

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA ŠKULJ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZALA ŠKULJ

**UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI PRI IZBRANIH 5-  
BENZILIDEN BARBITURATIH Z METODO REDUKCIJE 2,2-DIFENIL-1-  
PIKRILHIDRAZILA**

**EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF SELECTED 5-  
BENZYLIDENE BARBITURATES WITH METHOD OF 2,2-DIPHENYL-1-  
PICRYLHYDRAZYL REDUCTION**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku za usmerjanje, strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi družini in fantu za podporo na moji študijski poti.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

## IZJAVA

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

Zala Škulj

Ljubljana, 2015.

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos

Članica komisije: asist. dr. Mirjam Gosenca

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	III
ABSTRACT .....	IV
SEZNAM SLIK.....	VI
SEZNAM PREGLEDNIC.....	VI
SEZNAM GRAFOV .....	VI
1 UVOD .....	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES .....	1
1.1.1 Neradikalske in radikalske zvrsti.....	1
1.1.2 Radikali.....	1
1.1.3 Reakcije radikalov .....	2
1.2 STARANJE KOŽE.....	2
1.2.1 Spremembe v dermisu .....	2
1.2.2 Spremembe v epidermisu .....	3
1.2.3 Intrinzično staranje .....	3
1.2.4 Ekstrinzično staranje.....	3
1.3 ANTIOKSIDANTI .....	4
1.3.1 Antioksidativni obrambni sistem.....	5
1.3.2 Uporaba antioksidantov v kozmetičnih izdelkih .....	6
1.3.3 Metode za vrednotenje antioksidantov .....	9
1.3.4 DPPH metoda .....	10
1.4 DERIVATI BARBITURNE KISLINE .....	11
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE.....	14
3.1 Spojine .....	14
3.1.1 Priprava spojin.....	15
3.1.2 Priprava standarda .....	16
3.1.3 Kemikalije in reagenti .....	17
3.1.4 Merilni pripomočki in aparati.....	18
3.2 Metode .....	18

3.2.1	Izvedba metode kinetike redukcije DPPH in določanja hitrostnih konstant .	18
3.2.2	Izvedba metode določanja EC <sub>20</sub> .....	19
3.2.3	Obdelava podatkov za določanje hitrostnih konstant in EC <sub>20</sub> .....	19
4	REZULTATI.....	22
4.1	Kinetika redukcije DPPH in kvantitativno določanje hitrostnih konstant .....	22
4.2	Kvantitativno določanje EC <sub>20</sub> .....	26
5	RAZPRAVA .....	33
5.1	Kinetika redukcije DPPH in kvantitativno določanje hitrostnih konstant.....	33
5.2	Kvantitativno določanje EC <sub>20</sub> .....	36
6	SKLEP.....	40
7	LITERATURA.....	41

## POVZETEK

Zaradi številnih dejavnikov lahko pride do neravnovesja med tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in učinkovitostjo antioksidantov, ki jih odstranjujejo. Tako povečana količina reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so lahko radikalske ali neradikalske, povzroči oksidativni stres. V času, ko je koža izpostavljena soncu, se absorbira velika količina UV svetlobe, ki inducira nastanek reaktivnih radikalov, ki v koži negativno vplivajo na epidermis, dermis, hipodermis ter lasne folikle. Tako staranje, ki ga povzroči UV svetloba, imenujemo fotostarjenje. Kozmetična industrija išče rešitve proti škodljivim učinkom radikalov z uporabo antioksidantov, ki ščitijo kožo in oksidativno občutljive spojine v kozmetičnih izdelkih.

Ariliden barbiturati in derivati rodanina imajo številne učinke, med drugimi izkazujejo tudi antioksidativno delovanje. Če na mesto 5 na barbiturnem obroču uvedemo benzilidensko skupino, dobimo t.i. 5-benziliden barbiturate. V okviru diplomske naloge smo ugotavljali, ali izbrane spojine izkazujejo antioksidativno delovanje. Spremljali smo kinetiko redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) do 2,2-difenil-1-pikrilhidrazna (DPPH-H) pri različnih koncentracijah izbranih spojin. Določili smo hitrostne konstante in koncentracije, ki so potrebne za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH ( $EC_{20}$ ).

Kot standard smo uporabili antioksidant butil hidroksitoluen (BHT). Kinetika redukcije DPPH je pokazala, da izbrane spojine pri izmerjenih koncentracijah spadajo med antioksidante s počasno reakcijsko kinetiko. BHT pri najnižji merjeni koncentraciji ravno tako spada med antioksidante s počasno reakcijsko kinetiko.

Pri določevanju hitrostnih konstant in  $EC_{20}$  smo ugotovili, da se rezultati analiziranih spojin med seboj razlikujejo zaradi prisotnosti in razporeditve različnih funkcionalnih skupin na analiziranih spojinah. Spojine **1**, **2** in **3** z elektron privlačnimi skupinami izkazujejo boljše antioksidativno delovanje kot spojini **4** in **5** z elektron donorskima skupinama. BHT je od analiziranih spojin izkazal najboljše antioksidativno delovanje.

Izbrane spojine so potencialno zanimive za uporabo v kozmetičnih izdelkih kot aktivne sestavine z antioksidativnim delovanjem. Njihovo antioksidativno delovanje bi bilo potrebno ovrednotiti še z drugimi *in vitro* ter *in vivo* študijami.

**Ključne besede:** antioksidanti, radikali, 5-benziliden barbiturati, DPPH

## ABSTRACT

Several factors can cause unbalance between formation of reactive oxygen species (ROS) and effectiveness of antioxidants, which remove ROS. Excess concentrations of reactive oxygen species, which are in radical or non-radical form, cause oxidative stress. Exposure to sun causes absorption of large amounts of UV radiation that induce reactive free radicals, which effect epidermis, dermis, hipodermis and hair follicles. Ageing, caused by UV radiation is called fotoageing. Cosmetic industry is looking for solutions against harmful effects of radicals by using antioxidants that protect skin and oxidation-sensitive ingredients in cosmetic products.

Arylidene barbiturates and rhodanine derivates have several effects including antioxidative properties. 5-benzylidene barbiturates are prepared with the substitution of benzylidene group on the position 5 of the barbiturate ring. In the present work we evaluated antioxidative properties of selected compounds. We monitored kinetics of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reduction into 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH-H) using different concentrations of selected compounds. We evaluated rate constants and concentrations that are necessary for reduction of initial DPPH concentration by 20% ( $EC_{20}$ ).

Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as standard. From monitoring kinetics of DPPH reduction, selected compounds at different concentrations have shown slow kinetic reduction. BHT also shown slow kinetic reduction when the lowest concentration of BHT was monitored.

Evaluated rate constants and  $EC_{20}$  showed that results of analyzed compounds are different due to presence and positions of different functional groups of analyzed compounds. Compounds **1**, **2** and **3** with *electron withdrawing* groups have greater antioxidative properties than compounds **4** and **5** with *electron donating* groups. BHT had the greatest antioxidative properties.

Selected compounds are potentially interesting for use in cosmetic products as active compounds with antioxidative properties. Their antioxidative properties should also be evaluated with other *in vitro* and *in vivo* studies.

**Key words:** antioxidants, radicals, 5-benzylidene barbiturates, DPPH

## SEZNAM OKRAJŠAV

A <sup>•</sup>	radikal na antioksidantu
BHT	butil hidroksitoluen
CAT	katalaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DPPH-H	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
EC20	20-odstotna efektivna koncentracija
EC50	50-odstotna efektivna koncentracija
GAG	glikozaminoglikani
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
R <sup>•</sup>	lipidni radikal
RNA	ribonukleinska kislina
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SOD	superoksid dismutaza
UV	ultravijolična
x	koncentracija



## SEZNAM SLIK

<b>Slika 1:</b> Reakcija BHT s peroksilnim radikalom .....	9
<b>Slika 2:</b> Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila .....	10
<b>Slika 3:</b> Reakcija DPPH z antioksidantom .....	10
<b>Slika 4:</b> Mikrotitrna plošča po končani reakciji med DPPH in različnimi koncentracijami dveh testiranih spojin.....	19
<b>Slika 5:</b> Reakcija BHT z DPPH .....	38

## SEZNAM PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Prikaz analiziranih spojin .....	14
<b>Preglednica II:</b> Prikaz koncentracij analiziranih spojin za merjenje kinetike redukcije DPPH.....	15
<b>Preglednica III:</b> Prikaz koncentracij analiziranih spojin za določevanje EC <sub>20</sub> .....	15
<b>Preglednica IV:</b> Prikaz BHT .....	16
<b>Preglednica V:</b> Prikaz koncentracij BHT za merjenje kinetike redukcije DPPH .....	16
<b>Preglednica VI:</b> Prikaz koncentracij BHT za določevanje EC <sub>20</sub> .....	16
<b>Preglednica VII:</b> Prikaz kemikalij in reagentov .....	17
<b>Preglednica VIII:</b> Prikaz reakcijskih zmesi za določevanje EC <sub>20</sub> .....	19
<b>Preglednica IX:</b> Prikaz hitrostnih konstant spojin pri koncentraciji 140 μM .....	25

## SEZNAM GRAFOV

<b>Graf 1:</b> Kinetika redukcije DPPH s spojino 1 pri različnih koncentracijah .....	22
<b>Graf 2:</b> Kinetika redukcije DPPH s spojino 2 pri različnih koncentracijah .....	23
<b>Graf 3:</b> Kinetika redukcije DPPH s spojino 3 pri različnih koncentracijah .....	23
<b>Graf 4:</b> Kinetika redukcije DPPH s spojino 4 pri različnih koncentracijah .....	24
<b>Graf 5:</b> Kinetika redukcije DPPH s spojino 5 pri različnih koncentracijah .....	24
<b>Graf 6:</b> Kinetika redukcije DPPH z BHT pri različnih koncentracijah .....	25
<b>Graf 7:</b> Grafični prikaz hitrostnih konstant .....	26
<b>Graf 8:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH (EC <sub>50</sub> ) pri različnih koncentracijah spojine 1 .....	26

<b>Graf 9:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri spojini 1 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij.....	27
<b>Graf 10:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH (EC <sub>50</sub> ) pri različnih koncentracijah spojine 2 .....	27
<b>Graf 11:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri spojini 2 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij.....	28
<b>Graf 12:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH (EC <sub>50</sub> ) pri različnih koncentracijah spojine 3 .....	28
<b>Graf 13:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri spojini 3 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij.....	29
<b>Graf 14:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri različnih koncentracijah spojine 4 .....	29
<b>Graf 15:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri spojini 4 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij.....	30
<b>Graf 16:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri različnih koncentracijah spojine 5 .....	30
<b>Graf 17:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri spojini 5 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij.....	31
<b>Graf 18:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH (EC <sub>50</sub> ) pri različnih koncentracijah BHT.....	31
<b>Graf 19:</b> Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC <sub>20</sub> ) pri BHT ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij.....	32
<b>Graf 20:</b> Grafični prikaz vrednosti EC <sub>20</sub> spojin 1 – 5 in BHT .....	32

# 1 UVOD

## 1.1 OKSIDATIVNI STRES

Ljudje smo izpostavljeni fizičnemu, psihičnemu, kot tudi kemičnemu stresu; vsi imajo negativen učinek na telo. Helmut Sies je leta 1985 uvedel pojem oksidativni stres, za katerega je značilna povečana količina reaktivnih kisikovih zvrsti-ROS (angl. Reactive oxygen species). Oksidativnemu stresu, ki spada med kemični stres, so izpostavljeni vsi aerobni organizmi (1, 2).

Nastane lahko zaradi ultravijolične (UV) svetlobe, določenih kemikalij (pesticidov, zdravil, protitumornih učinkovin), virusov, bakterij, onesnaženega zraka, ki predstavljajo zunanje dejavnike. Prav tako pa lahko oksidativni stres povzročajo tudi notranji dejavniki, kot so nekatere bolezni (sladkorna bolezen, debelost, itd.) ter intenzivna, pretirana telesna dejavnost. Zaradi teh dejavnikov pride do neravnovesja med tvorbo ROS in učinkovitostjo antioksidantov, ki odstranjujejo ROS. Posledično se poveča količina ROS, ki drugače v majhnih količinah nastajajo v telesu, zaradi njihovih pozitivnih učinkov, na primer med fiziološko presnovo celic in sintezo določenih hormonov (1, 2). Radikale (npr. dušikov monoksid) izločajo tudi fagociti, saj z njimi uničujejo patogene organizme (3).

### 1.1.1 Neradikalske in radikalske zvrsti

ROS so lahko radikalske ali neradikalske zvrsti. Med radikale spada tripletni kisik ( $^3\text{O}_2$ ), ki ima na zunanji orbitali dva neparjena elektrona z enako usmerjenima spinoma, zaradi česar pride do paramagnetnosti. Tripletni kisik ima izmed vseh alotropnih modifikacij kisika najnižjo energijo in je slabo reaktiven. Ko se v molekuli  $^3\text{O}_2$  obrne eden od spinov, takrat govorimo o singletnem kisiku ( $^1\text{O}_2$ ) v osnovnem stanju. Ta oblika je izredno reaktivna zaradi sposobnosti sprejetja novega elektrona ali elektronskega para. Naslednja zvrst je ozon ( $\text{O}_3$ ), ki ga sestavljajo trije atomi kisika in ima vsaj deloma radikalski značaj. Je zelo močan oksidant, saj lahko povzroči nastanek radikalov. Med neradikalske zvrsti sodijo vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroperoksid (ROOH), peroksidi (ROOR'), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) in drugi (1).

### 1.1.2 Radikali

Za radikale je značilno, da imajo neparjen elektron na vsaj eni orbitali, zaradi primankljaja elektronov so kemijsko nestabilni, kratkoživi ter izredno reaktivni. Lahko se nahajajo v obliki molekul ali njihovih delov, lahko so atomi ali ioni. Zaradi primankljaja

elektronov reagirajo s sosednjimi molekulami, pri čemer je pomembno, da ima pridobljen elektron nasprotno smer spina od nesparjenega elektrona. Najpomembnejši so kisikovi, dušikovi, ogljikovi ter klorovi radikali. Primeri nekaterih radikalov: superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\cdot}$ ), hidroperoksidni radikal ( $HOO^{\cdot}$ ), alkoksilni radikal ( $RO^{\cdot}$ ), peroksidni radikal ( $ROO^{\cdot}$ ), ariloksidni radikal ( $ArO^{\cdot}$ ) (1).

### **1.1.3 Reakcije radikalov**

Radikali lahko reagirajo na tri različne načine. Z molekulami lahko reagirajo z adicijo radikala na dvojno vez ali pa molekulam odtegnejo vodikov atom ali elektron. Tretji način je reakcija dveh radikalov. Pri prvih dveh načinih nastanejo novi radikali, sproži se verižna reakcija, pri reakciji med dvema radikaloma pa nastane kovalentna vez (1).

Zaradi visoke reaktivnosti lahko radikali oksidirajo katero koli organsko molekulo v organizmu ter povzročijo celične poškodbe. V največji meri so tarče radikalov lipidi, proteini in DNA/ RNA. Posledično pride do povečanih možnosti za nastanek ateroskleroze, sladkorne bolezni, Alzheimerjeve bolezni, možganske kapi, srčnega infarkta, vnetja, raka ter drugih bolezni (1). Oksidativni stres v povezavi s kožo povzroča lipidno peroksidacijo, poškodbe DNA in vnetja, kar povzroči staranje, motnje in bolezni kože (4).

## **1.2 STARANJE KOŽE**

Staranje je fiziološki proces, ki nastane zaradi izgube homeostaze, zato koža postane manj odporna na okoljske vplive in določene bolezni. Spremembe nastanejo v epidermisu, dermisu, hipodermisu in lasnih foliklih (5).

### **1.2.1 Spremembe v dermisu**

Dermis z leti postane tanjši, manj elastičen in odporen na stres. Količina kolagena se zmanjša za približno 1% na leto na enoto površine kože. Vzroki za zmanjšanje kolagena, ki je eden od najpomembnejših komponent dermisa, so v zmanjšani sintezi in spremembi razmerja kolagenskih vrst ter povečanju aktivnosti encimov, ki ga razgrajujejo. V dermisu pride tudi do zmanjšanja vsebnosti vode in tkivnih tekočin, zmanjšanja glikozaminoglikanov (GAG) ter kopičenja nenormalnega elastotičnega materiala v zgornjem in srednjem dermisu, kar vodi v strukturno reorganizacijo kolagena in elastina. Vse spremembe v dermisu so lahko vzrok intrinzičnega in ekstrinzičnega staranja, vendar ima ekstrinzično staranje veliko večji vpliv (5).

### **1.2.2 Spremembe v epidermisu**

V koži mlade odrasle osebe proces spremembe keratinocitov od zarodne celice do popolnega poroženevanja v povprečju traja 28 dni, z leti pa se ta proces upočasni na 40 do 60 dni. Pojavi se neenakomerna pigmentacija kože, kot so starostne pege, najverjetneje zaradi neenakomernega transporta melanina od melanocitov na keratinocite ali prevelike lokalne sinteze melanina. Z leti se zmanjša število papil, gostota in premer kapilar. Koža postane suha, zaradi zmanjšane delovanja epidermalne bariere in zmanjšane sinteze vlažilcev, kot so aminokisliline, hialuronska kislina, glicerin in *pirolidon ogljikova kislina*. Zmanjša se sekrecija sebuma, predvsem zaradi vpliva hormonskih sprememb (5). Poleg sprememb v dermisu in epidermisu se pojavijo tudi ostale spremembe. Zmanjša se število las in dlak, ki postanejo obenem tudi tanke ter krhke, pojavijo se sivi lasje. Nohti postanejo krhki, lomljivi (6).

### **1.2.3 Intrinzično staranje**

Staranje lahko razdelimo na kronološko ali intrinzično staranje in zgodnje ali ekstrinzično staranje. Intrinzično staranje nastane predvsem zaradi genetike in hormonskih sprememb. Zmanjša se količina kolagena, število melanocitov, Langerhansovih celic in fibroblastov, pojavi se hiperkeratoza, krajšanje telomeraz in metabolni oksidativni stres. Intrinzično staranje povzroča suho, srbečo in stanjšano kožo, zmanjšuje elastičnost, poveča možnosti za nastanek avtoimunskih bolezni, premalignih sprememb in kožnega raka, pojavijo se plitve gube in brazde (5).

### **1.2.4 Ekstrinzično staranje**

Ekstrinzično staranje v največji meri nastane zaradi kronične izpostavljenosti soncu (UV svetlobe), pa tudi zaradi kajenja, infrardeče svetlobe, prevelikih količin alkohola, slabe prehrane, zlorabe toksikomanogenih snovi ter obrazne mimike (5). UV svetloba je odgovorna za 80% ekstrinzičnega staranja (7). Staranje, ki ga povzroči UV svetloba, imenujemo fotostarjenje in nastane zaradi škodljivih učinkov sončne svetlobe, še posebej, ko gre za večletno in ponavljajoče se izpostavljanje soncu (6). Ko je koža daljši čas izpostavljena soncu, se absorbira velika količina UV svetlobe, ki inducira nastanek reaktivnih radikalov. Tako daljše, ponavljajoče se izpostavljanje UV svetlobi povzroči fotostarjenje, poveča možnosti za nastanek kožnega raka, zavira imunski sistem kože in povzroči vnetje. Kratkotrajno izpostavljanje UV svetlobi pa ima pozitiven učinek na kožo, saj se poveča sinteza vitamina D, ki preprečuje nastanek rakavih celic in genetskih poškodb (8).

UVB svetloba (280-320 nm) se absorbira predvsem v epidermisu in tako vpliva na epidermalne celice. Z direktno interakcijo z DNA povzroči poškodbe, kot so zamenjave nukleotidov, poškodbe sladkornih enot, spremembe dušikovih baz itd. Zaradi UV svetlobe krajših valovnih dolžin lahko pride do nastanka sončnih opeklin in predvsem neposrednih poškodb celic kože. UVA svetloba (320-400 nm), ki se absorbira globlje, vpliva tako na epidermalne celice, kot tudi na dermalne celice ter poveča možnosti za nastanek kožnega raka predvsem posredno s tvorbo radikalov. Zaradi tvorbe radikalov je UVA svetloba glavni povzročitelj fotostaranja. UV svetloba poleg ROS inducira tudi nastanek reaktivnih dušikovih zvrsti (RNS) (5, 9).

Radikali poškodujejo celice in tkiva, na kar se telo odzove z aktivacijo celic, ki povzročajo vnetje. Na ta način telo uniči poškodovane celice in tkiva, vendar pri tem nastanejo tudi poškodbe zdravih celic in tkiv v okolici (5).

Na nastanek radikalov lahko v redkih primerih vpliva tudi vidna svetloba preko fotosenzibilizatorjev, ki absorbirajo vidno svetlobo in preidejo iz vzbujenega singletnega v tripletno stanje. Vzbujeni fotosenzibilizatorji povzročijo nastanek singletnega kisika s prenosom energije na  $^3\text{O}_2$  (7).

Poleg sonca je eden izmed pomembnih dejavnikov ekstrinzičnega staranja tudi kajenje, ki lahko povzroči oksidativni stres, odelitev kože, elastoza, mrežaste vene, grobost kože ter druge spremembe. Nastale spremembe se pojavijo zaradi zoženja žil zaradi nikotina ter vnašanja ROS in RNS skozi pljuča v kožo in ostale dele telesa (5, 9).

Zaradi ekstrinzičnega staranja koža postane suha, groba, hrapava, z globokimi gubami in brazdami, obarva se rumenkasto, povečajo se možnosti za nastanek mrežastih ven, peg, premalighnih sprememb, kožnega raka ter drugih motenj in bolezni kože (5).

Najboljši način preprečevanja fotostaranja sta izogibanje UV svetlobi in uporaba varovalnih izdelkov za sončenje, kateri vsebujejo UV filtre (8). UV filtri so lahko anorganski ali organski, delujejo tako, da absorbirajo ali odbijajo UV svetlobo (11). Vendar sta se izogibanje UV svetlobi in uporaba varovalnih izdelkov za sončenje izkazala kot neučinkovita, saj pojav kožnega raka raste (8). V smeri delovanja proti fotostaranju kozmetična industrija išče rešitve z uporabo antioksidantov (5).

### **1.3 ANTIOKSIDANTI**

Antioksidanti so snovi, ki upočasnijo ali preprečijo nastanek radikalov, odstranijo lahko že nastale radikale in s tem preprečijo oksidativne poškodbe molekul. Delujejo lahko preko

različnih mehanizmov, najpogostejši mehanizmi so reakcije z radikali (lovilci radikalov), reakcije z prooksidanti (hem, železovi in bakrovi ioni) in katalitično odstranjevanje radikalov (1).

Antioksidanti, ki so lovilci radikalov, vsebujejo vsaj en vodik ali elektron, ki se odcepi ter veže na radikal. Pri tem antioksidanti povzročijo nevtralizacijo radikalov ter sami pridobijo lastnosti radikalov. Nesparjeni elektroni oziroma radikali na antioksidantih so veliko bolj stabilni in imajo daljšo življenjsko dobo, kot škodljivi radikali, ki nastajajo *in vivo*. Poleg tega je več verjetnosti, da radikali na antioksidantih reagirajo med seboj in ne z ostalimi molekulami (1, 5). V primeru, ko antioksidanti delujejo tako, da reagirajo s prooksidanti, povzročijo manjšo razpoložljivost prooksidantov in na ta način preprečijo prenos elektronov in nastanek radikalov. Katalitični odstranjevalci radikalov pa delujejo tako, da katalizirajo pretvorbe radikalov v neškodljive snovi (1).

### **1.3.1 Antioksidativni obrambni sistem**

Telo je kot obrambo proti radikalom razvilo antioksidativni obrambni sistem, ki pa je zelo kompleksen. Deluje na primarnem, sekundarnem in terciarnem nivoju. Primarni obrambni sistem preprečuje nastanek radikalov, sekundarni jih nevtralizira, terciarni pa popravlja nastalo škodo, ki so jo povzročili radikali. Antioksidativni obrambni sistem deluje singergistično, saj ima celoten sistem večji učinek kot vsota učinkov posameznih antioksidantov (1, 5).

Antioksidante lahko razdelimo na različne načine. Glede na topnost so lahko lipofilni (vitamin E, vitamin A), hidrofilni (vitamin C) ali amfifilni (lipojska kislina). Lahko jih razdelimo glede na njihovo kemijsko strukturo, torej na encimske ali neencimske antioksidante. Najpomembnejši encimski antioksidanti v telesu so superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR). Encimski antioksidanti so najučinkovitejši, saj se njihova koncentracija prilagodi potrebam po zmanjšanju oksidativnega stresa (5, 9). Neencimski antioksidanti delujejo na različne načine, njihovo nastajanje ni odvisno od oksidativnega stresa. Prva skupina neencimskih antioksidantov so blažilci šoka, nahajajo se v visokih koncentracijah v krvi in drugih tkivih. Naslednja skupina so tisti, ki jih vnesemo v telo s prehrano (esencialni antioksidanti): na primer vitamini in aminokislina. Med neencimske antioksidante spadajo še spojine naravnega izvora, kot so karotenoidi, flavnoidi, (poli)fenoli, ki niso nujno potrebni pri antioksidativni zaščiti. Antioksidante lahko razdelimo tudi glede na njihov

izvor. Lahko so endogenega (npr. SOD, katalaza, albumin, sečna kislina) ali eksogenega izvora (npr. vitamin C, vitamin E) (9).

Tisti antioksidanti, ki reagirajo z radikali, se pri tem oksidirajo in pretvorijo v neaktivno obliko. Za njihovo ponovno delovanje se morajo vrniti v prvotno obliko. Antioksidativni obrambni sistem deluje tako, da povzroči ponovno obnovo in regeneracijo oksidirane oblike. Tako se lahko nekateri antioksidanti regenerirajo, drugi pa se ne morejo, zato so primerni za enkratno uporabo (5, 9).

Poleg antioksidativnega obrambnega sistema ima telo tudi popravljalne mehanizme, ki popravljajo poškodbe DNA in mehanizme, ki inducirajo celično smrt poškodovanih celic. Vendar se lahko tudi ti mehanizmi nasitijo ali okvarijo v primeru, ko pride do mutacije v tumorsupresorskih genih, kar poveča možnosti za nastanek raka (6).

Zaradi zmanjšane vnosa ali absorpcije antioksidantov (monotone prehrane, hipovitaminoze, malabsorpcije, celiakije), pretiranega uživanja zdravil, oslabitve antioksidativnih encimov in zmanjšane biološke uporabnosti antioksidantov, lahko pride do zmanjšane antioksidativne zaščite. Vendar pretirano uživanje antioksidantov, še posebej ene vrste antioksidanta, ni zaželeno, saj lahko velika količina antioksidantov vodi v antioksidativni stres, kjer telo spremeni antioksidativni obrambni sistem v telesu (prevelika količina eksogenih antioksidantov povzroči zmanjšano sintezo endogenih antioksidantov). V telesu mora biti še vseeno prisotna majhna količina ROS zaradi njihovih pozitivnih lastnosti (ekspresija genov, redoks signaliziranje), obenem pa lahko tudi oksidativni stres povzroči večjo učinkovitost popravljalnih mehanizmov (2).

### **1.3.2 Uporaba antioksidantov v kozmetičnih izdelkih**

Primarna preventiva izogibanja UV svetlobi in uporaba varovalnih izdelkov za sončenje z namenom preprečevanja fotostaranja in nastanka kožnega raka, se je izkazala kot neučinkovita. Poleg tega se antioksidativni obrambni sistem in drugi popravljalni mehanizmi lahko zaradi kronične izpostavljenosti UV svetlobi zasitijo in postanejo preobremenjeni, zato njihovo delovanje nadomestimo z uporabo antioksidantov, ki jih v obliki kozmetičnega izdelka naneseemo na kožo. Antioksidanti se uporabljajo v kozmetičnih izdelkih zaradi dveh razlogov. Prvi je ta, da antioksidanti ščitijo oksidativno občutljive spojine, kot so nenasičene maščobne kisline v kozmetičnih izdelkih (te imenujemo tehnični antioksidanti). Drugi razlog pa je, da antioksidanti ščitijo kožo pred škodljivimi učinki radikalov (6).



### 1.3.2.1 Učinki radikalov v koži in v kozmetičnih izdelkih

Mladi keratinociti v bazalni plasti kože so izredno občutljivi na UV svetlobo. Zaradi spremenjene ekspresije določenih genov nastanejo postarane celice in celice s spremenjeno celično aktivnostjo. Postarane celice zaradi manjše občutljivosti na zunanje dražljaje postanejo neaktivne, kar vodi v celično smrt. Celice s spremenjeno celično aktivnostjo pa lahko povzročijo fotostaranje in povečajo možnosti za nastanek raka (6).

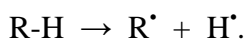
Radikali lahko deaktivirajo pomembne encime in proteine v telesu, saj so radikali vključeni pri reakcijah hidroksilacije, dehidrogenacije in glikiranja proteinov, neposredno ter posredno vplivajo na elastazo, kolagenazo,  $\beta$ -glukoronidazo ter hialuronidazo. Radikali v koži povzročijo tudi depolimerizacijo hialuronske kisline, pri čemer nastanejo glikozidi in hidroperoksidi. Sprožijo lahko lipidno peroksidacijo sestavin kozmetičnih izdelkov ter kožnih lipidov (1, 6).

Sestava lipidov se v koži razlikuje po plasteh. Sfingolipidov (ceramidov), prostih maščobnih kislin ter nevtralnih lipidov je v epidermisu več kot v dermisu, fosfolipidov pa je več v dermisu. Na površini normalne kože najdemo predvsem trigliceride, pri aknasti koži, pa je zaradi bakterij, prisotnih več prostih maščobnih kislin. V koži se nahajajo tudi glikolipidi. Najpomembnejši lipidi kože so ceramidi, saj imajo glavno vlogo pri barierni funkciji epidermisa (6).

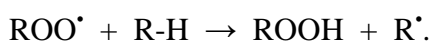
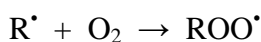
Kozmetični izdelki vsebujejo različne oksidacijsko občutljive sestavine, največkrat so to nenasičene maščobne kisline. Te sestavine kozmetičnih izdelkov ter lipidi, ki se nahajajo na površini kože, so v veliki meri nagnjeni k verižni reakciji – lipidni peroksidaciji. Bolj kot je maščobna kislina nenasičena, večja je možnost za reakcijo z radikali (1, 6). Za peroksidacijo so poleg lipidov dovzetni tudi ogljikovi hidrati, proteini, aminokisline in nukleotidi (1).

Reakcije avtooksidacije nenasičenih maščobnih kislin potekajo v treh fazah:

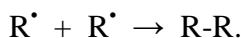
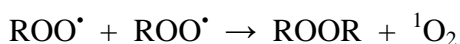
Prva faza je indukcijska faza, kjer nastanejo radikali. V tej fazi pride do homolitske cepitve kovalentne vezi in nastanka radikalov, zaradi UV svetlobe (6):



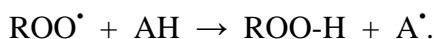
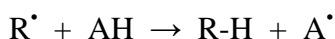
Naslednja faza je verižna reakcija, kjer pride do nastanka novih lipidnih radikalov ( $R^{\bullet}$ ), lipidnih peroksidnih radikalov ( $ROO^{\bullet}$ ) ter razgradnje produktov maščobnih kislin- lipidni hidroperoksid ( $ROOH$ ) (6):



V zadnji fazi pride do prekinitve verižne reakcije, kjer nastanejo stabilne spojine (6):



Antioksidatni (AH) v kozmetičnih izdelkih običajno delujejo tako, da pri verižni reakciji s kratkoživimi radikali tvorijo stabilne ter nereaktivne radikale (6):



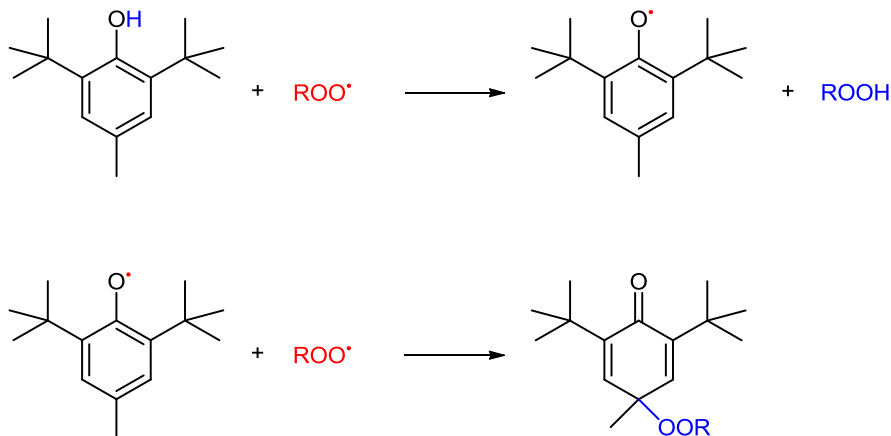
### **1.3.2.2 Pomanjkljivosti antioksidantov v kozmetičnih izdelkih**

Ena od pomanjkljivosti antioksidantov pri vgradnji v formulacijo kozmetičnega izdelka je stabilnost, saj so antioksidanti pogosto zelo reaktivni. Poleg tega je potrebno izbrati primeren antioksidant glede na vrsto kozmetičnega izdelka, vrsto spojine, ki jo želimo zaščititi, ostalih prisotnih antioksidantov in od sprejemljivosti antioksidanta na koži (6). Dodatne težave predstavljajo tudi antioksidanti, ki so močno obarvani, občutljivi na svetlobo, slabo prehajajo biološke pregrade ali so slabo topni. Zaradi omejene stabilnosti antioksidantov se pogosto uporabljajo kemijske modifikacije antioksidantov (naprimer estri vitamina E in C). Poleg tega kozmetična industrija išče rešitve tudi v novih dostavnih sistemih, kot so nanodelci, liposomi, mikroemulzije in drugi dostavni sistemi, ki omogočajo boljšo stabilnost, povečano topnost, boljšo penetracijo v kožo ter privlačnejši izgled (4).

### **1.3.2.3 Antioksidanti v kozmetičnih izdelkih**

Vitamin C (L-askorbinska kislina) in vitamin E (skupina osmih naravnih izomerov) sta najpomembnejša vitamina v telesu in koži. Vitamin C se nahaja v vodotopnih okoljih vseh plasti kože, vitamin E pa najdemo v lipofilnih okoljih, v epidermisu ga je več kot v dermisu (4, 9). Alfa-tokoferol je najpomembnejša izomerna oblika vitamina E v koži (4). Oba vitamina sta pogosto uporabljena v kozmetičnih izdelkih. Topikalno nanešen vitamin E ščiti kožo pred eritemom, lipidno peroksidacijo, fotostaranjem in nastankom kožnega raka. Vitamin C inhibira encim tirozinazo in posledično zmanjša tvorbo melanina, poveča sintezo kolagena in lipidov na površini kože. Poleg tega je kofaktor številnih encimov. Oba vitamina sta lovilca radikalov, med njune pozitivne lastnosti uvrščamo tudi nizko iritacijo in redke stranske učinke. V kozmetičnih izdelkih se pogosto uporabljajo estri obeh vitaminov zaradi izboljšane stabilnosti (4, 9).

V zadnjem času se zaradi potreb po boljši stabilnosti, topnosti, penetraciji v kožo ter drugih učinkih, uporabljajo tudi sintetični antioksidanti. Sintetični antioksidant butil hidroksitoluen (BHT) uporabljajo v živilski in kozmetični industriji (11). Je derivat fenola in lovilec radikalov. Fenoli so obsežna skupina antioksidantov, za katere je značilno, da imajo hidroksilno (–OH) skupino na benzenovem obroču (9).



Slika 1: Reakcija BHT s peroksilnim radikalom (9)

V reakciji s peroksilnim radikalom BHT odda vodik radikalom ter se oksidira (slika 1). Oksidirana oblika BHT lahko vstopi v sekundarno reakcijo, kjer pride do kompleksacije z novim peroksilnim radikalom. Tako lahko BHT reducira dva peroksilna radikala (9).

### 1.3.3 Metode za vrednotenje antioksidantov

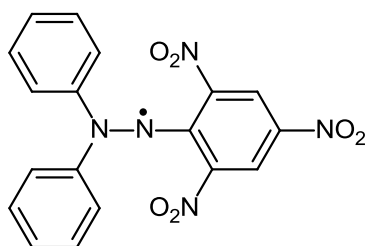
Metode, ki se uporabljajo za vrednotenje antioksidantov, so lahko *in vivo* ali *in vitro* metode. Metode *in vivo* vrednotenja antioksidantov temeljijo na meritvah oksidativnega stresa v telesnih tekočinah in tkivih s pomočjo biomarkerjev in so odvisne od številnih dejavnikov. Eden od teh je biološka razpoložljivost, saj se mora antioksidant ohraniti v telesnih tekočinah in tkivih. Težava se nahaja tudi v tem, da imajo zdravi organizmi, na katerih se izvajajo testi, zadostne količine endogenih antioksidantov, zato se ob zaužitju antioksidantov oksidativni stres ne zmanjša. Poleg tega so učinki oksidativnega stresa in antioksidantov *in vivo* zelo kompleksni (12).

*In vitro* metode temeljijo na posnemanju kemijskih reakcij antioksidantov v živih organizmih (12). Za vrednotenje antioksidantov je potrebno uporabiti več različnih *in vitro* metod, vendar se v zadnjem času študije omejujejo na uporabo samo ene *in vitro* metode, najpogosteje na metodo z DPPH. Pri *in vitro* metodah je pomembno tudi, da spojina ni citotoksična pri koncentraciji, ki izkazuje antioksidativno delovanje (13). Poleg tega se antioksidativno delovanje nekaterih antioksidantov *in vitro* razlikuje od tistega *in vivo*, saj

uporaba *in vitro* metod ne vključuje absorpcije, transporta, metabolizma in izločanja antioksidanta (12).

### 1.3.4 DPPH metoda

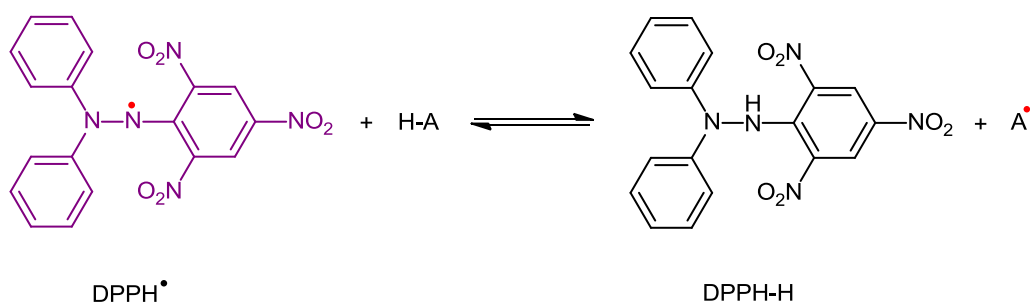
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) je stabilen radikal, pri sobni temperaturi se nahaja v trdnem stanju (slika 2). V svoji strukturi ima v središču dušik z neparnim valenčnim elektronom (14).



Slika 2: Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila

Delokalizacija elektrona daje molekuli vijolično barvo, poleg tega zaradi delokalizacije elektrona molekula DPPH ne dimerizira, zato je radikal v raztopini stabilen več ur, medtem ko so ostali radikali *in vivo* stabilni samo nekaj milisekund od nekaj sekund (15, 16).

Metoda z uporabo DPPH je kolorimetrična metoda in je najpogosteje uporabljena *in vitro* metoda za vrednotenje antioksidativnega delovanja (17). DPPH lahko v prisotnosti antioksidanta sprejme elektron ali vodikov atom in se tako pretvori v stabilno molekulo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH-H) (slika 3). Pri tem se reducirana oblika DPPH iz vijolične barve spremeni v svetlo rumeno barvo. S spremembo barve ovrednotimo delovanje antioksidanta s pomočjo spektrofotometrije, saj DPPH močno absorbira v območju 515 do 520 nm. Čim boljši kot je antioksidant, večja je količina reduciranega DPPH, svetlejša barva je vzorec (18).



Slika 3: Reakcija DPPH z antioksidantom

DPPH je prvič opisal Blois leta 1958, kjer je prvič predstavil, da lahko DPPH sprejme vodikov atom od molekule cisteina (18). Metodo z DPPH z modifikacijami so objavili Brand-Williams s sodelavci leta 1995. (19)

Antioksidativno delovanje se pogosto izraža kot efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ), ki predstavlja koncentracijo antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50% začetne vrednosti DPPH. Parameter  $EC_{50}$  so prvič predstavili Brand-Williams et al. (19).

Nižja kot je vrednost  $EC_{50}$ , več reduciranega DPPH nastaja in bolj učinkovito antioksidant odstranjuje DPPH.  $EC_{50}$  je neodvisen od vzorčne koncentracije in je tako primeren za primerjavo različnih antioksidantov (19).

Metoda z DPPH je enostavna, učinkovita in cenovno ugodna, vendar ima nekaj pomanjkljivosti. Ena od teh je nelinearnost med koncentracijo antioksidanta in reduciranim DPPH. Delo v linearnem območju je pomembno, saj nam daje rezultate z manjšo napako. Poleg tega morajo biti vzorci analizirani pri različnih koncentracijah (običajno v triplikatih), zato je pri velikem številu analiznih vzorcev potrebnega veliko časa. Na absorbanco DPPH vplivajo kisik, svetloba ter pH. Ker se med seboj razlikujejo tudi postopki, saj se uporabljajo različna topila, začetne koncentracije DPPH, volumni vzorcev, inkubacijski časi in predstavitve rezultatov, je težko primerjati dobljene rezultate različnih postopkov (19).

#### **1.4 DERIVATI BARBITURNE KISLINE**

Derivati barbiturne kisline imajo številne biološke učinke. V začetku 20. stoletja so jih uporabljali kot pomirjevala in uspavala (20). Zaradi dostopnosti in številnih funkcionalnih lastnosti je barbiturna kislina pogosto začetna komponenta za pripravo različnih derivatov (21). Sintetiziranih je več kot 2500 različnih analogov barbiturne kisline. Od tega jih je okoli 25 komercialno dostopnih (22).

Ariliden barbiturate se uporablja kot prekurzorje v pripravi novih heterocikličnih bioaktivnih molekulah in kot potencialne selektivne oksidirajoče snovi (11). Delujejo antibakterijsko in so inhibitorji ureaze. Vnetje z bakterijo *Helicobacter pylori* lahko inducira oksidativni stres ter poškodbe celic, saj ta bakterija vsebuje encim ureazo, ki katalizira razgradnjo sečnine do ogljikovega dioksida in amonijaka. Ker ariliden barbiturati inhibirajo ureazo, s tem posredno preprečijo nastanek oksidativnega stresa (11, 20). Delujejo tudi kot lovilci radikalov (23).

Med ariliden barbiturate spadajo 5-benziliden barbiturati, ki imajo na mestu 5 na barbiturnem obroču substituirano benzilidensko skupino (21). V študiji Zhiyong Chen et al. leta 2014 so ugotovili, da 5-benziliden barbiturati inhibirajo tirozinazo, ki sodeluje v sintezi melanina (24). 5-benziliden barbiturati bi bili zaradi sposobnosti inhibiranja ureaze

in tirozinaze, antioksidativnega ter antibakterijskega delovanja, potencialno uporabni kot aktivne učinkovine v kozmetičnih izdelkih.

V diplomski nalogi bomo poleg 5-benziliden barbituratov preučili tudi derivat rodanina, saj derivati rodaninov ravno tako izkazujejo številne biološke učinke, na primer delovanje proti bakterijam in glivam, delujejo kot antidiabetiki ter antioksidanti (25, 26).

## 2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo ugotavljali, ali izbrani 5-benziliden barbiturati in derivat rodanina delujejo kot antioksidanti. Z uporabo UV-Vis spektrofotometra bomo spremljali kinetiko redukcije DPPH pri različnih koncentracijah izbranih spojin. Določili bomo hitrostne konstante ter koncentracije spojin, ki so potrebne za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH ( $EC_{20}$ ).

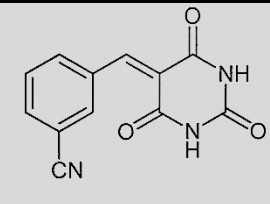
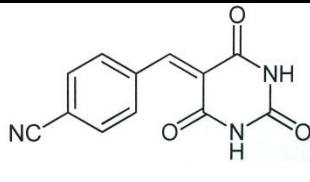
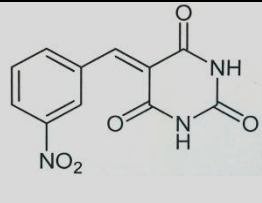
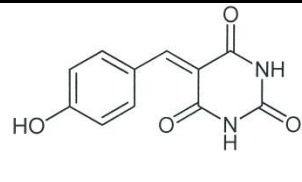
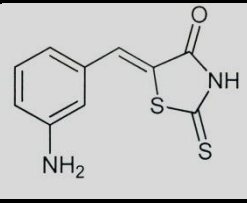
Na podlagi statistično obdelanih rezultatov bomo ocenili učinkovitost izbranih spojin kot antioksidantov ter njihovo antioksidativno delovanje primerjali z antioksidativnim delovanjem butil hidroksitoluena (BHT).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Spojine

V diplomski nalogi smo uporabili 5 spojin, natančneje štiri 5-benziliden barbiturate in en benziliden rodanin (preglednica I), ki so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Spremljali smo kinetiko redukcije z DPPH, določili hitrostne konstante in koncentracije, ki so potrebne za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH (EC<sub>20</sub>).

Preglednica I: Prikaz analiziranih spojin

Spojina	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	Mol. masa (g/mol)	Kemijska struktura
<u>1</u>	3-((2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-iliden)metil)benzoni-tril	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	241,20	
<u>2</u>	4-((2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-iliden)metil)benzoni-tril	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	241,20	
<u>3</u>	5-(3-nitrobenziliden)pirimidi- <i>n</i> -2,4,6(1H,3H,5H)-trion	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	261,19	
<u>4</u>	5-(4-hidroksibenziliden)pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	232,19	
<u>5</u>	(Z)-5-(3-aminobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	236,31	



### 3.1.1 Priprava spojin

a) Za vzorce za spremljanje kinetike redukcije DPPH in določevanje hitrostnih konstant smo pripravili 1,40 mM osnovne raztopine spojin **1** – **5** v 5 mL metanola. Ker so bile spojine **2**, **3** in **4** pri koncentraciji 1,40 mM v metanolu netopne, smo te vzorce pripravili pri koncentraciji 0,700 mM v 10 mL metanola. Koncentracije spojin, ki smo jih potrebovali za merjenje kinetike redukcije DPPH, smo pripravili z redčenjem osnovne raztopine z metanolom (preglednica II).

**Preglednica II:** Prikaz koncentracij analiziranih spojin za merjenje kinetike redukcije DPPH

Vzorec	Koncentracija spojine ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracija analizirane spojine v reakcijski zmesi z DPPH ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracijsko razmerje $c(\text{DPPH}):c(\text{testna spojina})$
1	1400	700	1:10
2	700	350	1:5
3	280	140	1:2
4	140	70	1:1
5	70	35	1:0,5

b) Za vzorce za določitev koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH ( $\text{EC}_{20}$ ), smo pripravili 0,700 mM osnovne raztopine spojin **1** - **5** v 10 mL metanola. Z redčenjem z metanolom smo pripravili ustrezne koncentracije vzorcev (preglednica III).

**Preglednica III:** Prikaz koncentracij analiziranih spojin za določevanje  $\text{EC}_{20}$

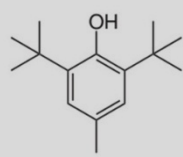
Vzorec	Koncentracija spojine ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracija analizirane spojine v reakcijski zmesi z DPPH ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracijsko razmerje $c(\text{DPPH}):c(\text{testna spojina})$
1	700	350	1:5
2	280	140	1:2
3	186,7	93,3	1:1,33
4	140	70	1:1
5	93,3	46,67	1:0,67

6	70	35	1:0,5
7	46,67	23,33	1:0,33

### 3.1.2 Priprava standarda

Kot standard smo uporabili BHT (*butil hidroksitoluen*), proizvajalca Sigma. Pri sobni temperaturi se nahaja v obliki belih kristalov.

Preglednica IV: Prikaz BHT

Spojina	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	Mol. masa (g/mol)	Kemijska struktura
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol	$C_{15}H_{24}O$	220,36	

a) Pri spremljanju kinetike redukcije DPPH smo za BHT pripravili 0,700 mM osnovno raztopino v 10 mL metanola. Z redčenjem z metanolom smo pripravili ustrezne koncentracije BHT.

Preglednica V: Prikaz koncentracij BHT za merjenje kinetike redukcije DPPH

Vzorec	Koncentracija spojine ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracija testne spojine v reakcijski zmesi z DPPH ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracijsko razmerje $c(\text{DPPH}):c(\text{testna spojina})$
1	700	350	1:5
2	280	140	1:2
3	70	35	1:0,5

b) Za določanje  $EC_{20}$  za BHT smo pripravili 0,700 mM osnovno raztopino BHT v 10 mL metanola. Z redčenjem z metanolom smo pripravili ustrezne koncentracije BHT.

Preglednica VI: Prikaz koncentracij BHT za določevanje  $EC_{20}$

Vzorec	Koncentracija vzorca ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracija v reakcijski zmesi	Koncentracijsko razmerje
--------	--	----------------------------------	--------------------------

		( $\mu\text{M}$ )	c(DPPH):c(vzorec)
1	700	350	1:5
2	280	140	1:2
3	187	93,3	1:1,33
4	140	70	1:1
5	70	35	1:0,5
6	35	17,5	1:25
7	17,5	8,75	1:0,125

### 3.1.3 Kemikalije in reagenti

Preglednica VII: Prikaz kemikalij in reagentov

Ime	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Proizvajalec
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$	394,32	ALDRICH Chemistry
natrijev hidroksid	NaOH	56,11	Merck
metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	32,04	CARLO ERBA Reagents

#### 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH):

Pripravili smo 0,700 mM osnovno raztopino DPPH, tako da smo zatehtali 1,688 mg v 50 mL merilno bučko in dodali približno 40 mL metanola. Raztopino smo sonicirali v ultrazvočni kopeli tako dolgo, dokler se ni raztopil ves DPPH. Z metanolom smo dopolnili merilno bučko do oznake, zamašili bučko in dobro premešali. Raztopino DPPH smo zaščitili pred svetlobo in jo hranili pri temperaturi 2-8°C.

Za pripravo 0,140 mM raztopine DPPH smo v 10 mL penicilinko dodali 1 mL 0,700 mM osnovne raztopine DPPH in 4 mL metanola. Raztopino DPPH koncentracije 0,140 mM smo uporabili pri spremljanju kinetike redukcije DPPH, določevanju hitrostnih konstant in  $\text{EC}_{20}$ .

#### Natrijev hidroksid (NaOH):

Uporabili smo 0,1 mM raztopino NaOH, kot topilo za nastanek soli pri vzorcih s spojinami 2, 3 in 4.

## **Metanol:**

Metanol smo uporabili kot topilo za pripravo raztopin vzorcev, BHT in DPPH.

### **3.1.4 Merilni pripomočki in aparati**

Pri delu smo uporabili naslednje pripomočke:

- polavtomatske pipete BRAND Tranferpette®: 0,5 - 5 mL, Thermo SCIENTIFIC FINNPIPETTE® F2 100 - 1000  $\mu$ L, Eppendorf Research 20 - 200  $\mu$ L,
- nastavke za pipete BRAND Tranferpette®,
- 5 mL penicilinke neoLAB,
- plastične kivete 1,5 mL, semimikro BRAND Tranferpette®,
- mikrotitrne plošče TPP® (96 vdolbinic),
- laboratorijsko steklovino različnih proizvajalcev,
- osebna zaščitna sredstva.

Pri delu smo uporabili naslednje aparate:

- analitsko tehniko AG 245 proizvajalca METTLER TOLEDO,
- ultrazvočno kopalnik Sonis 3 proizvajalca ISKRA Pio d.o.o.,
- UV-Visible spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca Varian,
- čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrid Reader proizvajalca BioTek.

## **3.2 Metode**

### **3.2.1 Izvedba metode kinetike redukcije DPPH in določanja hitrostnih konstant**

Kinetiko redukcije DPPH smo spremljali z UV-Vis spektrofotometrom. Pred izvajanjem kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami smo najprej določili valovno dolžino maksimuma absorpcije raztopine DPPH. V kiveto smo odmerili 900  $\mu$ L 0,140 mM raztopine DPPH in 900  $\mu$ L metanola ter posneli absorpcijski spekter raztopine DPPH z merjenjem absorbanc pri različnih valovnih dolžinah. Maksimum absorpcije se nahaja pri 517 nm, zato smo pri tej valovni dolžini izvajali vse meritve.

Nato smo v plastično kiveto odmerili 900  $\mu$ L metanola in 900  $\mu$ L 0,140 mM raztopine DPPH ter začeli z meritvijo. Absorbanco smo merili 90 minut vsakih 10 sekund. Po spremljanju kinetike redukcije DPPH brez testne spojine, smo v plastično kiveto odmerili 900  $\mu$ L testne spojine ustrezne koncentracije in 900  $\mu$ L 0,140 mM raztopine DPPH, dobro premešali s pipeto in kiveto vstavili v vzorčno mesto v UV-Vis spektrofotometru, počakali

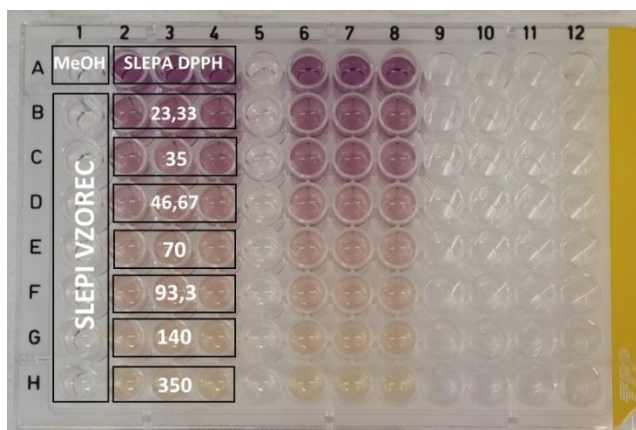
30 sekund in začeli z meritvijo. Absorbanco smo merili 90 minut vsake 10 sekund. V času spremljanja kinetike redukcije DPPH smo kiveto pokrili z teflonskim pokrovčkom, da ni prišlo do izhlapevanja metanola. Meritev je potekala pri sobni temperaturi.

### 3.2.2 Izvedba metode določanja EC<sub>20</sub>

Metodo smo izvedli s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic. Na mikrotitrsko ploščo (slika 4) z 96 vdolbinicami smo v triplicatih nanесли najprej raztopine vzorcev in nato 0,140 mM raztopino DPPH. Inkubirali smo 90 minut v temi pri sobni temperaturi. Po 90 minutah smo vstavili mikrotitrsko ploščo v čitalec mikrotitrskih ploščic in opravili meritev s programom GEN5. Merili smo pri valovni dolžini 517 nm.

Preglednica VIII: Prikaz reakcijskih zmesi za določevanje EC<sub>20</sub>

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



Slika 4: Mikrotitrsko plošča po končani reakciji med DPPH in različnimi koncentracijami dveh testiranih spojin

### 3.2.3 Obdelava podatkov za določanje hitrostnih konstant in EC<sub>20</sub>

- a) Za vsako analizirano spojino smo iz kinetike redukcije DPPH pri koncentraciji spojin 140 μM določili hitrostne konstante po enačbi 1.

$$\ln \left( \frac{1 - \text{Abs}_f / \text{Abs}}{1 - \text{Abs}_f / \text{Abs}_0} \right) = -k \frac{\text{Abs}_f}{\varepsilon} t, \text{ (enačba 1 (27))}$$

kjer je:

Abs<sub>f</sub>...absorbanca ob koncu meritve,

k...hitrostna konstanta,

Abs<sub>0</sub>...absorbanca ob času 0 minut,

ε...molarni absorpcijski koeficient,

Abs...absorbanca ob danem času,

t...čas.

Molarni absorpcijski koeficient (ε) smo izračunali po enačbi 2.

$$\varepsilon = \frac{A}{b \cdot c}, \text{ (enačba 2)}$$

kjer je:

A...absorbanca,

c...koncentracija.

b...dolžina poti,

b) Pri določanju EC<sub>20</sub> smo za vsako analizirano spojino s programom Excell (Microsoft Office 2010) narisali graf, izračunali enačbo regresijske premice, EC<sub>20</sub> ter standardno napako.

- Regresijska premica

Linearno regresijsko premico smo izračunali po enačbi 3.

$$y = k \cdot x + n, \text{ (enačba 3)}$$

kjer je:

y...absorbanca,

x...koncentracija,

k...naklon regresijske premice,

n...odmik regresijske premice na ordinati.

- Standardna napaka

Standardna napaka (SN) je mera za obseg napake pri napovedi y-a za vsak x (28).

Za izračun standardne napake smo uporabili funkcijo STEXY (enačba 4) v programu Excel (Microsoft Office 2010).

$$SN^2 = \frac{1}{n-2} \left[ \sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right], \text{ (enačba 4 (28))}$$

kjer je:

n...velikost vzorca,

y...matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk,

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

x...matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk.

$\bar{x}$ ...srednja vrednost  $x$ ,

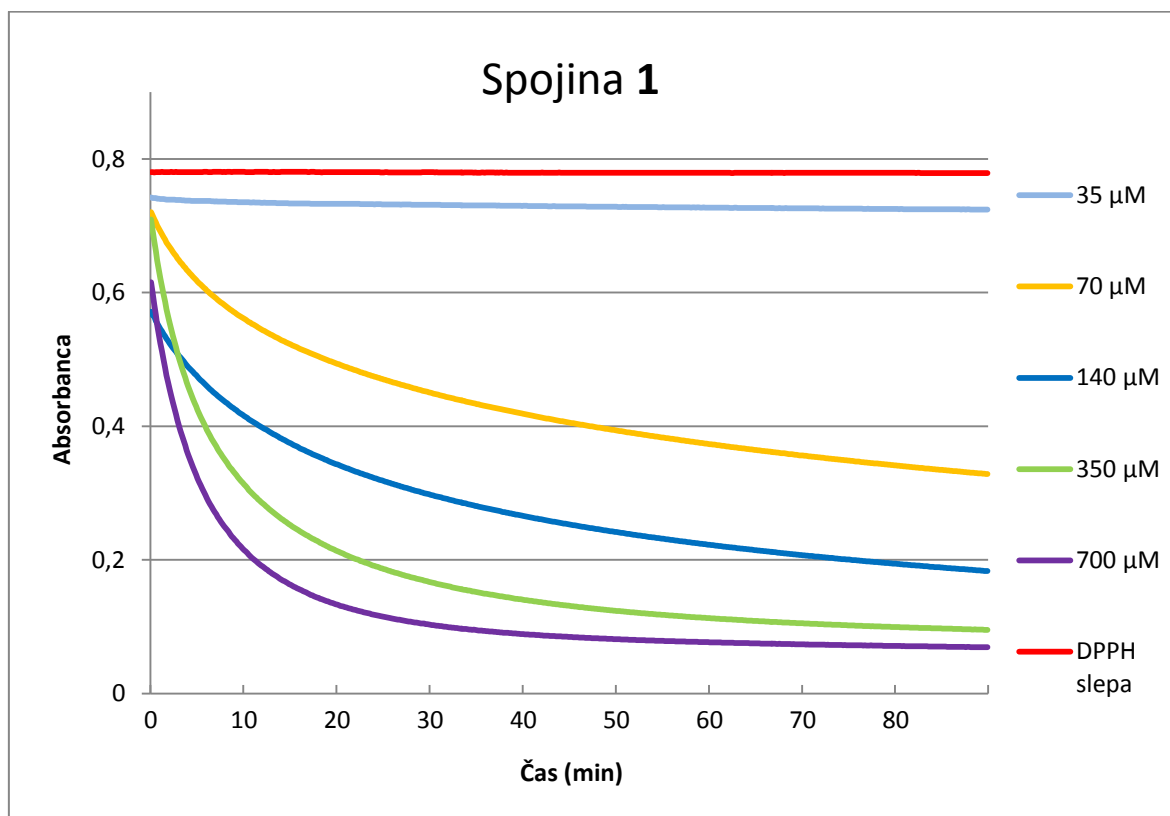
- $EC_{20}$

Iz enačbe regresijske premice smo izračunali koncentracijo  $x$ , ki je potrebna za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH ( $EC_{20}$ ). To koncentracijo smo podali kot  $x \pm$  standardna napaka(SN).

## 4 REZULTATI

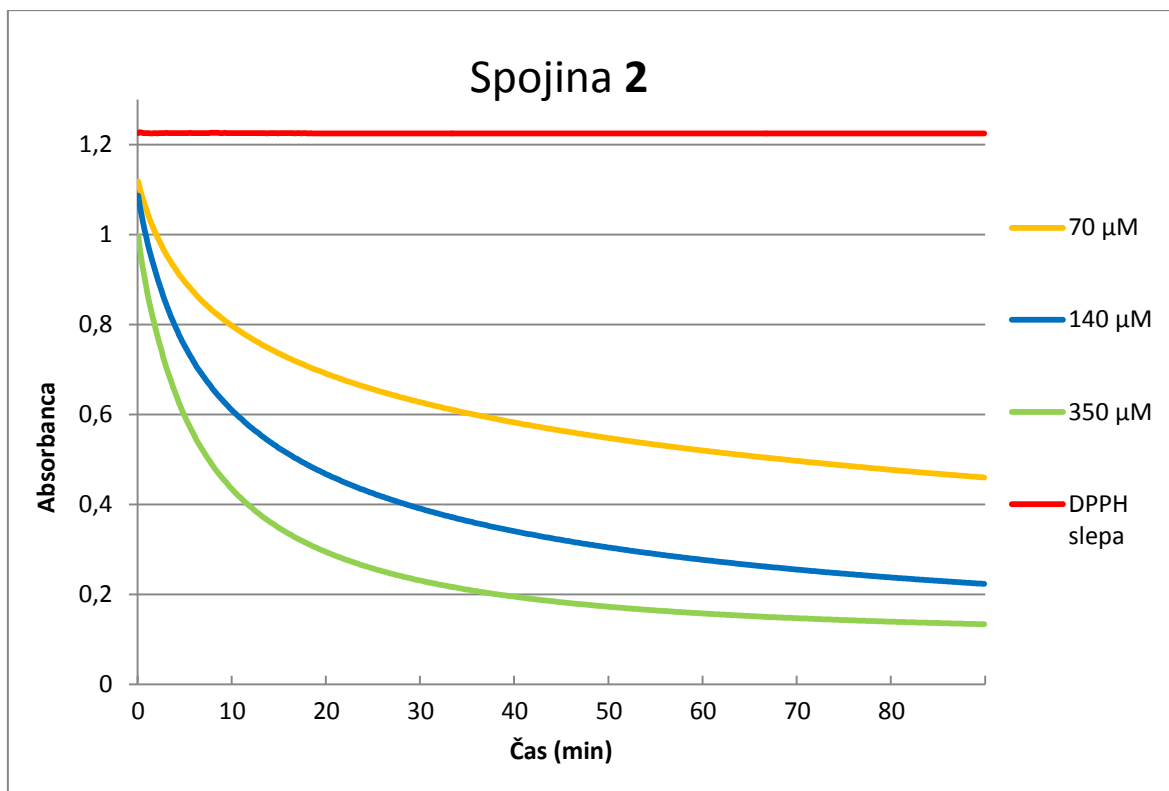
V diplomsko nalogo smo vključili 5 spojin sintetiziranih na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Spremljali smo kinetiko redukcije DPPH pri različnih koncentracijah testnih spojin. Določili smo hitrostne konstante pri koncentraciji spojin 140  $\mu\text{M}$ . Pri določevanju  $\text{EC}_{20}$  smo za vsako spojino uporabili 7 koncentracij ter eno slepo meritev DPPH.

### 4.1 Kinetika redukcije DPPH in kvantitativno določanje hitrostnih konstant

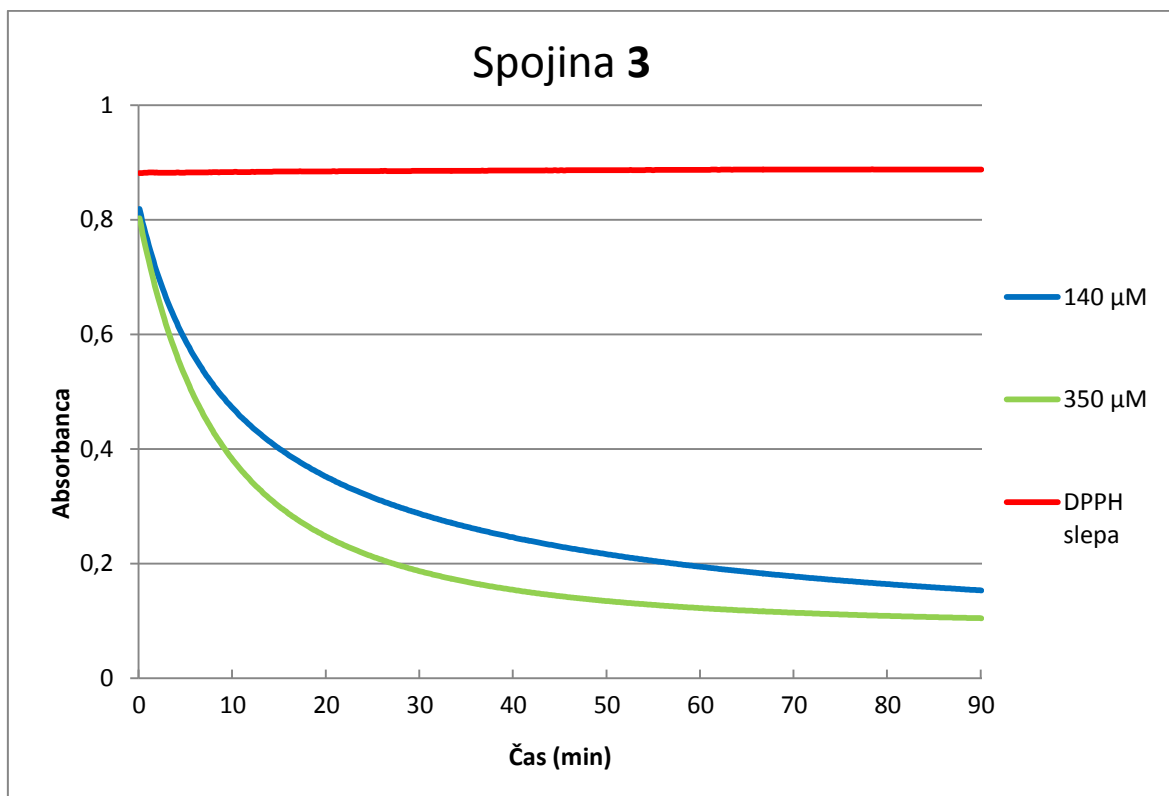


Graf 1: Kinetika redukcije DPPH s spojino 1 pri različnih koncentracijah

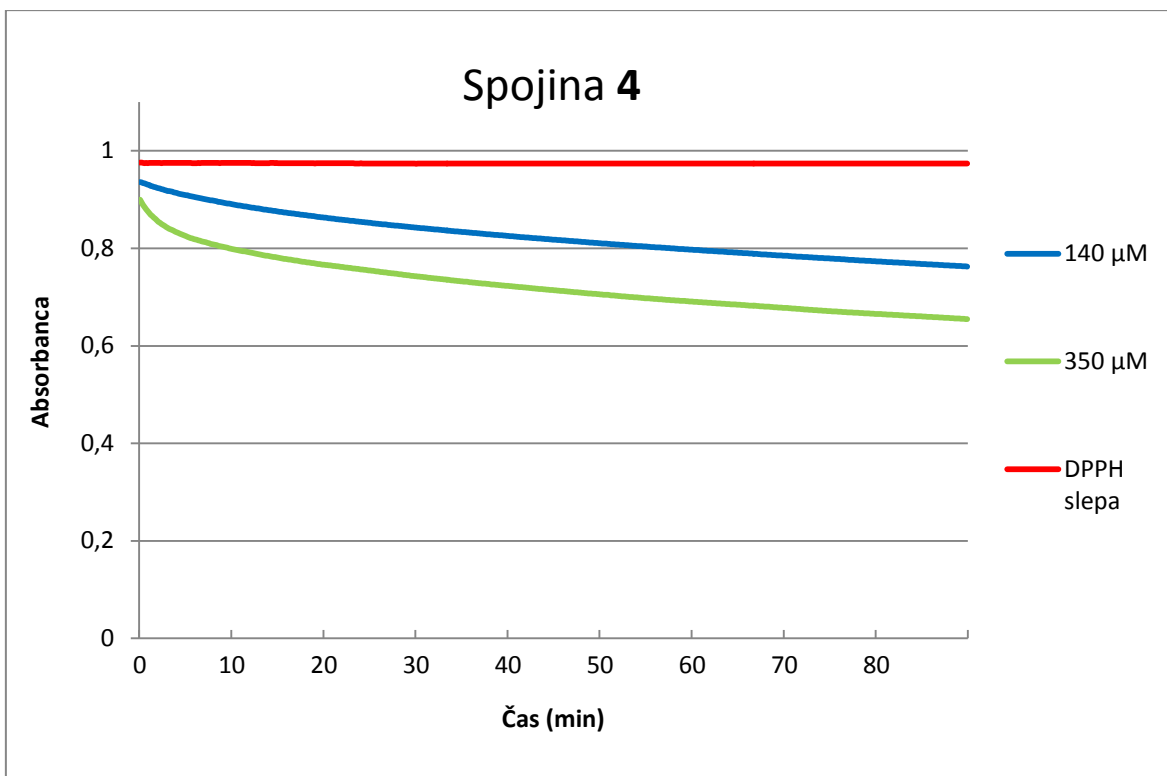




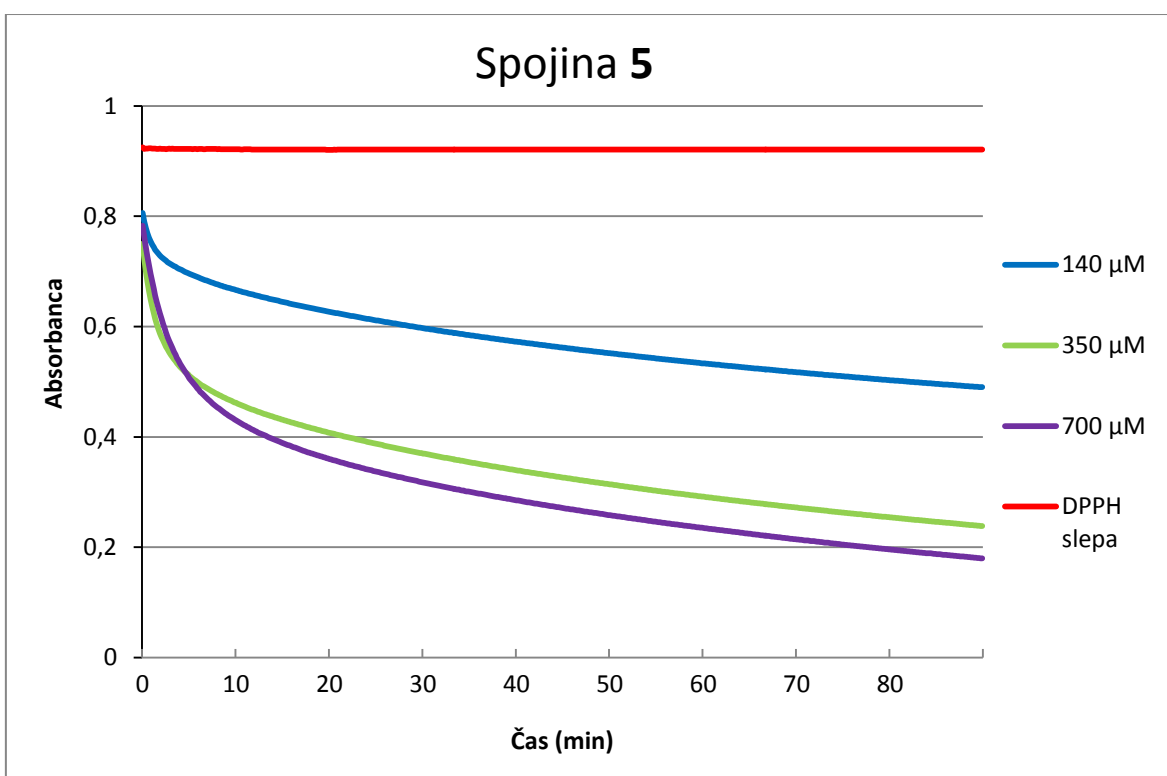
**Graf 2:** Kinetika redukcije DPPH s spojino **2** pri različnih koncentracijah



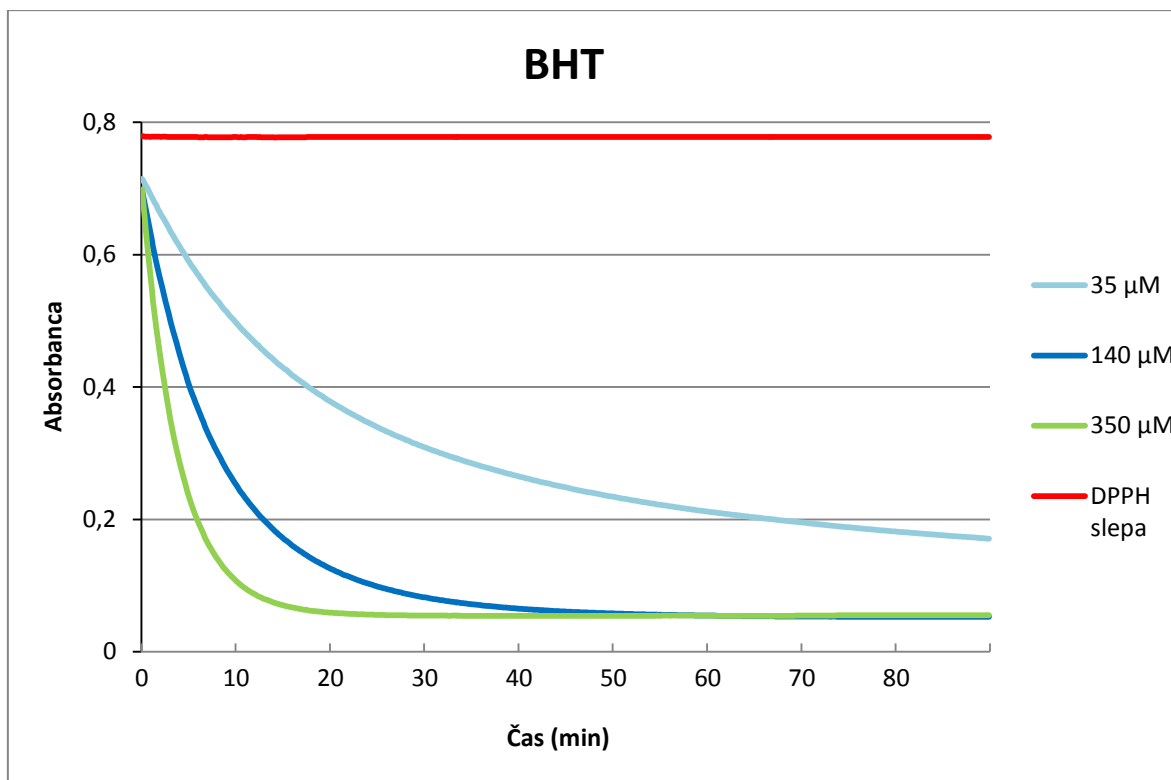
**Graf 3:** Kinetika redukcije DPPH s spojino **3** pri različnih koncentracijah



**Graf 4:** Kinetika redukcije DPPH s spojino 4 pri različnih koncentracijah



**Graf 5:** Kinetika redukcije DPPH s spojino 5 pri različnih koncentracijah

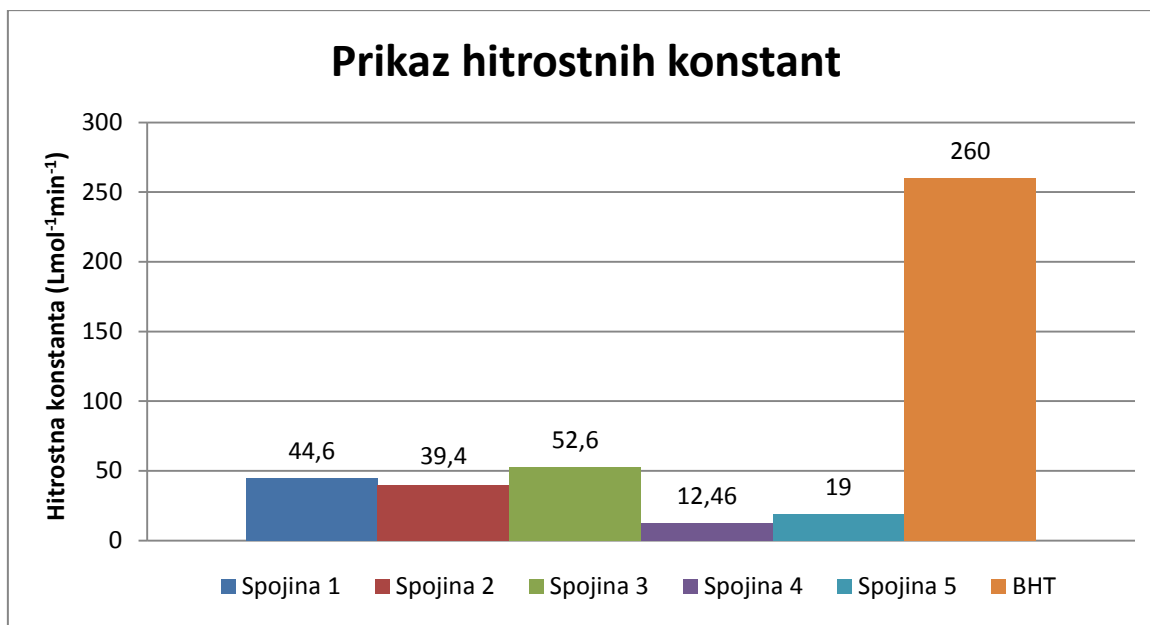


Graf 6: Kinetika redukcije DPPH z BHT pri različnih koncentracijah

Pri kvantitativnem določanju hitrostnih konstant smo uporabili molarni absorpcijski koeficient DPPH izračunan po enačbi 2:  $\epsilon = 1,32 \cdot 10^4 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Preglednica IIX: Prikaz hitrostnih konstant spojin pri koncentraciji 140  $\mu\text{M}$

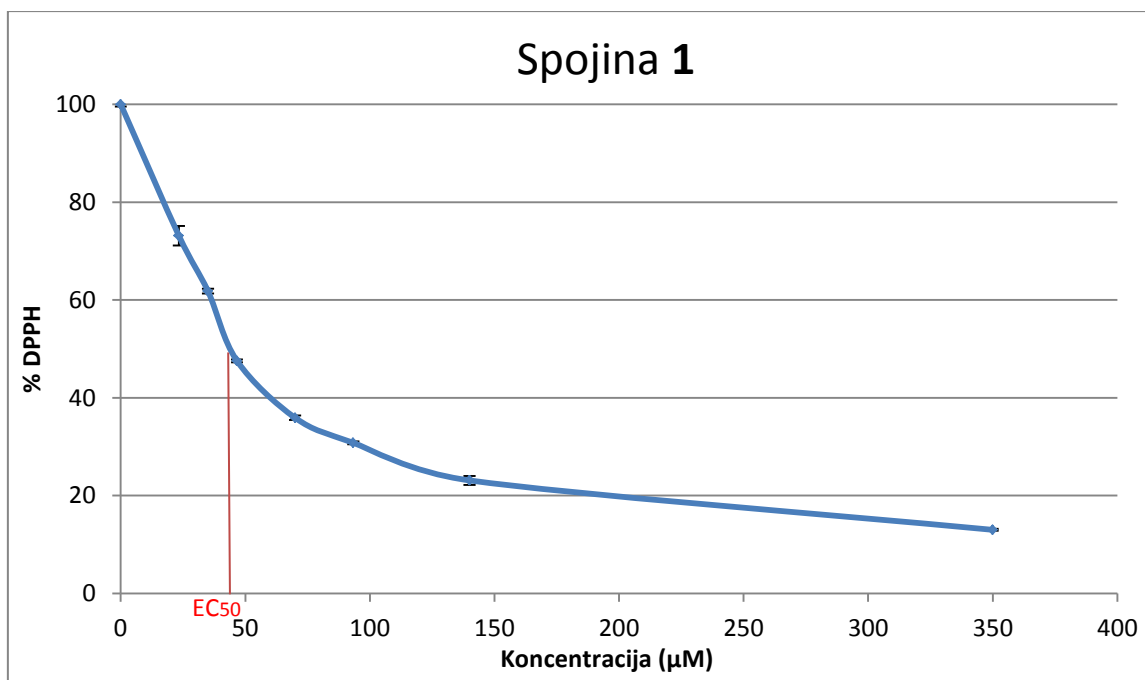
Spojina	Spojina <u>1</u>	Spojina <u>2</u>	Spojina <u>3</u>	Spojina <u>4</u>	Spojina <u>5</u>	BHT
Hitrostna konstanta $\text{Lmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	44,6	39,4	52,6	12,46	19,0	260



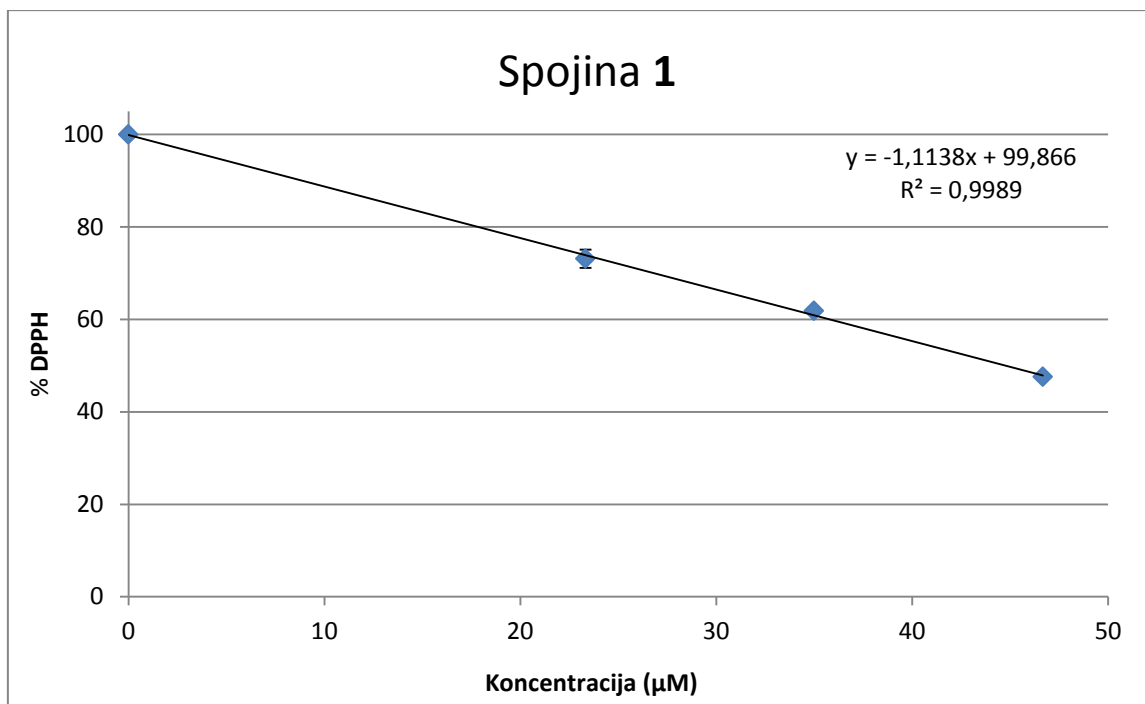
Graf 7: Grafični prikaz hitrostnih konstant

#### 4.2 Kvantitativno določanje EC<sub>20</sub>

Pri kvantitativnem določanju koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH, smo pri statistični obravnavi podatkov upoštevali le prve štiri najnižje koncentracije spojin zaradi nelinearnosti absorbance in koncentracij vzorcev. EC<sub>50</sub> (graf 8, 10, 12 in 18) predstavlja koncentracijo spojin, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH.



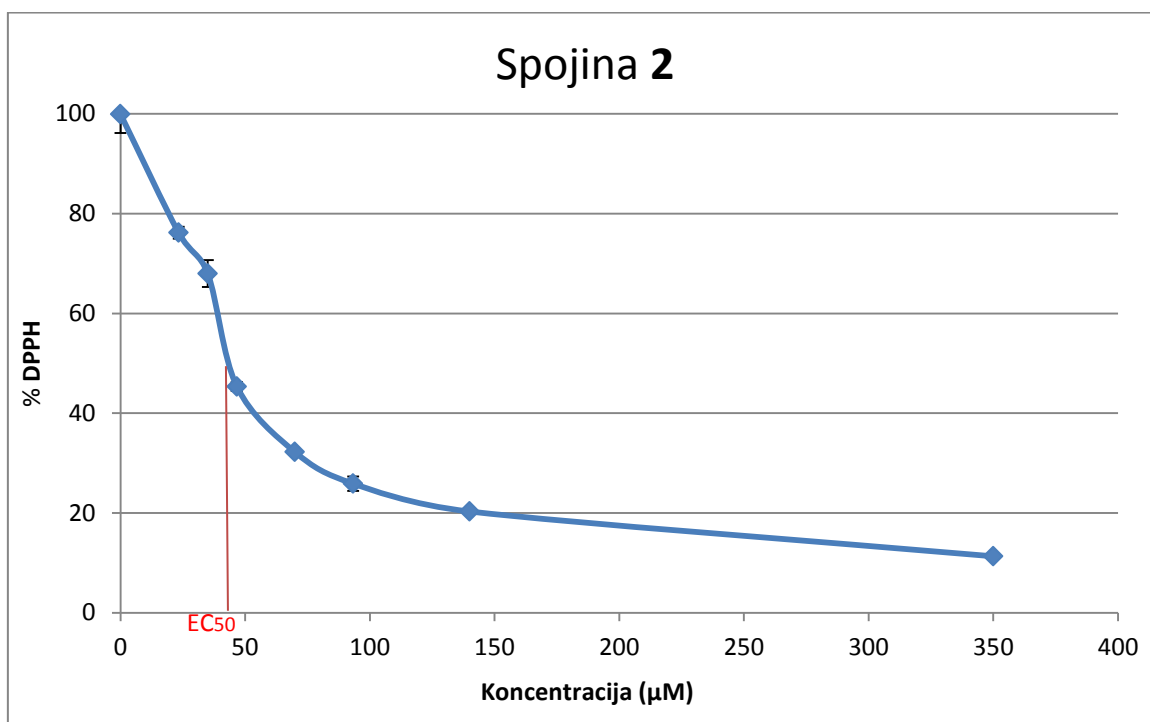
Graf 8: Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH (EC<sub>50</sub>) pri različnih koncentracijah spojine 1



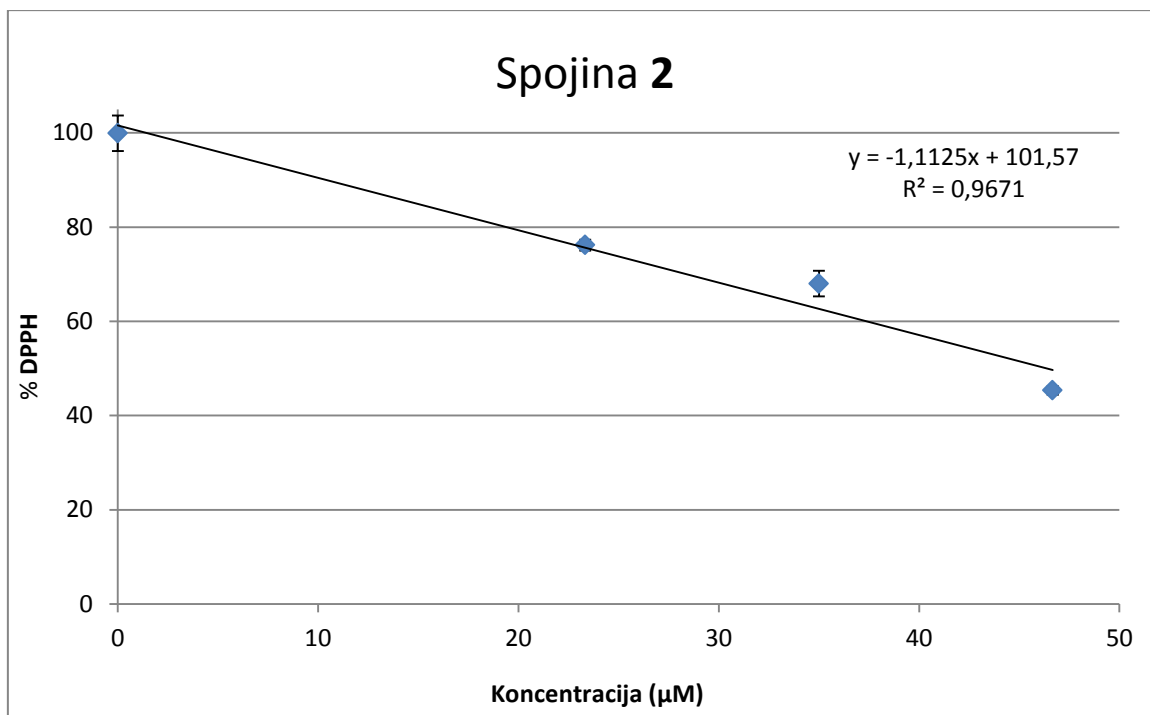
**Graf 9:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH ( $EC_{20}$ ) pri spojini 1 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = -1,1138 x + 99,866$ .

Vrednost  $EC_{20}$  za spojino 1 je  $17,8 \pm 0,791 \mu\text{M}$ .



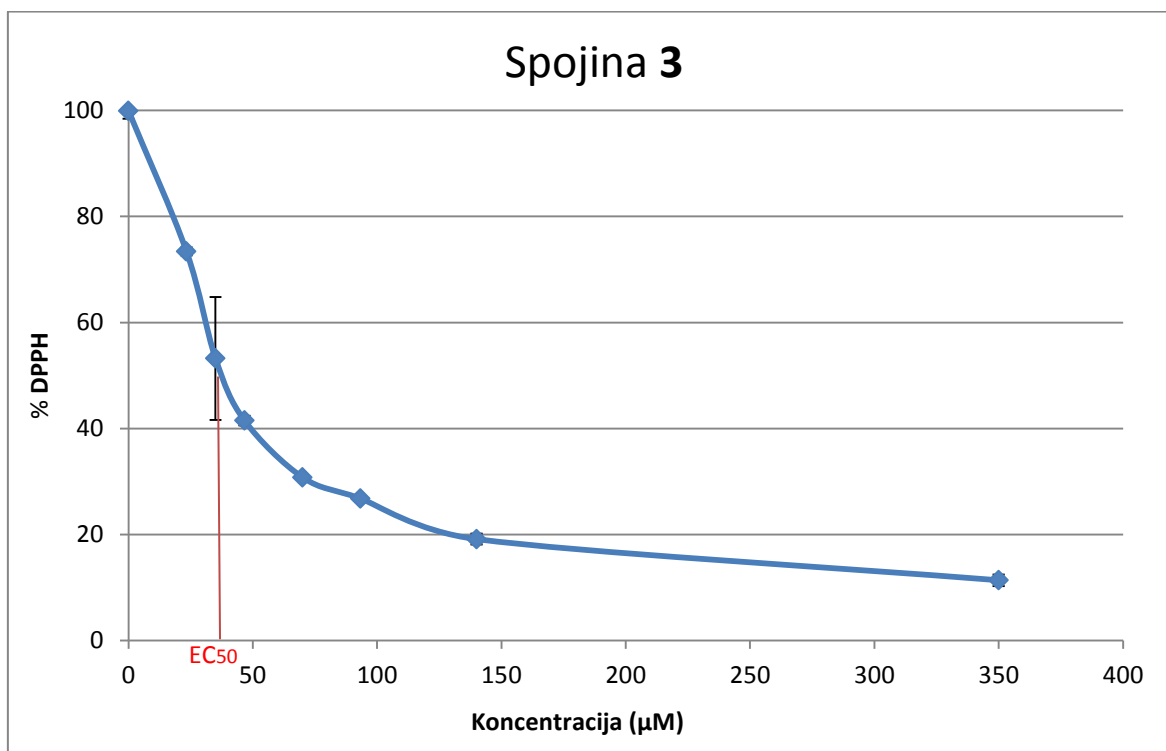
**Graf 10:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH ( $EC_{50}$ ) pri različnih koncentracijah spojine 2



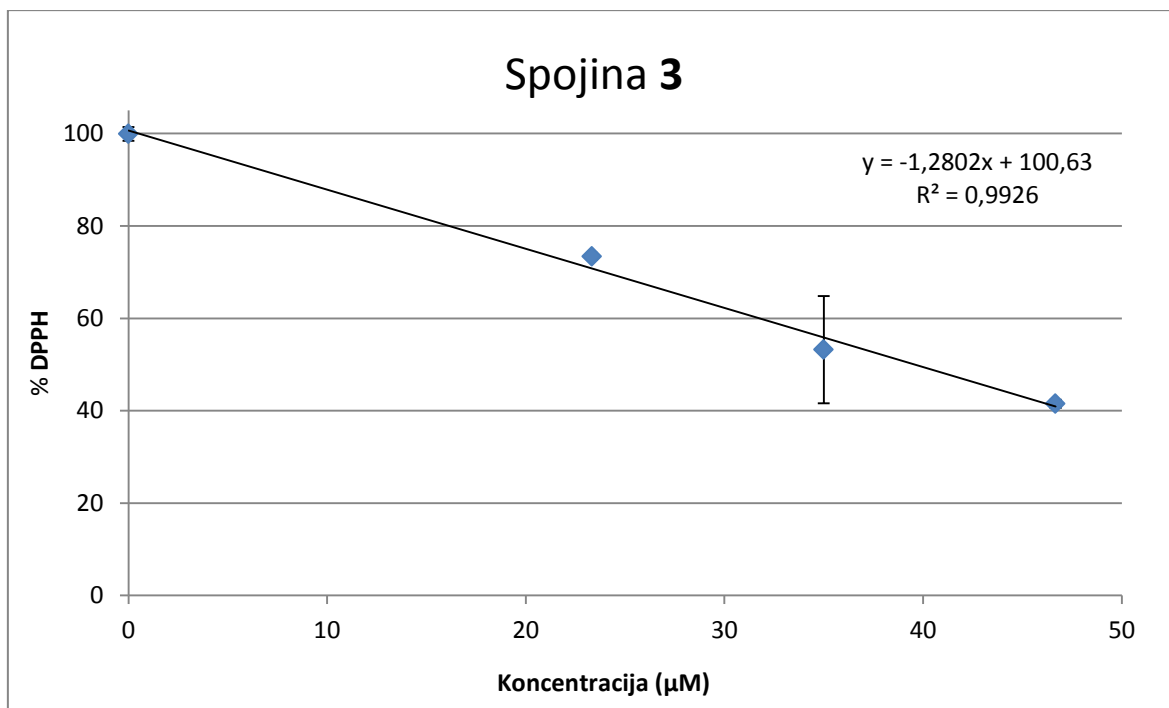
**Graf 11:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH ( $EC_{20}$ ) pri spojini 2 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = -1,1125 x + 101,57$ .

Vrednost  $EC_{20}$  za spojino 2 je  $19,4 \pm 4,50 \mu M$ .



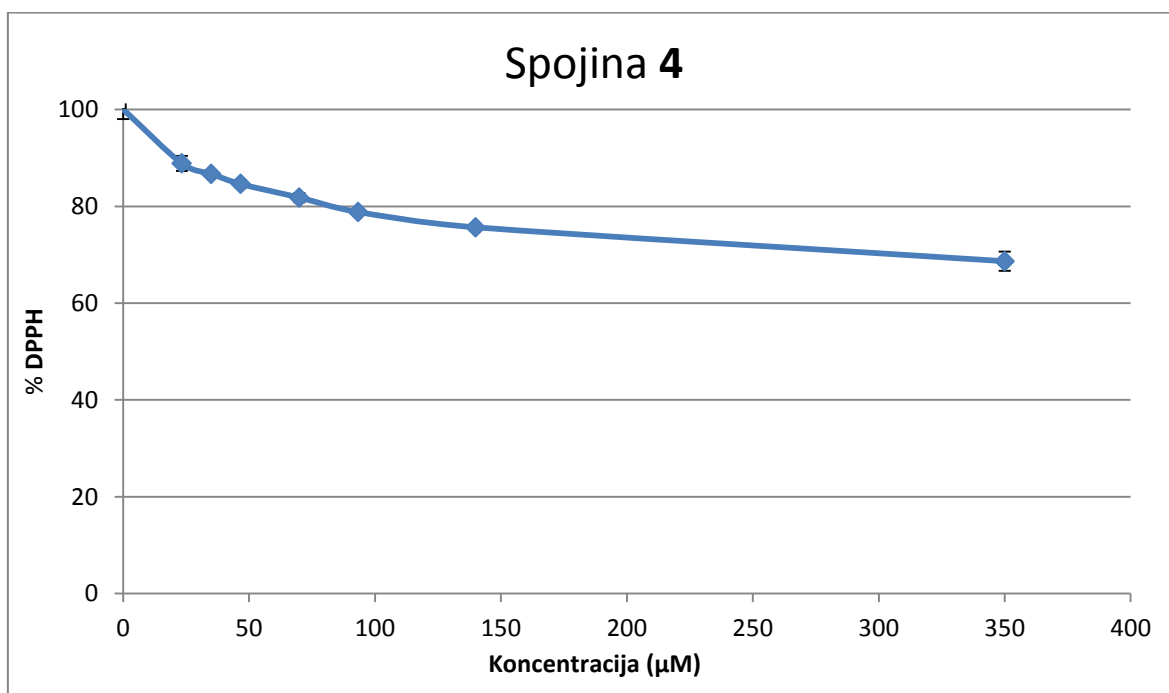
**Graf 12:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH ( $EC_{50}$ ) pri različnih koncentracijah spojine 3



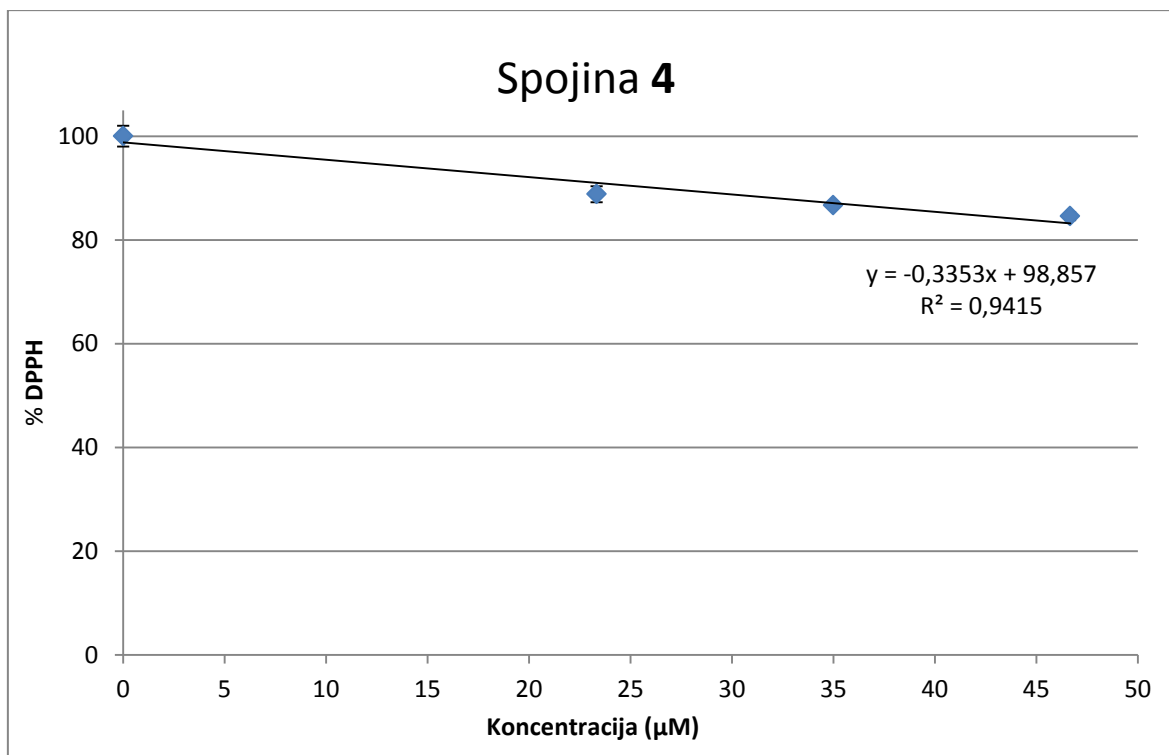
**Graf 13:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH ( $EC_{20}$ ) pri spojini **3** ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = -1,2802 x + 100,63$ .

Vrednost  $EC_{20}$  za spojino **3** je  $16,1 \pm 2,11 \mu M$ .



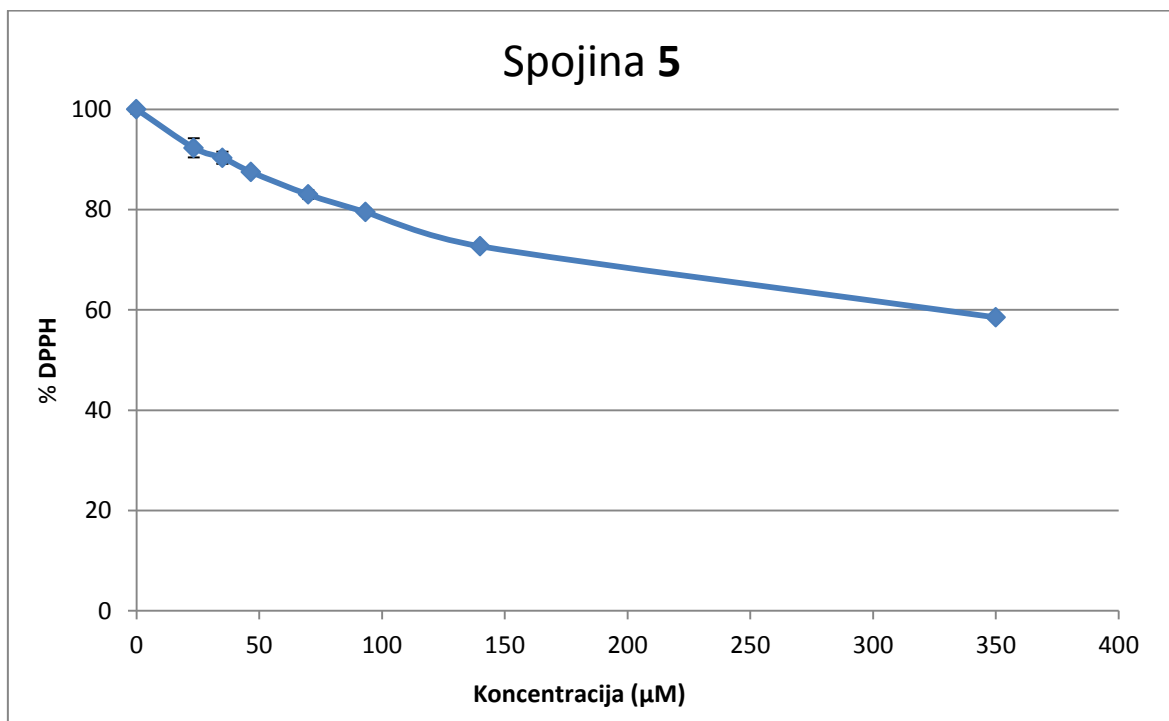
**Graf 14:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH ( $EC_{20}$ ) pri različnih koncentracijah spojine **4**



**Graf 15:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC<sub>20</sub>) pri spojini **4** ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij

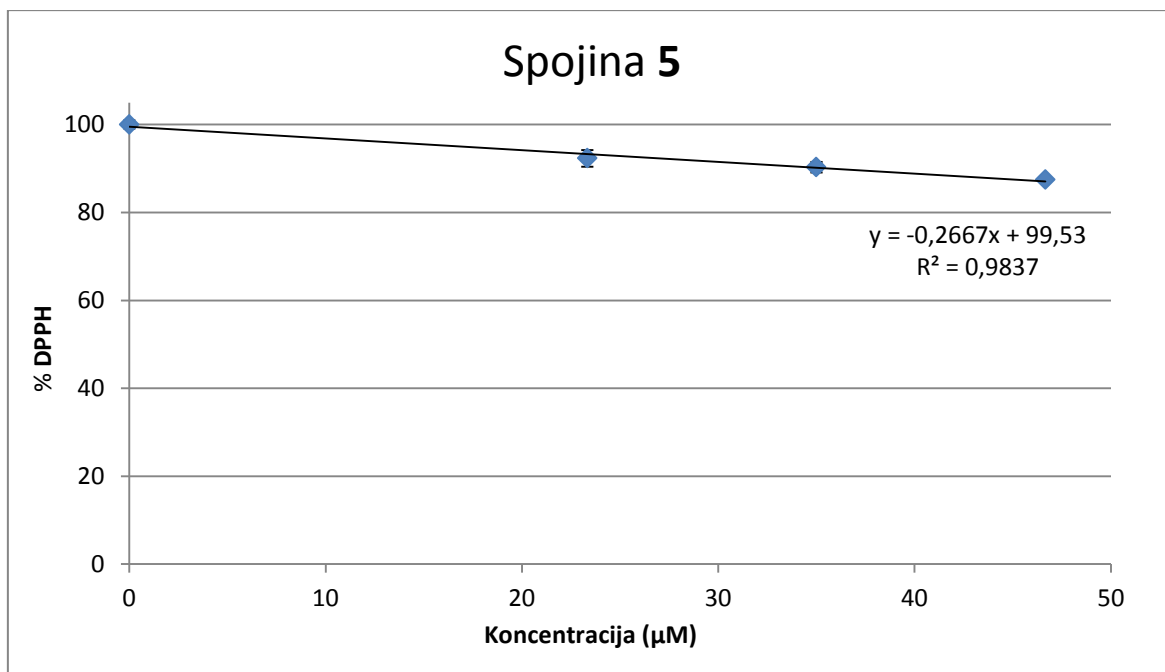
Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = -0,3353 x + 98,857$ .

Vrednost EC<sub>20</sub> za spojino **4** je  $56,2 \pm 6,08 \mu\text{M}$ .



**Graf 16:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH (EC<sub>20</sub>) pri različnih koncentracijah spojine **5**

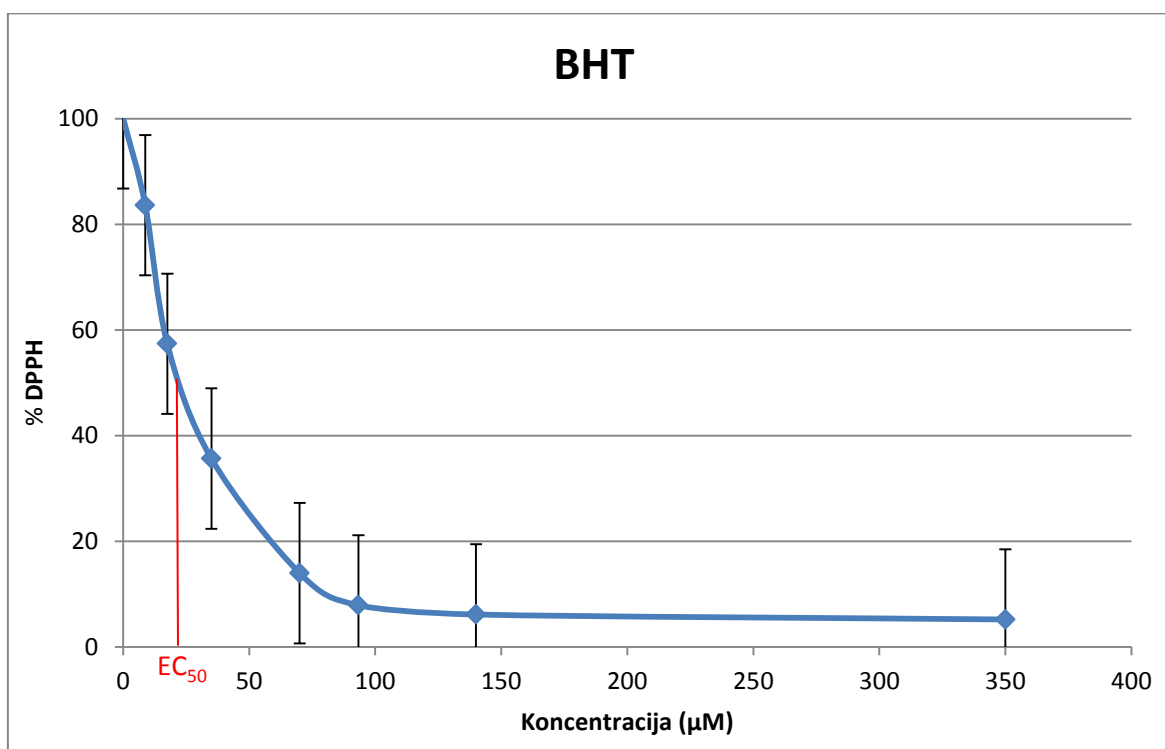




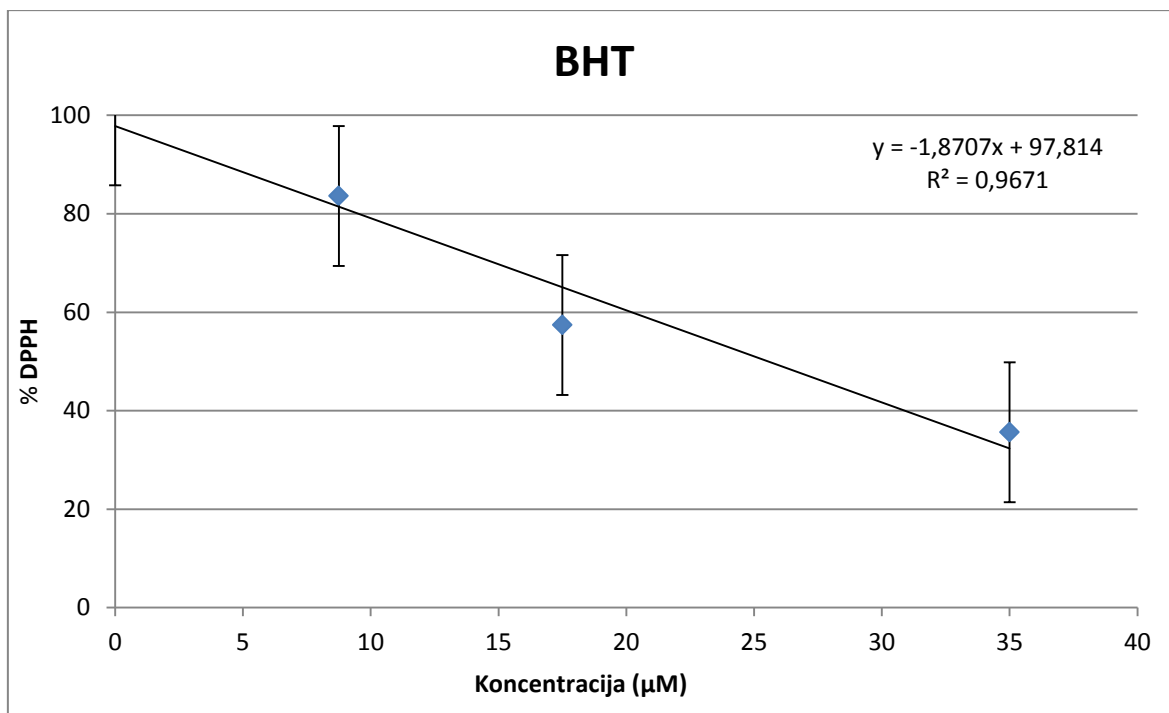
**Graf 17:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH ( $EC_{20}$ ) pri spojini 5 ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = -0,2667 x + 99,53$ .

Vrednost  $EC_{20}$  za spojino 5 je  $73,2 \pm 3,14 \mu\text{M}$ .



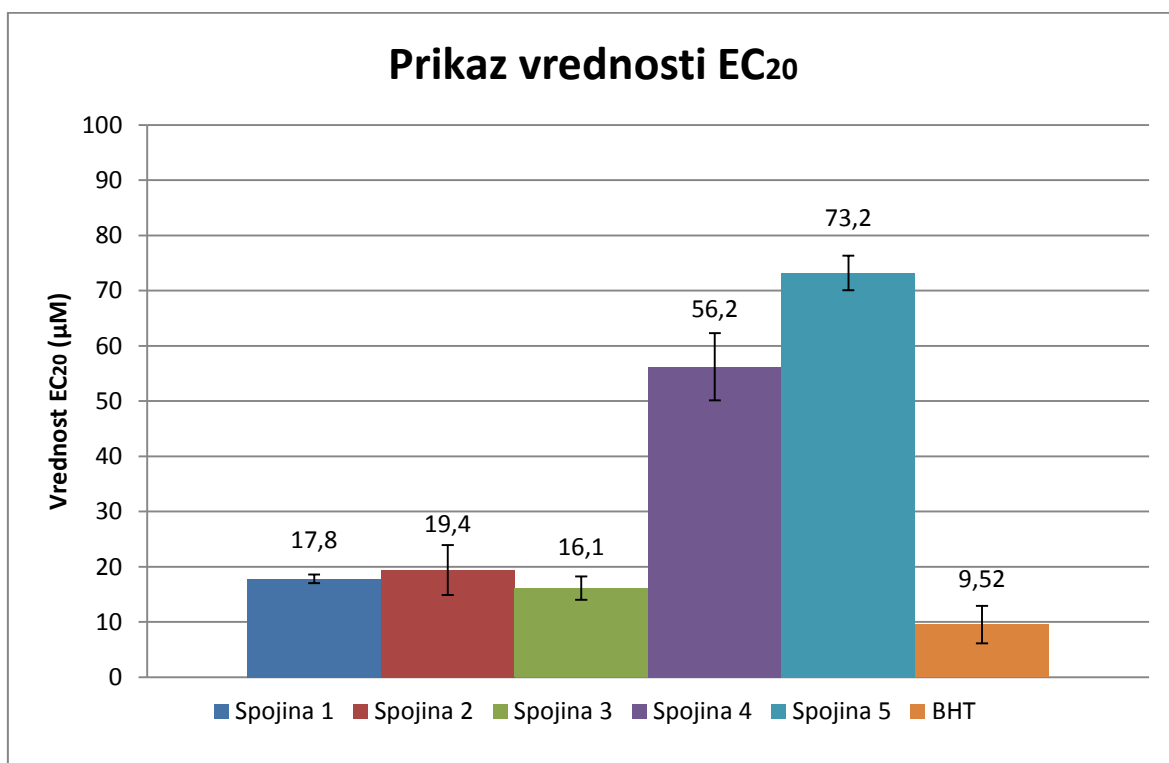
**Graf 18:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 50% DPPH ( $EC_{50}$ ) pri različnih koncentracijah BHT



**Graf 19:** Graf določanja koncentracije, ki je potrebna za redukcijo 20% DPPH ( $EC_{20}$ ) pri BHT ob upoštevanju le prvih štirih najnižjih koncentracij

Izračun enačbe regresijske premice je:  $y = -1,8707 x + 97,814$ .

Vrednost  $EC_{20}$  za spojino BHT je  $9,52 \pm 3,38 \mu M$ .



**Graf 20:** Grafični prikaz vrednosti  $EC_{20}$  spojin 1 – 5 in BHT

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 Kinetika redukcije DPPH in kvantitativno določanje hitrostnih konstant

Pri pripravi vzorcev, standarda in DPPH smo za spremljanje kinetike redukcije DPPH, določevanje hitrostnih konstant in  $EC_{20}$  kot topilo izbrali metanol. Uporaba metanola je v literaturi pogosta, saj ne vpliva na reakcijsko zmes, DPPH je v njem dobro topen (15, 18, 29).

Raztopino DPPH smo tesno zamašili, zaščitili pred svetlobo in jo hranili pri temperaturi 2-8°C v času, ko jo nismo uporabljali, saj na absorbanco DPPH vplivata kisik in svetloba. V študiji Ozcelik et al. leta 2003 so ugotovili, da zaradi izpostavljenosti svetlobi absorbanca DPPH v metanolu pade za 20% v 120 minutah. Na DPPH vpliva tudi kisik, ki se v atmosferi nahaja v tripletnem stanju. Tripletni kisik reagira direktno z DPPH pod vplivom svetlobe, kar povzroči padec absorbance (29).

Pri spremljanju kinetike redukcije DPPH, določevanju hitrostnih konstant in  $EC_{20}$  smo kot standard uporabili sintetični antioksidant butil hidroksitoluen (BHT). Nekateri antioksidanti, ki delujejo kot lovilci radikalov, lahko znižajo absorbanco DPPH, vendar ni nujno da *in vivo* učinkovito donirajo vodik, zato ne delujejo kot antioksidanti. Nekateri antioksidanti pa *in vitro* delujejo veliko slabše kot *in vivo*, zato je priporočljivo, da se pri metodi z DPPH antioksidativno delovanje spojin primerja z uporabo dobro znanih antioksidantov, kot je npr. BHT (29).

Pred vsakim spremljanjem kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami smo spremljali še stabilnost DPPH brez testne spojine; absorbanca je morala biti konstantna ves čas meritve. S tem smo namreč preverili, da DPPH tekom meritve ne reagira zaradi vpliva svetlobe ali kisika in da bo padec absorbance pri spremljanju kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami posledica le testnih spojin.

Pri spremljanju kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami smo raztopino DPPH dodali v plastično kiveto s testno spojino, počakali 30 sekund in nato začeli z meritvijo. S tem smo vsako meritev začeli ob enakem času, saj je padec absorbance v začetnih sekundah največji, zaradi eksponentnega odnosa med absorbanco in časom.

Pri delu smo ugotovili, da so spojine **2**, **3** in **4** pri koncentraciji 700  $\mu\text{M}$  (koncentracija spojin v reakcijski zmesi) netopne. Zato smo dodali 10  $\mu\text{L}$  0,1 mM raztopino NaOH kot topilo za nastanek soli. Vendar smo pri spremljanju kinetike redukcije DPPH s spojino **4** z dodanim NaOH ugotovili, da NaOH ustvarja šum, najverjetneje zaradi sipanja svetlobe na

delcih (spojina se ne raztopi popolnoma). Zato smo osnovne raztopine spojin **2**, **3** in **4** pripravili pri najvišji koncentraciji 350  $\mu\text{M}$ .

Kinetiko redukcije DPPH s spojino **1** smo spremljali pri koncentracijah 700  $\mu\text{M}$ , 350  $\mu\text{M}$ , 140  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$  in 35  $\mu\text{M}$  (koncentracije spojin v reakcijski zmesi) (graf 1). Krivulji kinetike redukcije DPPH pri koncentraciji 700  $\mu\text{M}$  in 350  $\mu\text{M}$  sta imeli v začetnih minutah strm padec, vendar še vseeno v 90 minutah nista dosegli platoja. Naslednji dve koncentraciji (140 in 70  $\mu\text{M}$ ) sta imeli bolj postopen, počasen padec absorbance. Absorbanca pri koncentraciji 35  $\mu\text{M}$  je bila minimalna, saj je iz 0,742 v 90 minutah padla le na 0,724.

Pri spojini **2** smo imeli težave s topnostjo. Kljub segrevanju ter soniciranju spojine v ultrazvočni kopeli, je bila spojina **2** pri koncentraciji 700  $\mu\text{M}$  netopna. Zato smo kinetiko redukcije DPPH spremljali pri koncentracijah 350  $\mu\text{M}$ , 140  $\mu\text{M}$  ter 70  $\mu\text{M}$  (graf 2). Spojina **1** in spojina **2** se med seboj razlikujeta samo v položaju ciano (-CN) skupine. Pri spojini **1** je bila krivulja kinetike redukcije DPPH pri koncentraciji 35  $\mu\text{M}$  zelo počasna, zato spojino **2**, ki je podobna spojini **1**, nismo pripravili in spremljali pri koncentraciji 35  $\mu\text{M}$ . Krivulje kinetike redukcije DPPH s spojino **2** koncentracij 350  $\mu\text{M}$ , 140  $\mu\text{M}$  in 70  $\mu\text{M}$  so bile podobne istim koncentracijam spojine **1**, kar smo tudi pričakovali.

Pri spojini **3** smo imeli težave s topnostjo, zato smo kinetiko redukcije DPPH spremljali pri koncentraciji 350  $\mu\text{M}$ , ter pri koncentraciji 140  $\mu\text{M}$  (graf 3). Tudi ta spojina je imela pri istih koncentracijah podobni krivulji kinetike redukcije kot prvi dve spojini.

Spojino **4**, pri kateri smo prav tako imeli težave s topnostjo, smo spremljali pri koncentracijah 350  $\mu\text{M}$  in 140  $\mu\text{M}$  (graf 4). Krivulja kinetike redukcije se je že pri koncentraciji 350  $\mu\text{M}$  počasi zmanjševala, naklon krivulje je bil v primerjavi s spojinami **1**, **2** in **3** s koncentracijami 350  $\mu\text{M}$  veliko manjši. Krivulja pri koncentraciji 140  $\mu\text{M}$  spojine **4** se je v 90 minutah postopoma in zelo počasi zmanjševala, zato redukcije pri nižjih koncentracij nismo spremljali.

Kinetiko redukcije DPPH s spojino **5** smo spremljali pri koncentracijah 700  $\mu\text{M}$ , 350  $\mu\text{M}$  ter 140  $\mu\text{M}$  (graf 5). Krivulja kinetike redukcije DPPH s spojino **5** pri koncentraciji 700  $\mu\text{M}$  se je zmanjševala veliko počasneje in z manjšim naklonom kot krivulja spojine **1** pri isti koncentraciji. Tudi padca krivulj pri koncentracijah 350  $\mu\text{M}$  in 140  $\mu\text{M}$  pri spojini **5** sta bila veliko manjša od krivulj istih koncentracij pri spojinah **1**, **2** in **3**.

Kinetiko redukcije DPPH z BHT smo spremljali pri koncentracijah 350  $\mu\text{M}$ , 140  $\mu\text{M}$  ter 35  $\mu\text{M}$  (graf 6). Krivulja kinetike redukcije pri koncentraciji 350  $\mu\text{M}$  je bila izredno strma, po približno 20 minutah je dosegla plato, saj je reakcija potekla do konca, prišlo je do

vzpostavitev dinamičnega ravnotežja. Krivulja BHT pri koncentraciji 140  $\mu\text{M}$  je po približno 53 minutah dosegla plato.

Iz vseh grafov 1 - 6 je razvidno, da je naklon krivulj odvisen od koncentracij vzorcev. Višja kot je koncentracija vzorca, bolj strm je naklon krivulje, hitrejša je reakcija spojine z DPPH. Hitrejša kot je reakcija spojine z DPPH, boljše antioksidativno delovanje ima spojina. Zato lahko sklepamo, da BHT reagira hitreje kot spojine 1 – 5. Najpočasneje z DPPH reagirata spojini 4 in 5, saj so tudi pri višjih koncentracijah nakloni teh dveh spojin majhni.

Antioksidanti, ki za doseg platoja oziroma do vzpostavitev dinamičnega ravnotežja potrebujejo manj kot 30 minut, uvrščamo med spojine s počasno reakcijsko kinetiko. Antioksidanti, ki potrebujejo za doseg platoja od 30 minut do 60 minut, imajo srednjo hitro reakcijsko kinetiko, tisti, ki potrebujejo za doseg platoja dlje kot 60 minut, pa počasno reakcijsko kinetiko (18). Krivulji kinetike redukcije DPPH z BHT sta pri koncentracijah 350  $\mu\text{M}$  in 140  $\mu\text{M}$  dosegli plato po približno 20 in 53 minutah, zato bi BHT pri koncentraciji 350  $\mu\text{M}$  opredelili kot antioksidant s hitro reakcijsko kinetiko, pri koncentraciji 140  $\mu\text{M}$  pa antioksidant s srednje hitro reakcijsko kinetiko (graf 6). Pri nižji koncentraciji, 35  $\mu\text{M}$  pa bi BHT opredelili kot antioksidant s počasno reakcijsko kinetiko. Glede na to, da ima BHT zelo dobro antioksidativno delovanje *in vivo*, smo pričakovali, da bo imel tudi pri nižjih koncentracijah dobro antioksidativno delovanje. Vendar tudi v študiji Mishra et al. leta 2010 BHT pri nižjih koncentracijah (10 –20  $\mu\text{M}$ ) ni dosegel platoja v 120 minutah, zato so ga opredelili kot antioksidant s počasno reakcijsko kinetiko. V študiji Brand-Williams et al. leta 1995 so BHT ravno tako opredelili kot antioksidant s počasno reakcijsko kinetiko, saj je plato dosegel šele po 6 urah (18).

Pri vseh izmerjenih koncentracijah spojin 1 – 5 so bili v času 90 minut opaženi padci, nobena od koncentracij spojin 1 - 5 ni v tem času dosegla platoja (grafi 1 – 5). Zato lahko spojine 1 – 5 pri vseh izmerjenih koncentracijah opredelimo kot antioksidante s počasno reakcijsko kinetiko.

Hitrostne konstante redukcije DPPH smo določili pri koncentraciji analiziranih spojin 140  $\mu\text{M}$  (preglednica IX). Večja kot je hitrostna konstanta, hitrejša je reakcija spojine z DPPH. Na podlagi hitrostnih konstant bi analizirane spojine lahko razvrstili od spojine z najhitrejšim antioksidativnim delovanjem (najvišja hitrostna konstanta) do spojine z najpočasnejšim antioksidativnim delovanjem (najnižja hitrostna konstanta):

BHT > Spojina **3** > Spojina **1** > Spojina **2** > Spojina **5** > Spojina **4**.

Za natančnejše ovrednotenje antioksidativnega delovanja spojin bi bilo potrebno določiti še hitrostne konstante spojin pri različnih koncentracijah.

## 5.2 Kvantitativno določanje EC<sub>20</sub>

Pri kvantitativnem določanju koncentracije, ki je potrebna, da se reducira 20% DPPH, smo na mikrotitrsko ploščo z 96 vdolbinicami v triplicatih nanесли ustrezne reakcijske zmesi. Spojine **1** - **5** smo pripravili pri koncentracijah: 33,3 μM, 16,67 μM, 8,33 μM, 4,167 μM, 2,08 μM, vendar so bile te koncentracije prenizke, z njimi ne bi mogli določiti vrednosti EC<sub>20</sub>. Zato smo pripravili in izmerili naslednje višje koncentracije (koncentracije spojin v reakcijski zmesi): 350 μM, 140 μM, 93,3 μM, 70 μM, 46,67 μM, 35 μM, 23,33 μM. Iz spremljanja kinetike redukcije DPPH z BHT in hitrostnih konstant smo ugotovili, da je BHT boljši antioksidant kot spojine **1** - **5**, zato smo pričakovali, da bo imel najnižji EC<sub>20</sub>. BHT smo pripravili in izmerili pri naslednjih koncentracijah (koncentracije BHT v reakcijski zmesi): 350 μM, 140 μM, 93,3 μM, 70 μM, 35 μM, 17 μM, 8,75 μM. Pri vsaki analizirani spojini smo opravili še meritev slepega DPPH, torej DPPH brez testne spojine, za določitev začetne točke pri koncentraciji testne spojine 0 μM. Prav tako smo pred določevanjem EC<sub>20</sub> izmerili stabilnost DPPH brez testne spojine.

Pri metodi z DPPH se običajno za ugotavljanje antioksidativnega delovanja določa EC<sub>50</sub>, ki je koncentracija, potrebna za redukcijo 50% začetne vrednosti DPPH v določenem času. Nižja kot je vrednost EC<sub>50</sub>, bolj učinkovit je antioksidant (14, 18, 19). Vendar mora delo potekati v linearnem območju, saj nam le-ta daje rezultate z manjšo napako. Zato v primeru nelinearnosti med koncentracijo antioksidanta in reduciranim DPPH določevanje EC<sub>50</sub> ni vedno optimalna izbira. Zaradi težav z linearnostjo so v študiji Carmona-Jiménez et al. določili EC<sub>20</sub>, to je koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 20% začetne vrednosti DPPH (19).

Pri delu smo tudi mi naleteli na težave z linearnostjo, zato smo pri obdelavi podatkov upoštevali le prve štiri najnižje koncentracije spojin (grafi 9, 11, 13, 15, 17 in 19). Poleg tega mora biti za rezultate z manjšo napako vsaj ena točka nad in ena pod vrednostjo EC<sub>50</sub> na grafu odvisnosti odstotkov nereduciranega DPPH od koncentracije (9). Ker pri spojinah **4** in **5** (grafa 14 in 16) nismo dobili nobene točke pod koncentracijo, pri kateri je DPPH reduciran za 50% smo se odločili za določitev EC<sub>20</sub>. Če bi želeli dobiti točko pod vrednostjo EC<sub>50</sub> pri spojinah **4** in **5**, bi morali uporabiti višje koncentracije, kar pa je bilo zaradi omejene topnosti spojine **4** nemogoče, saj je bila pri koncentraciji 700 mM ta

spojina netopna. Vrednost  $EC_{50}$  smo pri spojinah **1**, **2**, **3** in BHT podali grafično (grafi 8, 10, 12 in 18). Glede na štiri najnižje koncentracije analiziranih spojin smo za vsako spojino izračunali regresijsko premico,  $EC_{20}$  ter standardno napako.  $EC_{20}$  smo določili po inkubacijski dobi 90 minut.

Vrednosti  $EC_{20}$  za spojine **1** – **5** in BHT so prikazane na grafu 20. Vrednost  $EC_{20}$  je bila za spojino **1**  $17,8 \pm 0,791 \mu\text{M}$ , vrednost  $EC_{20}$  za spojino **2** pa  $19,4 \pm 4,50 \mu\text{M}$ . Ti dve spojini se med seboj razlikujeta samo v položaju ciano (-CN) skupine. Ciano skupina je pri spojini **1** na *meta* mestu, ciano skupina pri spojini **2** pa na *para* mestu benzilidena. Zato smo pričakovali, da bosta tudi njuni  $EC_{20}$  vrednosti podobni. Ciano skupina je elektron privlačna. Zaradi privlaka elektronov je stabilizirala radikal, ki je najverjetneje nastal na benzilnem ogljiku pri adiciji na dvojno vez (30).

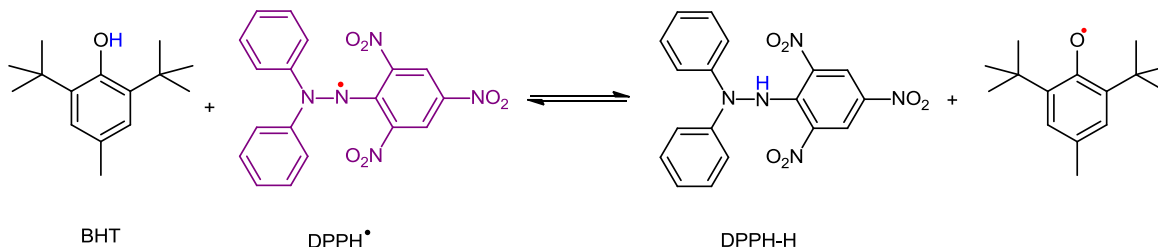
Prav tako je tudi nitro (-NO<sub>2</sub>) skupina pri spojini **3** elektron privlačna, tudi tu je najverjetneje nastal radikal na benzilnem ogljiku (30).  $EC_{20}$  za spojino **3** je  $16,1 \pm 2,11 \mu\text{M}$ . Od spojin **1** – **5** je imela spojina **3** najnižji  $EC_{20}$ , torej je od teh spojin najboljši reducent in antioksidant.

Spojina **4** ima hidroksilno (-OH) skupino, ki je elektron donorska. Lahko odda vodik iz hidroksilne skupine in na tem mestu pridobi primanjkljaj elektrona (radikal). Fenoli so dobri antioksidanti, saj je nastali radikal stabiliziran z delokalizacijo nesparjenega elektrona po benzenovem obroču (9). Zato bi za to spojino pričakovali, da bo najboljši antioksidant. Vendar se je izkazalo, da spojina **4** ni tako dober reducent,  $EC_{20}$  je bil namreč  $56,2 \pm 6,08 \mu\text{M}$ , veliko višji od prvih treh spojin.

V študiji Mohammed Khan et al. leta 2011 so proučevali derivate barbiturne kisline, med njimi tudi dva ariliden barbiturata, eden z *meta* substituirano nitro skupino, drugi pa s *para* substituirano hidroksilno skupino. Ariliden z *meta* substituirano nitro skupino se je izkazal kot boljši antioksidant kot ariliden s *para* substituirano hidroksilno skupino. V študiji so ugotovili, da so položaji nitro in hidroksilnih skupin zelo pomembni, saj položaj vpliva na sposobnost stabilizacije radikala, stabilizacija nastalega radikala pa je eden najbolj pomembnih dejavnikov pri radikalskih reakcijah (23). Res je, da smo omenili, da se študije težka primerjajo med sabo, vendar so naši rezultati pokazali podobne ugotovitve, saj se je spojina **3** z nitro skupino na *meta* mestu ravno tako izkazala kot boljši antioksidant kot spojina **4** s hidroksilno skupino na *para* mestu.

Spojina **5**, ki je derivat rodanina, ima vezano amino (-NH<sub>2</sub>) skupino na *meta* mestu benzilidena. Tudi ta skupina je elektron donorska (31). Vendar se je ta spojina prav tako izkazala kot slab reducent z  $EC_{20}$   $73,2 \pm 3,14 \mu\text{M}$ . Spojina **5** je imela tako najvišji  $EC_{20}$ , kar

pomeni, da je ta spojina najslabši reducent, torej ima najslabše antioksidativno delovanje. Vzrok za slabše antioksidativno delovanje spojin **4** in **5** bi bil lahko v položaju funkcionalnih skupin, ki omogočajo slabšo stabilizacijo radikala.



Slika 5: Reakcija BHT z DPPH

EC<sub>20</sub> za BHT je bil  $9,52 \pm 3,38 \mu\text{M}$ . Iz spremljanja kinetike redukcije DPPH z BHT smo predvidevali, da bo imel BHT nižji EC<sub>20</sub> kot spojine **1** - **5**. Hidroksilna skupina BHT reagira z DPPH in nastopa kot donor vodika, pri tem nastane stabilna oblika DPPH-H (slika 5). Ena molekula BHT lahko reducira dva radikala, vendar v našem primeru ena molekula BHT reducira samo en DPPH, saj DPPH v večini reakcijskih zmesi ni v prebitku, poleg tega je BHT sterično oviran, zato najverjetneje ne pride do sekundarnih reakcij (9).

Mehanizem reakcije med antioksidantom in DPPH je odvisen od strukture antioksidanta. Nekatere fenolne spojine reagirajo zelo hitro z DPPH, reducirajo toliko molekul DPPH kot imajo hidroksilnih skupin (32). Vendar večje kot je število in kompleksnost dodanih obročev na fenolnih spojinah, počasnejše so reakcije, saj se morajo skupine na molekulah, ki vstopajo v reakcije, pravilno orientirati proti radikalu v središču DPPH. Sterično oviranje je eden najpomembnejših dejavnikov reakcij fenolnih komponent z DPPH (16). Trditev, da fenoli reducirajo toliko molekul DPPH, kot imajo hidroksilnih skupin, za večino primerov ne velja, reakcije so počasne, mehanizmi pa so kompleksni (32).

V molekuli DPPH se na eni strani radikala nahajata dva fenilna obroča, na drugi pa pikrilni obroč s tremi nitro skupinami, od tega ena nad in ena pod območjem radikala. Radikal v središču molekule DPPH je zato sterično oviran (16). Antioksidanti, ki imajo zelo dobro antioksidativno delovanje *in vivo*, med drugimi tudi glutation in BHT, v metodi z DPPH delujejo kot antioksidanti s počasno reakcijsko kinetiko, ravno zaradi sterične oviranosti radikala v središču molekule DPPH (16). Prav tako nekatere spojine tudi pri visokih koncentracijah ne reducirajo več kot 75% začetne koncentracije DPPH, tudi po 7 urah (33). Ob predpostavki, da BHT pri metodi z DPPH izkazuje slabše antioksidativno delovanje kot *in vivo*, bi lahko to pričakovali tudi za ostale spojine. Torej bi lahko spojine **1** - **5** *in vivo*



delovale veliko hitreje, saj radikali, ki so prisotni v naravi, običajno niso sterično ovirani, reakcije bi potekle veliko hitreje. Poleg tega je zaradi kratkoživih radikalov *in vivo* bolj pomembno, kako hitro vsaka funkcionalna skupina antioksidantov zmanjša prisotnost radikalov kot število funkcionalnih skupin, ki lahko reagirajo z radikali (17).

Vzroke za daljše reakcijske čase spojin **1** - **5** in BHT z DPPH bi lahko poleg sterične oviranosti DPPH, položajev funkcionalnih skupin in sposobnosti stabilizacije nastalih radikalov ter sterične oviranosti, zaradi števila in kompleksnosti dodanih obročev v strukturah spojin, iskali tudi drugje. Izkazalo se je, da na reakcijo DPPH z antioksidantom vplivajo tudi koncentracija DPPH, topilo, moč vodikove vezi, pH in temperatura. Antioksidanti, ki delujejo kot donorji vodika, reagirajo nekoliko počasneje v metanolu in etanolu, kot tisti antioksidanti, ki delujejo s prenosom elektrona (16).

Poleg nelinearnosti absorbance in koncentracije antioksidanta, kisika, svetlobe, pH in sterične oviranosti DPPH, veliko pomanjkljivost metode z DPPH predstavlja tudi pomanjkanje poenotnih kriterijev za določanje antioksidativnega delovanja. Uporabljajo se različna topila, začetne koncentracije DPPH, volumni vzorcev, inkubacijski časi in predstavitve rezultatov, zato se dobljene rezultate različnih postopkov le težka primerja med seboj (19).

## 6 SKLEP

V zadnjem času se oksidativnemu stresu in fotostaranju posveča veliko pozornosti. Zato kozmetična industrija z uporabo antioksidantov želi zaščititi kožo pred škodljivimi učinki radikalov. 5-benziliden barbiturati in derivati rodanina poleg drugih bioloških učinkov izkazujejo tudi antioksidativno delovanje.

Z uporabo UV-Vis spektrofotometrije smo ovrednotili antioksidativno delovanje spojin z merjenjem absorbance stabilnega radikala DPPH do reducirane oblike DPPH-H. Spojine **1** – **5** so se pri vseh izmerjenih koncentracijah izkazale kot antioksidanti s počasno reakcijsko kinetiko. Omejena topnost spojin **2**, **3** in **4** bi lahko pri njihovi uporabi v kozmetičnih izdelkih predstavljala veliko slabost. BHT se je pri nižji koncentraciji (35  $\mu\text{M}$ ) izkazal kot antioksidant s počasno reakcijsko kinetiko, pri višjih koncentracijah 140  $\mu\text{M}$  in 350  $\mu\text{M}$  pa kot antioksidant s srednje hitro in hitro reakcijsko kinetiko. Hitrostne konstante spojin **1**, **2** in **3** so bile višje kot hitrostne konstante spojin **4** in **5**.

Z določanjem vrednosti  $\text{EC}_{20}$  smo izbrane spojine primerjali med seboj in z dobro znanim antioksidantom BHT. Komentirali smo pomanjkljivosti uporabe metode z DPPH ter razloge za različne vrednosti  $\text{EC}_{20}$  spojin. Spojine **1**, **2** in **3** z elektron privlačnimi skupinami delujejo kot antioksidanti z nastankom radikala na benzilnem ogljiku pri adiciji na dvojno vez. Spojini **4** in **5**, ki sta slabša antioksidanta kot spojine **1**, **2** in **3**, pa imata elektron donorski skupini, ki lahko oddata vodik in na tem mestu pridobita primanjkljaj elektronov. BHT pri metodi z DPPH izkazuje slabše antioksidativno delovanje kot *in vivo*, zato bi lahko pričakovali, da bi tudi spojine **1** – **5** *in vivo* reagirale veliko hitreje.

Za ovrednotenje antioksidativnih lastnosti izbranih spojin bi bilo potrebno opraviti še dodatne *in vitro* metode ali tudi *in vivo* metode, saj so izbrane spojine, predvsem spojine **1**, **2** in **3**, potencialno zanimive za uporabo v kozmetičnih izdelkih.

## 7 LITERATURA

1. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393–406.
2. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. *Farm vestn* 2015; 66(2): 127-132.
3. <http://pro2services.com/lectures/Fall/InfMeds/InfMed.htm>, dostopano: avgust 2015.
4. Gašperlin M, Gosenca M: Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2011; 8(7): 905–919.
5. O. Barel A, Paye M, Maibach H I: *Handbook of cosmetic science and technology*, 3rd ed., Informa Healthcare, New York, 2009: 233-683.
6. Trojak A, Kristl J: Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov. *Farm Vestn* 1999; 50(4): 443-453.
7. Poljšak B, Dahmane R: Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatol Res Pract* 2012; 2012: 1–4.
8. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarov. *Med razgl* 2006; 45: 141-153.
9. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 138-274.
10. Manaia E. B., Kaminski R.C.K., Corrêa M.A., Chiavacci L.A.: Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 49(2): 201-209.
11. 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): 2030–2039.
12. Niki E: Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(4): 503–515.
13. Hermans N, Cos P, Maes L, De Bruyne T, Vanden Berghe D, Vlietinck A J, et al.: Challenges and Pitfalls in Antioxidant Research. *Curr Med Chem* 2007; 14(4): 417–430.
14. Sharma O P, Bhat T K: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 2009; 113(4): 1202–1205.
15. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26(2): 211–219.

16. 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): 4251–4260.
17. 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): 143–152.
18. 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): 1036–1043.
19. 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.
20. Khan K M, Ali M, Wadood A, Zaheer-ul-Haq, Khan M, Lodhi M A, et al: Molecular modeling-based antioxidant arylidene barbiturates as urease inhibitors. *J Mol Graph Model* 2011; 30: 153-156.
21. Zidar N, Kikelj D: Preparation and Reactivity of 5-benzylidenebarbituric and 5-benzylidene-2-thiobarbituric Acids. *Acta Chim Slov* 2011; 58: 151–157.
22. 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): 286–291.
23. Khan K M, Khan M, Ali M, Taha M, Hameed A, Ali S, et al.: Synthesis and DPPH radical scavenging activity of 5-Arylidene-N,Ndimethylbarbiturates. *Med Chem* 2011; 7(3): 231–236.
24. 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): 3279–3284.
25. Bhatti R S, Shah S, Suresh, Krishan P, Sandhu J S: Recent pharmacological developments on rhodanines and 2,4-thiazolidinediones. *Int J of Med Chem* 2013; 2013: 1-16.
26. Revathi R, Arul Ananth D, Sivasudha T, Shalini E P: Synthesis, characterization, in vitro antioxidant antimicrobial studies of rhodanine functionalized quinoline derivatives. *Adv Sci Focus* 2014; 2(2): 1–8.
27. Chat O A, Najar M H, Dar A A: Evaluation of reduction kinetics of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical by flavonoid glycoside Rutin in mixed solvent based micellar media. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2013; 436: 343-353.
28. <https://support.office.com/en-us/article/STEYX-function-6ce74b2c-449d-4a6e-b9ac-f9cef5ba48ab>, dostopano: avgust 2015.

29. Ozcelik B, Lee J H, Min D B: Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* 2003; 68(2): 487–490.
30. [https://en.wikipedia.org/wiki/Polar\\_effect](https://en.wikipedia.org/wiki/Polar_effect), dostopano: avgust 2015.
31. [https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophilic\\_aromatic\\_directing\\_groups](https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophilic_aromatic_directing_groups), dostopano: avgust 2015.
32. 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(6): 609–615.
33. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss u Technol* 1995; 28(1): 25-30.