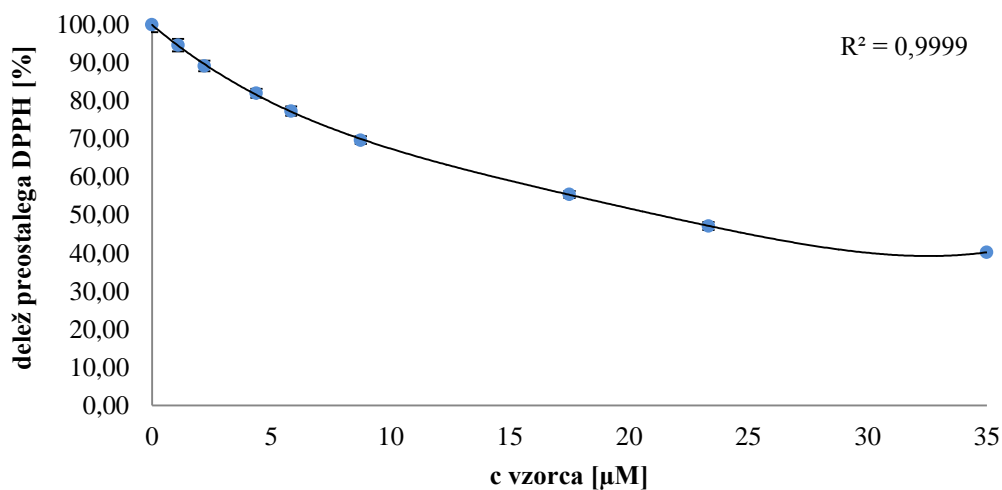
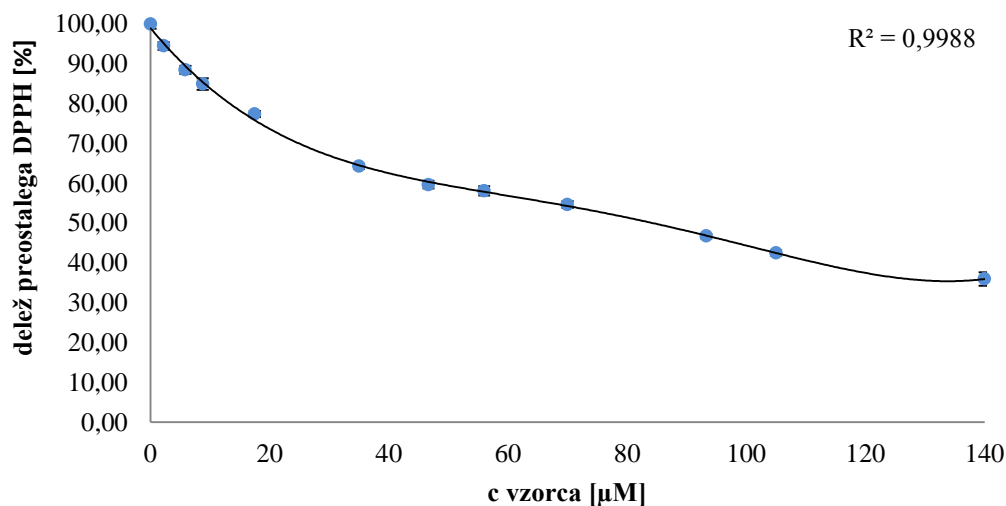
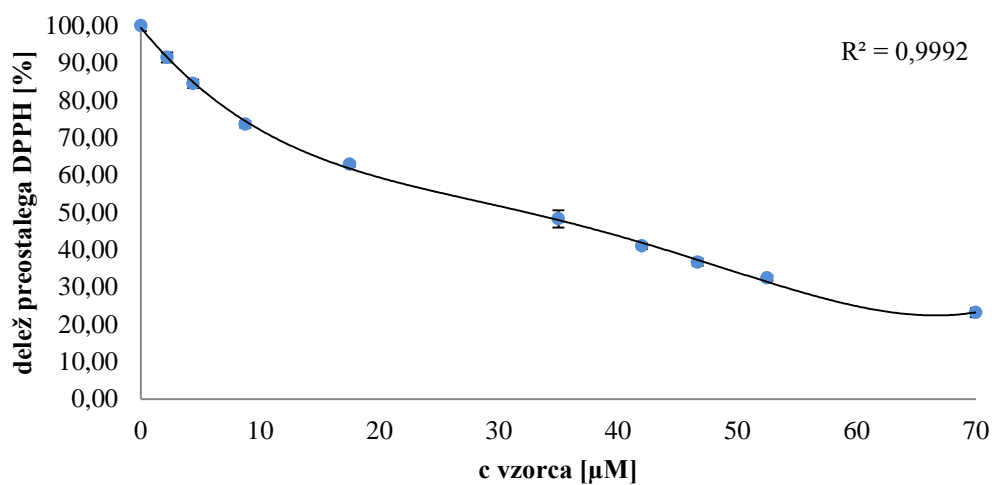
V Preglednici I so prikazane absorbance in deleži preostalega DPPH \pm SD ($n=3$), ki smo jih določili po šestih urah reakcije med DPPH in različnimi koncentracijami spojine **10**. Za ustrezno natančen izračun vrednosti EC_{50} morata biti vsaj dve vrednosti preostalega DPPH nad 50 % in dve vrednosti pod 50 %.

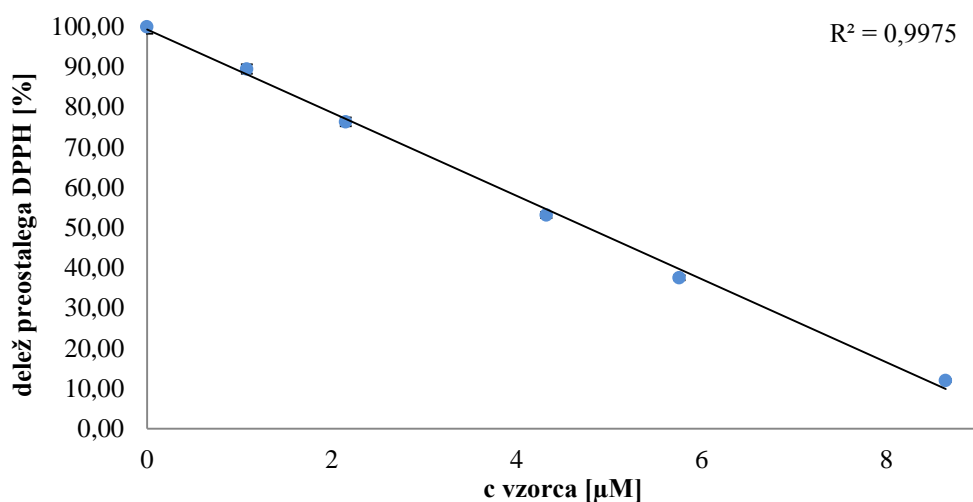
Preglednica I: Rezultati meritev absorbanca spojine **10** v dinamičnem ravnotežju

c vzorca [μM]	c DPPH [μM]	Absorbanca	Delež preostalega DPPH [%]
0,00	70	0,57	100,00 \pm 1,98
1,09	70	0,54	94,62 \pm 1,64
2,19	70	0,51	89,18 \pm 1,36
4,375	70	0,47	81,99 \pm 1,17
5,83	70	0,44	77,31 \pm 1,25
8,75	70	0,40	69,71 \pm 1,01
17,5	70	0,32	55,44 \pm 0,91
23,33	70	0,27	47,13 \pm 1,03
35	70	0,23	40,23 \pm 0,63

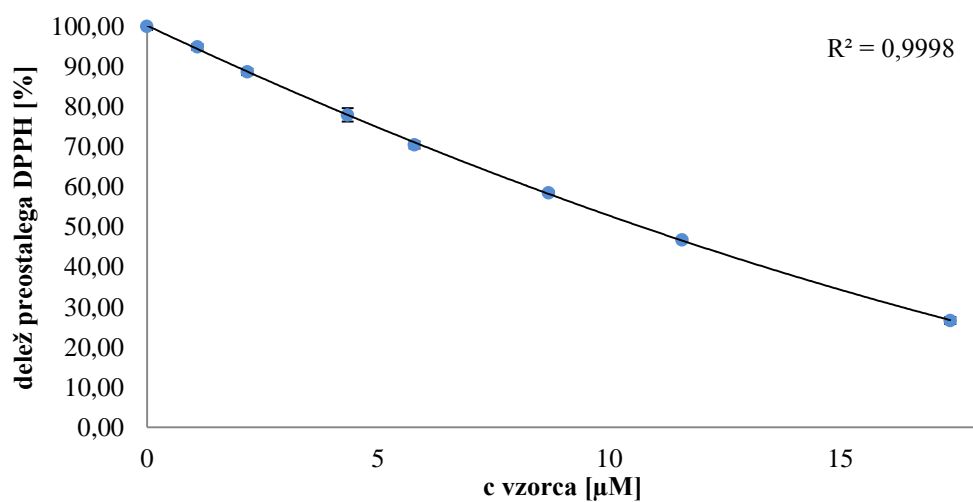
Rezultate deležev preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorcev smo predstavili v obliki grafov (Slike 14-20). Ugotovili smo, da se večina naših spojin najbolj prilega polinomskemu regresijskemu modelu in ne linearnemu, kot smo pričakovali.

**Slika 14:** Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **9**

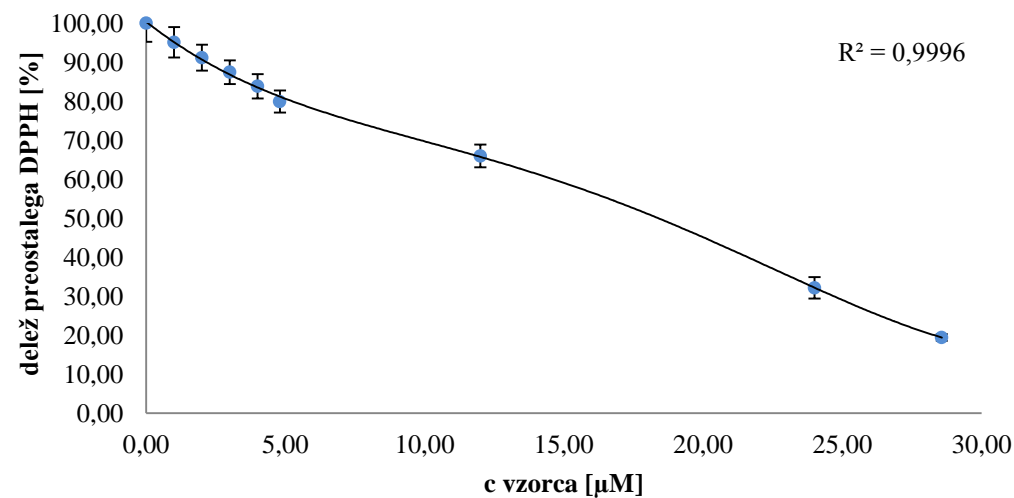
Slika 15: Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 10Slika 16: Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 11Slika 17: Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine 12



Slika 18: Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **13**



Slika 19: Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije spojine **14**



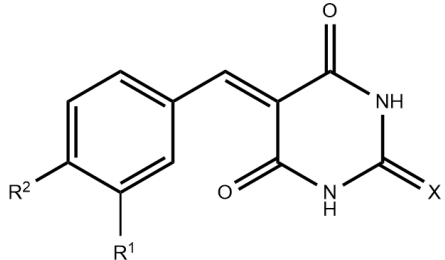
Slika 20: Delež preostalega DPPH v odvisnosti od koncentracije α -tokoferola

V literaturi je največkrat opisana linearna odvisnost med deležem preostalega DPPH in koncentracijo antioksidanta, najdemo pa lahko tudi opise nelinearne odvisnosti (16, 38, 39). Slabost nelinearnega odziva je zahtevnejši in manj natančen izračun vrednosti EC_{50} . Ugotovili so, da je odvisnost med deležem preostalega DPPH in koncentracijo antioksidanta linearna le, dokler je v reakcijski raztopini več kot 60 % delež DPPH. Zato bi bilo za nadaljnje izračune smiselno upoštevati le vrednosti v tem ozkem linearnem območju, na podlagi umeritvene premice pa določiti parameter 20-odstotno učinkovito koncentracijo (EC_{20}) (16). Omejitev tega parametra je težja primerljivost rezultatov, saj za njegove vrednosti še ni dovolj literaturnih podatkov.

5.3.3 Vrednosti srednjih učinkovnih koncentracij (EC_{50})

Vrednosti EC_{50} testiranih spojin smo izračunali iz enačb umeritvenih krivulj in jih podali v Preglednici II. V primeru linearnih odzivov smo vrednostim EC_{50} določili še standardne deviacije (SD).

Preglednica II: Vrednosti srednjih učinkovnih koncentracij (EC_{50}) testiranih spojin

				
Spojina	R^1	R^2	X	$EC_{50} (\pm SD) [\mu M]$
<u>9</u>	OH	OH	O	$6,6 \pm 0,2$
<u>10</u>	OMe	OH	O	21,0
<u>11</u>	OH	OMe	O	32,9
<u>12</u>	H	OBu	O	84,7
<u>13</u>	OH	OH	S	$4,8 \pm 0,2$
<u>14</u>	OMe	OH	S	10,7
α -tokoferol				18,2

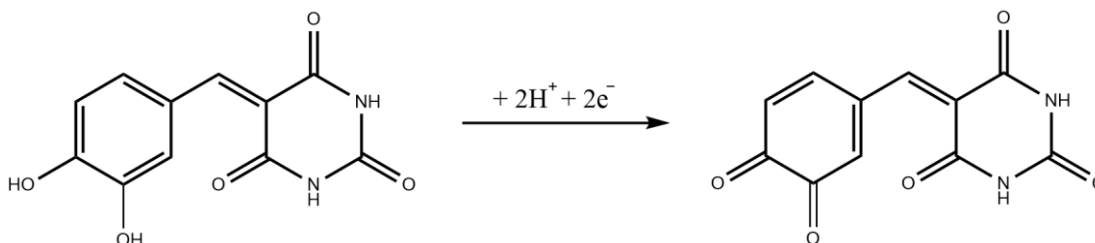
5.4 KOMENTAR REZULTATOV VREDNOTENJA ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI

5.4.1 Komentar vrednosti srednjih efektivnih koncentracij

Pred začetkom vrednotenja antioksidativnih lastnosti pripravljenih spojin smo preverili ustreznost izbrane testne metode z vrednotenjem standarda α -tokoferola. Literaturne vrednosti EC_{50} za α -tokoferol se precej razlikujejo, a se večinoma gibljejo okoli 20 μM (17, 40, 41). Izmerjena vrednost EC_{50} 18,2 μM za α -tokoferol je bila skladna z literaturnimi vrednostmi, s čimer smo potrdili, da je naša testna metoda ustrezna.

V prvem delu nas je zanimal vpliv vrste in položaja substituentov na fenilnem obroču na antioksidativno delovanje testiranih spojin. Iskali smo vzroke za razlike med aktivnostmi spojin **9** – **14** ter njihove vrednosti EC_{50} primerjali z α -tokoferolom, katerega mehanizem delovanja je dobro pojasnjen (42, 43).

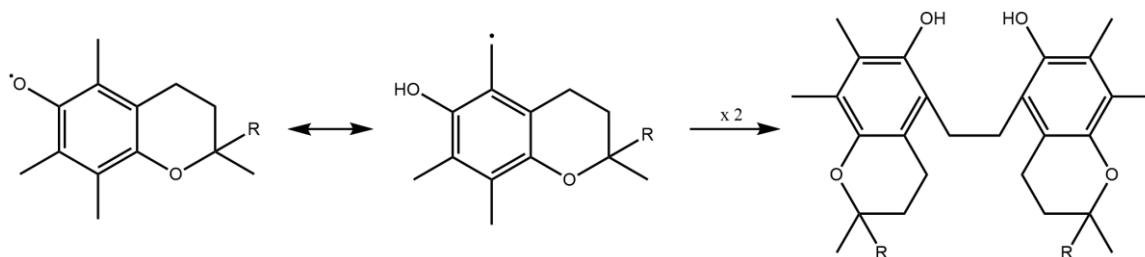
Kot najboljši antioksidant med derivati barbiturne kisline se je po pričakovanju izkazala spojina **9**, saj lahko obe hidroksilni skupini na fenilnem obroču donirata H-atom. V primeru spojine **9**, ki ima na fenilnem obroču na mestih 3 in 4 vezani dve prosti OH skupini, je v reakciji nastali fenilni radikal lahko dodatno stabiliziran zaradi možnosti nastanka ortokinonske strukture (Slika 21).



Slika 21: Nastanek ortokinonske strukture na spojini **9**

Izmerjena vrednost EC_{50} 6,6 μM se ujema z literaturnimi podatki za to spojino, pridobljenimi na sorodnem testnem sistemu (6,2 μM (29)).

Alfa-tokoferol lahko, kljub temu da vsebuje samo eno OH skupino, reducira dve molekuli DPPH. Ta pojav si razlagamo z možnostjo dodatnih reakcij, ki so posledica dimerizacije tokoferil radikala. Po odtegnitvi H-atoma iz dveh molekul α -tokoferola se lahko nastala kisikova radikala premestita v benzilna radikala ter povežeta v novo molekulo s tvorbo kovalentne C-C vezi. Na nastalem dimeru sta znova na razpolago dve OH skupini, ki lahko reducirata dodatni molekuli DPPH (21, 42, 43). (Slika 22)



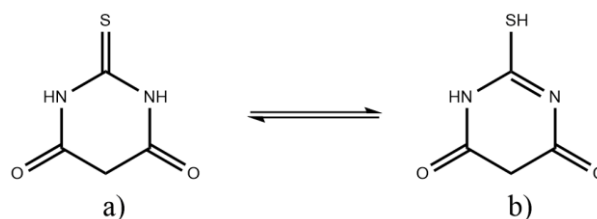
Slika 22: Mehanizem dimerizacije α -tokoferola (prirejeno po (43))

Fenolni antioksidanti morajo za potek dimerizacije domnevno ustrezati dvema pogojema: na fenilnem obroču morajo glede na položaj OH skupine vsebovati prosto *orto* ali *para* mesto, obenem pa preostalih *orto* oz. *para* mest ne smejo imeti substituiranih s skupinami, ki vsebujejo konjugirane dvojne vezi (21). Glede na to, da sta izračunani vrednosti EC_{50} α -tokoferola (18,2 μ M) in spojine **10** (21,0 μ M), ki vsebuje na fenilnem obroču le eno OH skupino, primerljivi, predvidevamo, da v reakciji spojine **10** z DPPH sodelujejo tudi vodikovi atomi, vezani na dušik v barbiturnem obroču. Na ta način si razlagamo tudi antioksidativno delovanje spojine **12** (EC_{50} = 84,7 μ M), ki na fenilnem obroču nima nobene funkcionalne skupine, ki bi lahko služila kot donor vodika. Antioksidativno delovanje spojine **12** je po pričakovanju najslabše izmed vseh testiranih spojin, a spojina kljub temu deluje kot šibek antioksidant, kar bi lahko bila posledica odtegnitve vodikov z dušikovih atomov na barbiturnem obroču. Primeri, da je NH skupina v strukturno podobnih molekulah sposobna oddati H-atom, so v literaturi že opisani, z alkiliranjem dušikovega atoma pa se antioksidativno delovanje takšnih spojin zmanjša (29, 44, 45).

S primerjavo aktivnosti derivatov **10** (EC_{50} = 21,0 μ M) in **11** (EC_{50} = 32,9 μ M), ki vsebujeta na mestih 3 in 4 na fenilnem obroču eno OH in eno OMe skupino, razlikujeta pa se po njunem položaju, lahko potrdimo, da je jakost antioksidativnega delovanja spojin odvisna ne le od števila OH skupin, ampak tudi od njihovega položaja v molekuli (17). Pri vseh sintetiziranih spojinah, z izjemo spojine **12**, nastane iz molekule po odcepu H-atoma kisikov radikal, katerega stabilnost ima bistven vpliv na antioksidativno delovanje spojin. Nastali radikal je resonančno stabiliziran z delokalizacijo elektrona po benzenovem obroču, preko dodatne konjugirane dvojne vezi pa se delokalizacija lahko prenese tudi na (tio)barbiturni obroč. Učinek dodatne konjugirane dvojne vezi je še zlasti izražen pri spojinah **9**, **10**, **13** in **14**, ki vsebujejo prosto OH skupino na *para* mestu fenilnega obroča, saj se lahko pri teh derivatih nesparjen elektron delokalizira po celotni molekuli, pri *meta* analogu pa le znotraj fenilnega obroča (46). Radikal, ki nastane iz spojine **10**, je torej

stabilnejši od radikala, ki nastane iz spojine **11**, zaradi česar spojina **10** deluje kot boljši antioksidant (29, 44).

V drugem delu smo ugotavljali, kako na antioksidativno delovanje vpliva zamenjava barbiturnega obroča s tiobarbiturnim. Kot boljši antioksidanti so se izkazali derivati tiobarbiturne kisline. Spojina **13** ($EC_{50} = 4,8 \mu\text{M}$) ima v primerjavi s spojino **9** ($EC_{50} = 6,6 \mu\text{M}$) boljše antioksidativno delovanje, prav tako pa je spojina **14** ($EC_{50} = 10,7 \mu\text{M}$) bolj aktivna od spojine **10** ($EC_{50} = 21,0 \mu\text{M}$). V več primerih je bilo opisano, da imajo žveplovni analogi močnejše antioksidativno delovanje od njihovih kisikovih analogov, a vzroki za to še niso povsem raziskani (27, 47, 48). Ena izmed možnih razlag za boljše antioksidativno delovanje žveplovih analogov je možnost dodatnih sekundarnih reakcij. Tiobarbiturna kislina se v raztopini nahaja kot zmes tiolaktamskega in tiolaktimskega tautomera. (Slika 22)



Slika 23: Tautomerni obliki tiobarbiturne kisline: a) tiolaktamska oblika b) tiolaktimska oblika (prirejeno po (33))

Tiolna skupina v tiolaktimskem tautomeru je zaradi SH skupine podvržena oksidaciji (49). Za tiole je značilno, da se že ob prisotnosti šibkih oksidantov pretvorijo v disulfide, pri tem pa se sprostita dva H-atoma. Predvidevamo, da lahko 5-benzilidentioarbiturati reagirajo po enakem mehanizmu kot naravni tiolni antioksidanti, npr. glutation. Glutation je močan endogeni antioksidant, sestavljen iz treh aminokislin: L-glutaminske kisline, L-cisteina in glicina. Za njegovo antioksidativno delovanje je odgovorna cisteinska SH skupina, preko katere poteče dimerizacija. Poenostavljen mehanizem reakcije oksidacije tiolne skupine do disulfida je prikazan na Sliki 23 (2, 3).



Slika 24: Prikaz nastanka disulfidne vezi v reakciji med dvema tioloma (prirejeno po (3))

5.4.2 Komentar kinetike redukcije DPPH

Vsi pripravljene 5-benziliden(tio)arbiturati izkazujejo počasno kinetiko redukcije radikala DPPH. Počasno reakcijsko kinetiko med antioksidanti in DPPH so v preteklosti povezovali predvsem s spojinami, pri katerih je večja verjetnost za pojav sekundarnih reakcij v reakcijski raztopini. V primeru 5-benziliden(tio)arbituratov pa je, zaradi možnosti

delokalizacije elektrona po celotni molekuli in s tem stabilizacije nastalega radikala, zlasti pri derivatih **9**, **10**, **13** in **14**, verjetnost sekundarnih reakcij dimerizacije in kompleksacije majhna. Vzroke za daljše reakcijske čase je torej potrebno iskati drugje. Podobna kinetika redukcije DPPH je značilna tudi za večino fenolnih antioksidantov. Pri fenolnih antioksidantih so opazili, da spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo le en obroč z enim substituentom, DPPH reducirajo hitreje, čas za doseg dinamičnega ravnotežja pa se daljša z večanjem števila obročev in pripenjanjem večjih in bolj razvejanih substituentov. Molekula DPPH ima kompleksno tridimenzionalno strukturo, v kateri je radikalski center na dušiku sterično precej oviran (Slika 24) (14). Dušikova atoma v molekuli DPPH sta s treh strani obdana s fenilnimi obroči, ki močno otežujejo dostopnost do radikalskega centra, kar predstavlja dodaten ščit. Iz tega razloga je reakcija kompleksnejših molekul z DPPH počasnejša, saj je pri njih potrebnega več časa za pravilno orientiranje aktivnih H-donorskih skupin za reakcijo s sterično oviranim aktivnim mestom radikala.



Slika 25: Prikaz tridimenzionalne strukture radikala DPPH. N-atomi so obarvani z modro, O-atomi z rdečo, C-atomi s sivo in H-atomi z belo barvo (prirejeno po (19)).

Antioksidativno delovanje spojin v bioloških organizmih ni odvisno le od njihove antioksidativne kapacitete, ki jo izraža vrednost EC_{50} , ampak tudi od tega, kako hitro so sposobne reagirati z radikalom. Medtem ko je radikal DPPH v raztopini stabilen več ur, je življenjska doba radikalov, ki se pojavljajo v bioloških sistemih, npr. hidroksilni, nitroksilni, peroksilni in kisikov radikal, med 1 ms in 10 s. Za uspešno lovljenje teh radikalov je zato pomembna hitra reakcijska kinetika, še zlasti v prvih sekundah reakcije. Glutation, ki je poznan kot eden izmed najučinkovitejših antioksidantov *in vivo*, z DPPH reagira zelo počasi. Razlog za tak odziv je verjetno velikost molekule in posledično sterične ovire pri reakciji z radikalom (19). Iz tega lahko sklepamo, da je morda tudi aktivnost ostalih antioksidantov, ki pri DPPH testu izkazujejo počasno kinetiko, v živih

organizmih hitrejša. Aktivna mesta najpogostejših v naravi prisotnih radikalov so lažje dostopna, zato predvidevamo, da bi lahko v bioloških sistemih tudi kompleksnejše molekule, kot so 5-benziliden(tio)barbiturati, z njimi reagirale hitreje.

Za vrednotenje antioksidativnega delovanja spojin je torej najpomembnejši parameter EC_{50} , izračunan iz absorbanc v končni točki reakcije po dosegu dinamičnega ravnotežja. Vrednost EC_{50} poda oceno učinkovitosti antioksidanta, ki je neodvisna od oblike spojine in mehanizma reakcije z DPPH.

6 SKLEP

Vloga oksidativnega stresa v patoloških procesih je v zadnjih letih pogosto obravnavana tematika. Eden izmed načinov zaščite organizma pred škodljivimi vplivi radikalno sproženih reakcij oksidacije je uporaba antioksidantov. Novejše raziskave potrjujejo, da antioksidativne lastnosti izkazujejo tudi 5-benziliden(tio)barbiturati.

V okviru diplomske naloge smo uspešno sintetizirali in kemijsko ovrednotili serijo šestih derivatov 5-benzilidenbarbiturne in 5-benzilidentioarbiturne kisline ter izmerili njihovo antioksidativno delovanje. Z uvajanjem substituentov na različna mesta na fenilnem obroču ter zamenjavo barbiturnega obroča s tiobarbiturnim smo analizirali vpliv strukturnih sprememb na antioksidativno delovanje sintetiziranih spojin.

Antioksidativno delovanje spojin smo ovrednotili z merjenjem njihove sposobnosti redukcije stabilnega prostega radikala DPPH do neradikalne oblike DPPH-H. Vse načrtovane spojine so imele podobno kemijsko strukturo, zato smo kinetiko redukcije DPPH izmerili le za eno spojino. Poudarili smo pomen izračuna parametra EC_{50} iz vrednosti izmerjenih absorbanč v končni točki ter komentirali slabosti vrednotenja antioksidativnih lastnosti spojin le na podlagi parametrov reakcijske kinetike.

Pet spojin, ki smo jih sintetizirali v okviru diplomske naloge, je izkazovalo odlične antioksidativne lastnosti. Najboljša antioksidanta sta bila spojini **9** in **13**, ki imata na fenilnem obroču vezani dve H-donorski OH skupini. Kot boljši antioksidant se je izkazal žveplov analog **13**, saj zamenjava barbiturnega obroča s tiobarbiturnim poveča antioksidativno kapaciteto spojin. Izmed izomerov **10** in **11**, ki se med seboj razlikujeta v položajih OH in OMe skupine, se je kot boljši antioksidant izkazal resonančno stabilnejši izomer **10**. Najšibkejše antioksidativno delovanje je po pričakovanju izkazovala spojina **12**, ki smo ji z uvedbo alkilnega substituenta na OH skupino odvzeli možnost doniranja H-atoma, vezanega na kisik.

Sintetizirane spojine, ki smo jim določili visoko antioksidativno kapaciteto *in vitro*, predstavljajo obetavno osnovo za nadaljnjo optimizacijo, zato bi bilo smiselno njihovo antioksidativno delovanje ovrednotiti še z dodatnimi študijami *in vivo*.

7 LITERATURA

1. Pečar S: Radikali v našem okolju. *Kemija v šoli* 2006; 18(2): 26–30.
2. Osredkar J: Oksidativni stres. *Slov Med J* 2012; 81: 393-406.
3. Pečar S: Radikali v našem življenju. *Kemija v šoli* 2006; 18(3): 13–19.
4. Baran R, Maibach H: *Textbook of Cosmetic Dermatology, Fourth Edition*, CRC Press, London, 2010: 115.
5. http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2007_Photosensitization_Therapy/mechanisms.html, dostopano: julij 2015
6. Niki E: Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(4): 503–15.
7. Poljšak B, Dahmane R: Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatol Res Pract* 2012; 2012: 1–4.
8. Cornelli U: Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* 2009; 27(2): 175–94.
9. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarov. *Med razgl* 2006; 45: 141-153.
10. Li Y: *Antioxidants in biology and medicine essentials, advances, and clinical applications*, Nova Science Publishers, New York, 2011: 315-317.
11. Alam M N, Bristi N J, Rafiquzzaman M: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J* 2013; 21(2): 143–52.
12. Hermans N, Cos P, Maes L, De Bruyne T, Vanden Berghe D, J. Vlietinck A, et al.: Challenges and Pitfalls in Antioxidant Research. *Curr Med Chem* 2007; 14(4): 417–30.
13. Sharma O P, Bhat T K: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 2009; 113(4): 1202–5.
14. Žilić D, Pajić D, Jurić M, Molčanov K, Rakvin B, Planinić P, et al.: Single crystals of DPPH grown from diethyl ether and carbon disulfide solutions—Crystal structures, IR, EPR and magnetization studies. *J Magn Reson* 2010; 207(1): 34–41.
15. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26(2): 211–9.
16. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno M V, Igartuburu J M, Garcia Barroso C: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem* 2014; 165: 198–204.
17. Mishra K, Ojha H, Chaudhury N K: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem* 2012; 130(4): 1036–43.
18. Wright J S, Johnson E R, DiLabio G A: Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J Am Chem Soc* 2001; 123(6): 1173–83.

19. Xie J, Schaich K M: Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem* 2014; 62(19): 4251–60.
20. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensm Wiss u Technol* 1997; 30: 609–615.
21. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss u Technol* 1995; 28: 25-30.
22. Lemke T L, Williams D A: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012: 489-492.
23. Miller R D, Eriksson L I, Fleisher L A, Wiener-Kronish J P, Cohen N H, Young W L: Miller's Anesthesia, Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 2014: 832-837.
24. Breyholz H-J, Schäfers M, Wagner S, Höltke C, Faust A, Rabeneck H, et al.: C-5-Disubstituted Barbiturates as Potential Molecular Probes for Noninvasive Matrix Metalloproteinase Imaging. *J Med Chem* 2005; 48(9): 3400–9.
25. Bhaveshkumar D D, Bharatkumar Z D, Nimisha S: Anticancer, Antibacterial, Antifungal Activities for Hybrid Probes of Aromatic Amine and Barbituric Acid. *GSTF International Journal of Chemical Sciences* 2014; 1(2): 24-30.
26. Zidar N, Kikelj D: Preparation and Reactivity of 5-benzylidenebarbituric and 5-benzylidene-2-thiobarbituric Acids. *Acta Chim Slov* 2011; 58: 151–7.
27. Sokmen B B, Ugras S, Sarikaya H Y, Ugras H I, Yanardag R: Antibacterial, Antiurease, and Antioxidant Activities of Some Arylidene Barbiturates. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 171(8): 2030–9.
28. Chen Z, Cai D, Mou D, Yan Q, Sun Y, Pan W, et al.: Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy- or methoxy-substituted 5-benzylidene(thio) barbiturates as novel tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2014; 22(13): 3279–84.
29. Khan K M, Ali M, Ajaz A, Perveen S, Choudhary M I, et al.: Synthesis of 5-arylidene barbiturates: a novel class of DPPH radical scavengers. *Lett Drug Des Discov* 2008; 5(4): 286–91.
30. Würthner F, Yao S: Merocyanine dyes containing imide functional groups: synthesis and studies on hydrogen bonding to melamine receptors. *J Org Chem* 2003; 68(23): 8943–9.
31. <https://www.khanacademy.org/science/organic-chemistry/alcohols-ethers-epoxides-sulfides/synthesis-cleavage-ethers/v/williamson-ether-synthesis>, dostopano: julij 2015
32. Clayden J, Greeves N, Warren S: *Organic Chemistry, Second Edition*, Oxford University Press Inc., New York, 2012: 340, 629-630, 1140.
33. Tišler M: *Organska kemija, Tretja popravljena in dopolnjena izdaja*, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2005: 198-207, 227
34. <http://www.aklectures.com/lecture/knoevenagel-condensation>, dostopano: julij 2015
35. <http://www.biotek.com/resources/articles/nucleic-acids-using-epoch.html>, dostopano: julij 2015

36. Ozcelik B, Lee J H, Min D B: Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 2003; 68(2): 487–90.
37. Otohinoyi D, Ekpo O, Ibraheem O: Effect of ambient temperature storage on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical for the evaluation of antioxidant activity. *Int J Biol Chem Sci* 2014; 8(3): 1262.
38. Eklund P C, Långvik O K, Wärnå J P, Salmi T O, Willför S M, Sjöholm R E: Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org Biomol Chem* 2005; 3(18): 3336.
39. Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coïsson J-D, Rinaldi M, Arlorio M: Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem* 2009;114(3): 889–97.
40. Liss P, Hansell P, Bruley D F: *Oxygen Transport to Tissue XXX*, Springer Science & Business Media, New York, 2008: 112.
41. Rahman A U: *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products*, Elsevier B.V., Amsterdam, 2005: 709.
42. Hudson B J F, editor: *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Food Science Series, London 1990: 69-70.
43. Wain A J, Wadhawan J D, France R R, Compton R G: Biphasic redox chemistry of α -tocopherol: Evidence for electrochemically induced hydrolysis and dimerization on the surface of and within femtolitre droplets immobilized onto graphite electrodes. *Phys Chem Chem Phys* 2004; 6(4): 836.
44. 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. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17(5): 1149–54.
45. Khan K, Khan M, Ali M, Taha M, Hameed A, Ali S, et al.: Synthesis and DPPH radical scavenging activity of 5-Arylidene-N,N-dimethylbarbiturates. *Med Chem* 2011; 7(3): 231–6.
46. http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emp_hasis/Chapter_07%3A_Organic_compounds_as_acids_and_bases/Section_7.4%3A_More_on_resonance_effects_on_acidity_and_basicity, dostopano: julij 2015
47. Jyoti Sen D et al.: In-vitro evaluation of total reducing property of the synthesized molecule having variable atomic electronegativity. *J Chem Pharm Res* 2010; 2(3): 631-639.
48. Katla R, Syed R, Golla M, Shaik A, Chamarthi R: Synthesis and biological evaluation of novel urea and thiourea derivatives of valacyclovir. *J Serbian Chem Soc* 2014; 79(3): 283–9.
49. Patrick G: *Instant Notes in Organic Chemistry, Second Edition*, Taylor & Francis, New York, 2012: 278-279.