

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA PISKULE

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA PISKULE

**VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI PRI IZBRANIH 5-  
BENZILIDENRODANINIH S KINETIKO REDUKCIJE 2,2-DIFENIL-1-  
PIKRILHIDRAZILA**

**EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES AT THE SELECTED 5-  
BENZYILIDENERHODANINES WITH A REDUCTION KINETICS OF 2,2-  
DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku za pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem za vso podporo na moji študijski poti.

### **Izjava**

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

Petra Piskule

Ljubljana, 2016

**Predsednik komisije:** izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

**Članica komisije:** doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

**Mentor:** doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

# VSEBINA

POVZETEK .....	III
ABSTRACT .....	V
SEZNAM SLIK .....	VII
SEZNAM PREGLEDNIC .....	VII
SEZNAM GRAFOV .....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	IX
1 UVOD .....	1
1.1 STARANJE KOŽE .....	2
1.1.1 Intrinzično staranje .....	2
1.1.2 Ekstrinzično staranje .....	2
1.2 OKSIDATIVNI STRES .....	3
1.2.1 Reaktivne spojine v koži .....	4
1.2.2 Posledice oksidativnega stresa v koži .....	4
1.3 RADIKALI .....	5
1.3.1 Prisotnost radikalov v koži in posledice .....	6
1.3.2 Obramba kože pred radikali .....	6
1.4 ANTIOKSIDANTI .....	7
1.4.1 Uporaba antioksidantov v kozmetičnih izdelkih .....	9
1.4.2 Posledice prisotnosti radikalov v koži in v kozmetičnih izdelkih .....	10
1.5 METODA DPPH .....	10
1.6 RODANIN IN NJEGOVI DERIVATI .....	13
2 NAMEN DELA .....	14
3 EKSPERIMENTALNI DEL .....	15
3.1 MATERIALI .....	15
3.1.1 Spojine .....	15
3.1.2 Priprava spojin .....	16
3.1.3 Priprava vzorca standarda .....	17
3.1.4 Kemikalije in reagenti .....	18
3.1.5 Merilni pripomočki in aparati .....	19
3.1.6 Računalniška programska oprema .....	20
3.2 METODE .....	21
3.2.1 Določanje vrednosti EC <sub>50</sub> .....	21
3.2.2 Določanje kinetike redukcije DPPH in vrednosti hitrostnih konstant .....	22
3.2.3 Določanje hitrostnih konstant in izračun vrednosti EC <sub>50</sub> .....	23

4	REZULTATI .....	25
4.1	KVANTITATIVNO DOLOČANJE VREDNOSTI EC <sub>50</sub> .....	25
4.2	KINETIKA REDUKCIJE DPPH IN IZRAČUN HITROSTNIH KONSTANT .....	28
5	RAZPRAVA .....	34
5.1	KOMENTAR KVANTITATIVNEGA DOLOČANJA VREDNOSTI EC <sub>50</sub> .....	34
5.2	KOMENTAR KINETIKE REDUKCIJE DPPH IN KVANTITATIVNEGA DOLOČANJA HITROSTNIH KONSTANT .....	38
6	SKLEP .....	43
7	LITERATURA.....	44

## POVZETEK

Zaradi vedno bolj stresnega življenja in večje nevarnosti sončnih žarkov, se v kozmetični industriji pojavlja vedno večja potreba po novih antioksidantih. Prevelika količina stresa in UV-svetlobe vodita v zgodnje staranje in različne bolezni, kot so ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen in nekatere vrste raka. Staranje, povzročeno z UV-svetlobo, imenujemo fotostarjanje, saj UV-svetloba povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Tako v telesu pride do neravnovesja med tvorbo ROS in učinkovitostjo antioksidantov, ki jih odstranjujejo. Povečana prisotnost ROS vodi v stanje, ki ga imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti so snovi, ki upočasnijo, preprečijo ali pa odstranijo poškodbe tarčnih molekul, ki nastanejo zaradi oksidativnega stresa. V kozmetičnih izdelkih imajo dvojno vlogo; in sicer kot tehnični antioksidanti, ki varujejo kozmetični izdelek pred vplivi iz okolja, ali kozmetično aktivne sestavine, ki podpirajo antioksidativno obrambo kože. Antioksidativno delovanje temelji na odstranjevanju reaktivnih zvrsti ali pa na preprečevanju njihovega nastanka.

Rodanini izkazujejo številne biološke učinke. Če na mesto 5 na rodaninskem obroču uvedemo benzilidensko skupino, dobimo derivate 5-benziliden rodanina. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali izbrane spojine z različnimi funkcionalnimi skupinami izkazujejo antioksidativno delovanje. Redukcijske lastnosti štirih izbranih rodaninov smo ovrednotili tako, da smo spremljali kinetiko redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) do 2,2-difenil-1-pikrilhidrazina (DPPH-H) z različnimi koncentracijami omenjenih spojin. Določili smo hitrostne konstante reakcij ter koncentracije, ki so bile potrebne za redukcijo 50% začetne vrednosti DPPH (efektivna koncentracija,  $EC_{50}$ ).

Kot standard smo uporabili  $\alpha$ -tokoferol. Pri raziskovanju kinetike redukcije DPPH z izbranimi spojinami smo ugotovili, da  $\alpha$ -tokoferol spada med antioksidante s hitro, naše spojine pa med antioksidante s počasno reakcijsko kinetiko, saj po 90 minutah nobena od njih ni dosegla platoja.

Pri spremljanju kinetike redukcije DPPH, določanju hitrostnih konstant in vrednosti  $EC_{50}$  smo ugotovili, da vse štiri preiskovane spojine, kakor tudi standard, izkazujejo antioksidativne lastnosti, vendar se med seboj razlikujejo, najverjetneje zaradi prisotnosti in razporeditve različnih funkcionalnih skupin. Pričakovano je  $\alpha$ -tokoferol izkazoval najboljše antioksidativno delovanje.

Za izbrane spojine, ki na podlagi opravljenih meritev izkazujejo antioksidativno delovanje, bi bilo potrebno opraviti nadaljnje študije *in vitro*, saj so zanimive za vgrajevanje v kozmetične izdelke predvsem kot tehnični antioksidanti.

**Ključne besede:** *antioksidanti, radikali, 5-benziliden rodanini, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)*

## ABSTRACT

Cosmetic industry experiences an increasing need for new anti-oxidants, due to increasingly stressful life and a greater risk of sun rays. Too much stress and UV light lead to early ageing and various diseases, such as atherosclerosis, Alzheimer's disease and some types of cancer. Aging, caused by UV light, is called photoaging, as UV light can cause the formation of reactive oxygen species (ROS). Thus, in the body there is an imbalance between the production of ROS and effectiveness of antioxidants that remove them. The increased presence of ROS leads to a condition called oxidative stress. Antioxidants are substances that slow down, prevent or remove damage of target molecules resulting from oxidative stress. They have a dual role in cosmetic products, being either technical antioxidants, which protect them from environmental influences, or cosmetic active ingredients that support antioxidative defences of skin. Antioxidant activity is based on the removal of the reactive species or prevention of their occurrence.

Rhodanines exhibit numerous biological effects. 5-Benzylidene rhodanines are derivatives with benzylidene group at location 5 on the rhodanine ring. The purpose of the thesis was to find out whether four selected compounds with different functional groups possess antioxidant activity. The reducing properties of selected rhodanines were evaluated by monitoring kinetics of reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyn (DPPH-H) with different concentrations of tested compounds. Reaction rate constants and concentrations necessary for reduction of the 50% of initial quantities of DPPH (effective concentration,  $EC_{50}$ ) were determined.

We have used  $\alpha$ -tocopherol as a standard. By researching reduction kinetics of DPPH with selected compounds, we found that  $\alpha$ -tocopherol is one of the antioxidants with fast reaction kinetics, while our tested compounds belong to antioxidants with slow reaction kinetics, as they after 90 minutes were not reaching plateau values.

Through monitoring the kinetics of DPPH reduction, determination of rate constants and  $EC_{50}$  values, we found that all four investigated compounds, as well as the standard, possess antioxidant properties, but differ from each other, most likely due to the presence and distribution of various functional groups. As expected  $\alpha$ -tocopherol showed the strongest antioxidant activity.



For selected compounds, which showed antioxidant properties, it would be necessary to carry out further studies *in vitro*, since they have potential for incorporation in cosmetic products, primarily as technical antioxidants.

**Key words:** *antioxidants, free radicals, 5-benzylidene rhodanines, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*

## SEZNAM SLIK

Slika 1: Antioksidantna hierarhija.....	8
Slika 2: Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila.....	11
Slika 3: Reakcija DPPH z antioksidantom. ....	12
Slika 4: Struktura rodanina z oštevilčenjem in zgradba epalrestata. ....	13
Slika 5: UV-Vis spektrofotometer Cary 50.....	20
Slika 6: Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy HT (BioTek®).....	20
Slika 7: Mikrotitrská ploščica po nanosu raztopin spojine 4 (desno) in $\alpha$ -tokoferola (levo) ter DPPH. .....	22
Slika 8: Tautomerija 5-benziliden-rodaninov. ....	36
Slika 9: Reakcija $\alpha$ -tokoferola z DPPH. ....	37

## SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Predstavitev analiziranih spojin.....	15
Preglednica II: Redčitve osnovnih raztopin preizkušanih spojin in njihove koncentracije za spremljanje kinetike redukcije z DPPH.....	16
Preglednica III: Koncentracije analiziranih spojin 1 in 2 za določitev vrednosti $EC_{50}$ .....	16
Preglednica IV: Koncentracije analiziranih spojin 3 in 4 za določitev vrednosti $EC_{50}$ .....	17
Preglednica V: Kemijske lastnosti ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferola.....	17
Preglednica VI: Koncentracije vzorcev $\alpha$ -tokoferola za določitev vrednosti $EC_{50}$ .....	18
Preglednica VII: Kemikalije in reagenti, ki smo jih uporabili za pripravo raztopin DPPH in preiskovanih spojin. ....	19
Preglednica VIII: Odstotki preostalega DPPH v raztopini po 90 minutah spremljanja kinetike njegove redukcije. ....	30
Preglednica IX: Hitrostne konstante psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 1. ....	30
Preglednica X: Hitrostne konstante psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 2. ....	30
Preglednica XI: Hitrostne konstante psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 3. ....	31
Preglednica XII: Vrednosti hitrostnih konstant $k_2$ za analizirane spojine 1-3.....	33

## SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 1.....	25
Graf 2: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 2.....	26
Graf 3: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 3.....	26
Graf 4: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 4.....	27
Graf 5: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij $\alpha$ -tokoferola.....	27
Graf 6: Grafični prikaz vrednosti $EC_{50}$ s standardnimi napakami za spojine 1-4 in $\alpha$ -tokoferol.....	28
Graf 7: Kinetike redukcije DPPH z različnimi koncentracijami spojine 1.....	28
Graf 8: Kinetike redukcije DPPH z različnimi koncentracijami spojine 2.....	29
Graf 9: Kinetike redukcije DPPH z različnimi koncentracijami spojine 3.....	29
Graf 10: Grafični prikaz določanja hitrostnih konstant psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 1 in izračun hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$ - naklon premice).....	31
Graf 11: Grafični prikaz hitrostnih konstant psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 2 in izračun hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$ - naklon premice).....	32
Graf 12: Grafični prikaz hitrostnih konstant psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 3 in izračun hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$ - naklon premice).....	32
Graf 13: Trikrat ponovljena določitev kinetike redukcije DPPH s spojino 1, pri koncentraciji 700 $\mu$ M.....	39
Graf 14: Prikaz vrednosti $\ln(1-Abs_f/Abs)/(1-Abs_f/Abs_0)$ v odvisnosti od časa v prvih 30 minutah reakcije redukcije DPPH s spojino 2, pri koncentraciji 700 $\mu$ M.....	41

## SEZNAM OKRAJŠAV

ARP	antiradikalska moč
ATP	adenozin trifosfat
BHT	butil-hidroksitoluen
CAT	katalaza
CoQ <sub>10</sub>	koencim Q <sub>10</sub>
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH-H	2,2-difenil-1-pikrilhidrazin
EC <sub>20</sub>	20-odstotna efektivna koncentracija
EC <sub>50</sub>	50-odstotna efektivna koncentracija
ECM	zunajcelični matriks
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
HAT	odtegnitev (abstrakcija) vodikovega atoma ( <i>ang. hydrogen atom transfer</i> )
IR	infrardeče sevanje
MMP	matriksna metaloproteinaza
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
R <sup>•</sup>	lipidni radikal
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RS	reaktivna spojina
SET	prenos elektrona ( <i>ang. single electron transfer</i> )
SOD	superoksid dismutaza
UV	ultravijolična (svetloba)
VIS	vidna (svetloba)
$\lambda$	valovna dolžina

# 1 UVOD

Koža je s površino okrog 1,8 m<sup>2</sup> naš največji organ in predstavlja približno 16% telesne mase. Med posameznimi osebami se razlikuje po barvi, poraščenosti, debelini, itd. Njena najpomembnejša naloga je barierna zaščita telesa pred škodljivimi zunanjimi dejavniki in nenadzorovano izgubo vode skozi kožo ter uravnavanje telesne temperature. Sestavljajo jo tri plasti – epidermis (zunanja plast ali povrhnjica), dermis (srednja plast ali usnjica) in subcutis (spodnja plast ali podkožje).

Ozonska plast zadrži sončne žarke z valovno dolžino pod 280 nm, preostali del spektra sončne svetlobe pa se odbije na koži ali pa prodre vanjo. Biološki vplivi sončnih žarkov so lahko takojšnji (toplotni učinek, sinteza vitamina D, majhna pigmentacija), zapoznili (sončne opekline, odebelitev rožene plasti, porjavitev) ali dolgotrajni (staranje kože, fotosenzibilizacija, kožne spremembe – epiteliomi, melanomi) (1).

Sončni žarki zajemajo vidno, infrardečo ter ultravijolično (UV) svetlobo. Slednja ima največjo vlogo pri učinkih na našo kožo. Ker ima kratko valovno dolžino, je ne vidimo. UV-žarke delimo v tri skupine:

- UV-žarki C (UVC): imajo najmanjšo valovno dolžino (100 do 290 nm) in energijo do 1.200 kJ/mol. V celoti se absorbirajo v ozonski plasti in ne dosežejo površja zemlje.
- UV-žarki B (UVB): so valovnih dolžin od 290 do 320 nm in predstavljajo 1-10% UV-svetlobe. V kožo prodrejo do 180 µm globoko in dosežejo tudi usnjico. Imajo največji in najnevarnejši učinek na našo kožo. Povzročajo pordečitev (eritem), porjavitev (pigmentacijo), staranje kože in nekatere vrste kožnega raka, ugodno pa vplivajo na nastajanje vitamina D v koži.
- UV-žarki A (UVA): predstavljajo največji del (90-99%) UV-svetlobe in imajo valovno dolžino od 320 do 400 nm ter energijo do 300 kJ/mol. Prodirajo skozi epidermis in dermis, do 1.000 µm v globino kože. Povzročajo porjavitev, v višjih odmerkih pa sončne opekline. Sodelujejo pri staranju kože ter nastanku kožnega raka (predvsem melanoma). Pogosto povzročajo fotodermatozo. Ne morejo neposredno poškodovati DNA, tako kot UVC in UVB žarki, temveč to storijo posredno, preko nastanka reaktivnih spojin (RS) (2, 3, 4).

Molekule, ki na koži ali v njej absorbirajo UV sevanje, so kromofori (melanin, DNA, nekatere beljakovine, ...). Pri tem preidejo v vzbujeno stanje ali pa spremenijo svojo

konformacijo, pri čemer se lahko tvorijo reaktivne kisikove spojine (ROS). Vzbujene molekule so zelo reaktivne in povzročijo nastanek fotoproduktov (radikalov, lipidnih peroksidov, okvarjenih encimov, ...). Posledice tega so okvare encimov, mutacije DNA, sproščanje mediatorjev vnetja, čemur sledijo okvare celic in tkiv, vnetja ter zmanjšanje imunskega odziva.

## **1.1 STARANJE KOŽE**

Staranje je fiziološki proces, ki nastane zaradi porušanja homeostaze, pri tem pa koža postane manj odporna na okoljske vplive in nekatere bolezni. Spremembe nastanejo v epidermisu, dermisu, hipodermisu in lasnih foliklih (5).

### **1.1.1 Intrinzično staranje**

Je degenerativni proces, ki se kaže v spreminjanju funkcije, strukture in videza kože. Poteka neprestano, vidne spremembe pa se začno pojavljati postopoma. Hitrost in intenziteta sta odvisni od spola, tipa kože, rase, genoma, stila življenja in zunanjih dejavnikov. Ne glede na starost, je večina kožnih komponent pod fiziološkim vplivom endokrinih in nevroendokrinih dejavnikov, saj je koža hormonsko odvisen organ. Sam estrogen ali skupaj s progesteronom prepreči ali zavira atrofijo in suhost kože ter kožne gube, povzročene s kronološkim ali fotostaranjem. Estrogen in progesteron stimulirata proliferacijo keratinocitov, poleg tega pa estrogen zavira apoptozo in tako preprečuje atrofijo epidermisa. Estrogen tudi spodbuja sintezo kolagena, skupaj s progesteronom pa zavirata razgradnjo kolagena z zmanjšanjem aktivnosti metaloproteinaz matriksa (MMP) v fibroblastih. Estrogen zvišuje raven hialuronske kisline v dermisu, progesteron pa poveča izločanje loja. Zato obdobji menopavze in andropavze negativno vplivata na kožo (5).

### **1.1.2 Ekstrinzično staranje**

Je posledica zunanjih dejavnikov, v 90% UV-svetlobe, ostala pomembna dejavnika pa sta kajenje in okoljska onesnaženost (predvsem z ozonom). Pod vplivom UV-svetlobe se dodatno tvorijo radikali ter druge ROS v koži, UVB-sevanje pa pripomore k okvaram jedrne in mitohondrijske-DNA. Večja kot je količina ROS v koži, bolj pogoste so okvare DNA ter mutacije, kar vodi v upadanje funkcije kože v celoti. Intenziteta in obseg fotostaranja sta odvisna od dolžine izpostavljenosti sončni svetlobi, deleža UV fotonov v tej svetlobi, vrste kože in njene pigmentacije.

Količina kolagena v koži od odrasle dobe dalje upada, UV svetloba pa to zmanjševanje še poveča po dveh poteh:

- z izražanjem genov za MMP, ki imajo v aktivnem mestu  $Zn^{2+}$  in katalizirajo cepitev peptidne vezi v molekulah kolagena in elastina ter zmanjšanjem izražanja gena za tkivni inhibitor MMP;
- z zmanjšanjem prepisa genov za prokolagena I in III, ki sta glavni komponenti fibrilarnega kolagena v dermisu, zaradi česar se zmanjša sinteza obeh vrst kolagenov.

Histološke značilnosti fotostarane kože so najbolj vidne v dermisu, kjer zunajcelični matriks (ECM) kaže izrazite spremembe v sestavi (5). Kolagenska mreža v dermalnem ECM je odgovorna za trdnost in elastičnost kože in je tesno vpletena v izražanje znakov ekstrinzičnega staranja.

Znaki intrinzičnega in ekstrinzičnega staranja se izražajo različno. Prvo privede do suhe, blede kože z drobnimi gubicami, medtem ko se fotostaranje kaže v obliki grobe, suhe, hrapave kože z globokimi gubami in motnjami pigmentacije (solarni lentigo, hipo- in hiperpigmentacija), izgubo tena kože, teleangiektazijo (t.i. pajkove žile), ohlapnosti in usnjatem videzu kože (5). Večina ljudi po 65. letu starosti ima vsaj eno kožno bolezen, veliko pa jih ima celo dve ali več. Ocenjujejo, da je 90% vseh kožnih rakov povezanih z izpostavljenostjo soncu (4). Najpogosteje se spremembe pojavijo na bolj izpostavljenih mestih, kot so obraz, vrat, zgornji del prsi, dlani in podlakti (3).

V zadnjem času so odkrili, da tudi infrardeče sevanje (IR) prispeva k fotostaranju. IR-A žarki ( $\lambda = 760-1.440$  nm), ki obsegajo približno 30% sončne energije, prodrejo v kožo globlje kot pa UV žarki, od tega pa jih kar 50% pride do usnjice (3).

## **1.2 OKSIDATIVNI STRES**

Živa bitja smo fiziološko kot tudi patološko izpostavljena reaktivnim spojinam. Le-te lahko razdelimo na radikale (snovi z vsaj enim nesparjenim elektronom) in neradikale (snovi, ki imajo vse elektrone v parih). V večini primerov so radikali zelo reaktivne molekule in imajo kratek razpolovni čas, neradikali pa so bolj stabilni. Reaktivne spojine reagirajo z biološkimi molekulami in jih pri tem poškodujejo. Zato so biološki sistemi razvili obrambne mehanizme, s katerimi se branijo pred njimi. Med nastankom reaktivnih spojin in obrambo pred njimi obstaja fiziološko ravnovesje. Če se to ravnovesje poruši in pride do čezmerne tvorbe ROS in/ali zmanjšane fiziološke aktivnosti antioksidativnih sistemov, to

vodi v nastanek oksidativnega stresa. Helmut Sies, ki je leta 1985 uvedel pojem oksidativni stres, ga definira kot »motnjo v ravnovesju med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih, kar vodi v možne poškodbe« (6). Glavni povzročitelj oksidativnega stresa v koži so UV-žarki. Posledice so poškodbe biomolekul, znaten oksidativni stres pa povzroči celo smrt celic. Zaradi oksidativnega stresa pride do zgodnjega staranja kože, prav tako pa spremlja bolezni, kot so ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena in nekatere vrste raka (7, 8).

### **1.2.1 Reaktivne spojine v koži**

V koži lahko nastanejo različne vrste reaktivnih spojin, odvisno od izpostavljenosti posamezni vrsti UV žarkov. Najobsežnejše so kisikove (ROS), sledijo pa jim še dušikove (RNS), ogljikove, žveplove in halogenske reaktivne zvrsti.

Superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) nastane pod vplivom UVB žarkov preko aktivacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfatne (NADPH) oksidaze in reakcij v dihalni verigi. Podobno  $O_2^{\cdot-}$  nastane tudi pod vplivom UVA žarkov, ki preko fotostimulirane reakcije s kromofori v celicah (npr. riboflavinom, porfirinom) povzročijo še nastanek singletnega kisika ( $^1O_2$ ). Ta lahko nastane tudi na površini kože pod vplivom UVA žarkov in porfirinov v bakterijah, ki so fiziološko prisotne na površini kože. Singletni kisik lahko oksidira skvalen, holesterol in nenasičene acilne verige v sebumu, s čimer pospeši lipidno peroksidacijo (9). Pod vplivom UV-žarkov pa v koži nastaneta tudi hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ) in vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ki tako kot  $O_2^{\cdot-}$  in  $^1O_2$  sodelujeta v reakcijah dehidrogenacije, hidroksilacije in adicije na dvojne vezi. Vse štiri ROS posredno in neposredno aktivirajo elastazo, kolagenazo,  $\beta$ -glukoronidazo in hialuronidazo ter preko oksidativnih poškodb deaktivirajo zaščitne encime (10).

UV-žarki posredno vplivajo tudi na nastanek reaktivnih dušikovih spojin, saj povečajo nastajanje citokinov, rastnih dejavnikov ter ostalih vnetnih dejavnikov in s tem vplivajo na izražanje inducibilne sintaze dušikovega oksida (iNOS). Velike količine  $\cdot NO$  vplivajo na nastanek začetnih procesov pri sončnih opeklinah v koži in na sončni eritem ter povečanje vnetnih procesov, spodbujenih z UV-žarki.

### **1.2.2 Posledice oksidativnega stresa v koži**

UV žarki in fotostimuliran oksidativni stres sprožijo v koži nastanek vnetja, stimulacijo žlez lojnic, melanogenezo, oksidacijo bioloških molekul ter spremembo v sestavi kože. Povečana koncentracija oksidiranih lipidov in proteinov vpliva na spremembe v koži. Ta

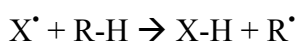


izgubi svojo barierno funkcijo, kar vodi do nastanka kožnih gub. Vnetni procesi v koži se sprožijo preko povečanega izražanja ciklooksigenaze 2, ki poveča nastajanje prostaglandina E2. Oksidativni stres, povečane količine oksidiranih lipidov ter peroksidov triglicerida in holesterola, spodbudijo delovanje žlez lojnic. Pod vplivom UV-žarkov se sintetizira melanin, ki odbija UV-žarke oziroma jih absorbira. Deluje pa tudi prooksidativno, in sicer je odgovoren za fotostimuliran nastanek reaktivnih spojin. To pride do izraza pri oslABLjeni antioksidativni kapaciteti celic. Reaktivne spojine pa vplivajo tudi na sestavo kože, saj se poveča razgradnja in zmanjša sinteza kolagena, kar vodi do spremembe v sestavi kože in povzroči pojav kožnih gub (9).

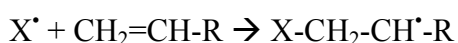
### 1.3 RADIKALI

Radikali so atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki lahko obstajajo samostojno in vsebujejo enega ali več nesparjenih elektronov v zunanji (valenčni) orbitali (6, 11). Elektroni zasedajo molekulske ali atomske orbitale, njihovo število pa je lahko liho ali sodo. Radikali so kemično zelo reaktivni in posledično nestabilni. Njihova življenjska doba je v območju milisekund, zato zaznamo le posledice njihove reaktivnosti, ne pa tudi njih samih. Radikalne reakcije so hitre, vendar pa so za razliko od encimskih neselektivne, nespecifične in nenadzorovane. Poznamo tri vrste radikalnih reakcij (1):

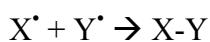
- i. Radikal odtegne vodikov atom iz spojine:



- ii. Radikal se veže (adira) na dvojno vez snovi:



- iii. Dva radikala lahko reagirata med seboj v neradikalno spojino:



V reakcijah i. in ii. vedno nastane nov radikal, medtem ko se v reakciji iii. prosta elektrona združita v kovalentno vez. Že en sam dovolj reaktiven radikal lahko v telesu sproži obsežno verižno reakcijo, saj je večina molekul v telesu neradikalnih.

V skupino ROS uvrščamo skupino kisikovih radikalov (superoksidni radikal, hidroksilni radikal in  $^3O_2$ ) in kisikovih reaktivnih derivatov (ozon, singletni kisik, vodikov peroksid, organski peroksidi). V organizmu pa so poleg njih pomembne še reaktivne dušikove spojine (RNS) (radikala  $^{\bullet}NO$  in  $^{\bullet}NO_2$ , neradikal peroksinitrit, itd.).

### **1.3.1 Prisotnost radikalov v koži in posledice**

Neposredne posledice delovanja ROS v koži so: povečanje prepustnosti celične membrane, peroksidacija biomolekul, oksidacija glutationa, poškodbe DNA, tiolna oksidacija proteinov, inhibicija glikolize, nepravilnosti pri prenosu dražljajev, izčrpanje zalog  $\text{NAD}^+$  in ATP, itd. Sicer pa igrajo pomembno vlogo pri fotostaranju, vnetjih in kožnemu raku (7, 12). Zelo pomembna reakcija je nastanek hidroksilnega radikala v Fentonovi reakciji, kjer le-ta nastane z redukcijo vodikovega peroksida s kovinskimi ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ). Ta radikal lahko reagira z vsemi strukturnimi enotami molekule DNA in jih poškoduje.

Prezgodnje staranje (fotostaranje), izguba elastičnosti in prožnosti kože, pojav gub, pigmentacije in lis ter maligne transformacije so posledica delovanja radikalov, ki nastajajo v povrhnjici in usnjici. Radikali (predvsem superoksidni in hidroksilni) neposredno znižajo koncentracijo v koži prisotnih fizioloških antioksidantov; in sicer vitaminov E in C, koencima Q in glutationa (GSH) ter tako oslabijo prvo obrambno linijo kože pred njihovim delovanjem.

Encima katalaza in glutation peroksidaza sta pomembna v obrambi kože pred delovanjem radikalov, saj odstranjujeta vodikov peroksid. Radikali zmanjšajo aktivnost encimov in koncentracijo fizioloških radikalov, zato se lahko začnejo procesi lipidne peroksidacije, ki poškodujejo celice ter patološki procesi, ki povzročajo mutacijo DNA in kancerogenost. Pri nastanku raka poleg ROS in RNS sodelujejo tudi reaktivne klorove spojine. Obstaja možnost, da preobrazbo benignega v maligni tumor sproži prav povečana količina ROS v celicah kože. Tudi za imunosupresivno delovanje ROS v koži, ki omogoča širjenje tumorja, obstaja čedalje več dokazov (2).

Imajo pa radikali tudi nekatere pozitivne lastnosti, saj so vključeni v številne biološke procese. Celice se na nizke koncentracije reaktivnih zvrsti (npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) odzovejo z razmnoževanjem,  $\text{NO}$  pa je zelo pomemben kot signalna molekula, saj kot primarni prenašalec deluje vazodilatatorno in antitrombotično.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ter  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sta pomembni komponenti redoks signaliziranja, prav tako pa se večje količine teh reaktivnih zvrsti tvorijo pri vnetnih procesih pri vdoru patogenov v telo in jih na ta način poškodujejo in uničijo (6, 13).

### **1.3.2 Obramba kože pred radikali**

Tudi v normalnih fizioloških procesih, npr. v procesu celičnega dihanja, v organizmu nastajajo radikali, zato je telo razvilo organizirano obrambo pred njimi, in sicer na treh

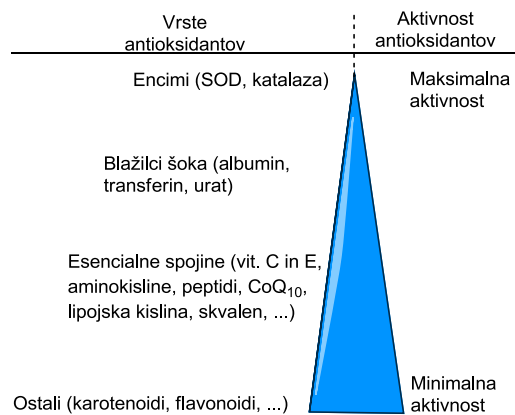
ravneh: na molekulski (lovilci radikalov, antioksidanti), encimski in metabolični. Lahko pa obrambne mehanizeme pred radikali razdelimo tudi na primarne, sekundarne in terciarne. Pri primarnih gre za preprečevanje nastanka radikalov. Radikale sicer nevtralizirajo sekundarni mehanizmi, za popravilo morebitnih poškodb zaradi delovanja radikalov pa poskrbijo terciarni (7).

Najpomembnejši antioksidanti v koži so vitamin E (tokoferol), vitamin C (askorbinska kislina), sistem ubikinon/ubikinol, GSH, melanin in drugi. Za učinkovito delovanje obrambnega sistema so potrebni stalna in ustrezna prisotnost antioksidantov, aktivnost encimov in zagotavljanje metabolične energije. UV žarki najprej povzročijo znižanje koncentracije antioksidantov, sledi upad encimske aktivnosti, težave z regeneracijo obrambnih snovi, na koncu pa se pojavijo spremembe na kolagenskih ter elastinskih molekulah (1).

#### **1.4 ANTIOKSIDANTI**

Biološki antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani možnost oksidativne poškodbe tarčne molekule, tako da reagira z radikali in zaustavi verižne radikalske reakcije (6, 7). Te snovi imajo v svoji strukturi najpogosteje prisoten reaktiven vodik, ki se zlahka odcepi in veže na radikal. Pri tem nastane nov, stabilnejši radikal, ki je zato manj škodljiv. Aktivnost antioksidantov je odvisna od števila »protiradikalskih« skupin, pri čemer je pomembnejša struktura aktivne skupine, kot pa struktura celotne spojine (14).

Poznamo več delitev antioksidantov. Lahko jih razdelimo na endogene (npr. encimski sistemi) in eksogene, ki jih vnašamo v telo s hrano (npr. vitamini). Glede na kemijsko strukturo jih delimo na encimske in neencimske (npr. GSH, vitamini). Najpomembnejši encimski antioksidanti v organizmu so katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD), glutathion reduktaza (GR) in glutathion peroksidaza (GPx). Ti so tudi najučinkovitejši, saj se njihova koncentracija prilagodi potrebam po zmanjšanju oksidativnega stresa (Slika 1). Glede na topnost jih delimo na lipofilne, ki se nahajajo v celičnih membranah in lipoproteinih (vitamin E, ubikinon), hidrofilne, ki so v vodnih sredicah (vitamin C) in amfifilne (GSH, lipojska kislina). Od njihove topnosti je tudi odvisno, kje bodo delovali. Tako lipofilni delujejo v celičnih membranah, hidrofilni pa v krvni plazmi in citosolu (15).

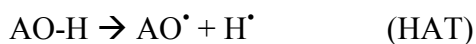


**Slika 1:** Antioksidantna hierarhija.

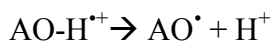
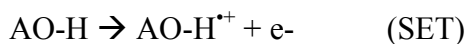
Delovanje antioksidantov lahko ločimo na preprečevalno in popravljalo. Načine tovrstnega delovanja pa ločimo na:

- katalitično odstranjevanje radikalov in reaktivnih zvrsti (CAT, SOD, peroksidaza, ...);
- lovljenje radikalov z lovilci, ki reagirajo z radikali in jim donirajo H-atom, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem dobijo lastnosti stabilnejših radikalov, ki ne morejo več reagirati dalje (npr. vitamin C, GSH);
- keliranje s kelatorji, ki vežejo kovinske ione (železa, bakra, ...) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter tako preprečijo nastanek hidroksilnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov; tako delujejo nekateri proteini, npr. transferini;
- adiranje na dvojno vez – nanjo se adirajo singletni kisik ali pa drugi radikali (7, 16).

Eden od možnih mehanizmov, s katerim antioksidanti deaktivirajo radikal, je odtegnitev (abstrakcija) vodikovega atoma (*hydrogen atom abstraction* ali *hydrogen atom transfer* - HAT):



Drug možen mehanizem je prenos elektrona (*single electron transfer* - SET), kjer tvorbi radikalskega kationa sledi deprotonacija:



Dobro znani antioksidanti, ki reagirajo po mehanizmu HAT so npr.  $\alpha$ -tokoferol, kurkumin, epigalokatehin galat, idr. (17).

V posamezni rastlini, sadju ali zelenjavi se pogosto nahaja več različnih antioksidantov s sinergističnim delovanjem, torej so antioksidanti učinkovitejši v kombinacijah (2, 3).

### 1.4.1 Uporaba antioksidantov v kozmetičnih izdelkih

Ker se populacija stara, bi se moral dermatološki poudarek premakniti iz kozmetičnega omiljenja posledic staranja kože na zmanjšanje vzročnih dejavnikov povezanih s problemom staranja kože (4). Z vgrajevanjem spojin z antioksidativnim učinkom v kozmetične izdelke želimo zaščititi kožo pred oksidacijskimi procesi, seveda pa s tem ščitimo tudi oksidativno občutljive spojine v samem izdelku. Za doseg želenih učinkov moramo uporabiti zelo učinkovite antioksidante. Žal pa so ti zelo reaktivni in posledično nestabilni, kar pri vgrajevanju v kozmetične izdelke predstavlja velik problem. Pri izbiri antioksidanta moramo vedeti, katere so tiste sestavine, ki jih želimo zaščititi, kakšne vrste je izdelek (emulzija V/O ali O/V, gel, vodna raztopina), stabilnost antioksidanta v izbrani obliki ter kako ga koža sprejme (10).

Vitamin E, vitamin C, koencim Q<sub>10</sub> in  $\alpha$ -lipojska kislina so najpomembnejši antioksidanti v koži, ki ščitijo kožne lipide pred oksidacijo, DNA pa pred poškodbami z radikali.

Vitamin E je glavni lipofilni antioksidant v vseh plasteh kože in tudi najbolj uporabljen naravni antioksidant v dermalnih pripravkih. Prosta oblika tega vitamina je precej nestabilna in občutljiva na svetlobo, zato aktivno hidroksilno skupino zaščitijo s tvorbo estra z očetno ali jantarno kislino. Takšen derivat vitamina E je stabilnejši, za antioksidativno učinkovitost pa je potrebna predhodna metabolna aktivacija, to je hidroliza estra, ki mora poteči *in vivo* (9, 18).

Vitamin C se nahaja v krvni plazmi, kjer ščiti lipide pred peroksidacijo, sodeluje pa tudi pri sintezi kolagena. Deluje kot lovilec radikalov ob nanosu na kožo v obliki kozmetičnega izdelka, pogosteje pa se uporablja za zaščito izdelka samega. Najpogosteje v kozmetične izdelke vgrajujemo njegove estre, ki so stabilnejši, bolj kompatibilni, ne iritirajo kože ter lažje penetrirajo vanjo.

V epidermisu pa je zelo pomemben tudi ubikinol, ki je reducirana oblika koencima Q<sub>10</sub>. Je lovilec radikalov in ima večji redukcijski potencial kot vitamina C in E. Hitro reagira z radikali in dobro prehaja v globlje plasti kože. Tako pride do zmanjšanja kožnih gub, povečanja sinteze DNA in hialuronske kisline ter do inhibicije povečanja izražanja kolagenaze v fibroblastih. Njegove prednosti so, da je termo- in fotostabilen, ni citotoksičen in ne povzroča iritacij. Težave pri vgrajevanju v kozmetične izdelke predstavlja njegova lipofilnost, kristalizacija pri temperaturah nižjih od 40°, visok redukcijski potencial in izrazita obarvanost (10). Zato se v kozmetiki namesto reducirane oblike ubikinola običajno uporablja njegova oksidirana oblika, ubikinon.

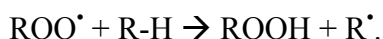
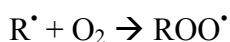
Pojavlja se veliko novih študij, ki obljublajo pozitivne učinke rastlinskih antioksidantov (polifenoli iz zelenega čaja, sojini izoflavoni, tanini iz granatnih jabolk in resveratrol iz grozdnih pešk). Prav tako preučujejo tudi učinkovitost različnih kombinacij antioksidantov, npr. folne kisline in kreatina, askorbinske kisline in  $\alpha$ -tokoferola, itd. (5).

#### 1.4.2 Posledice prisotnosti radikalov v koži in v kozmetičnih izdelkih

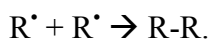
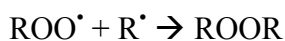
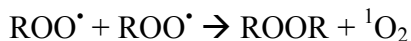
Lipidna peroksidacija je radikalski proces, ki je primer verižne radikalske reakcije in obsega iniciacijo, propagacijo in terminacijo (19). Na začetku reakcije oz. pri iniciaciji pride do homolitske cepitve kovalentne vezi, pri čemer se tvorita alkilni radikal in atomarni vodik:



Sledi propagacija, kjer nastali radikali reagirajo z neradikalom, pri čemer nastane nov lipidni radikal ( $R^{\bullet}$ ), lipidni peroksilni radikal ( $ROO^{\bullet}$ ) in produkt razgradnje maščobnih kislin - hidroperoksid ( $ROOH$ ) (10):



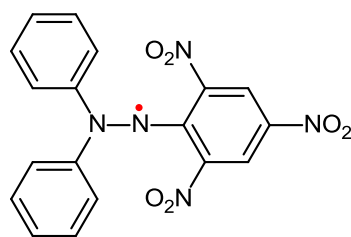
Zaključek oz. prekinitev reakcije imenujemo terminacija, kjer se dva radikala povežeta, pri čemer nastane neradikal in nadaljevanje radikalske reakcije ni več mogoče:



Cilj delovanja antioksidantov je druga faza, v kateri antioksidanti donirajo vodikove atome lipidnim ali peroksilnim radikalom. Radikali, ki nastanejo iz antioksidantov, vsebujejo molekulske strukture kot so npr. fenoli, ki so bolj stabilni in zaustavijo nadaljnjo verižno reakcijo oksidacije (20).

#### 1.5 METODA DPPH

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) je dokaj stabilen radikal, ki ima en nesparjen valenčni elektron na enem N atomu v dušikovem mostu (Slika 2) (21). Je temno vijolične barve, v prisotnosti donorja vodikovega atoma (antioksidant) pa preide v reducirano obliko, ki je rahlo rumenkasta zaradi prisotnosti pikrilne skupine (16, 22). Antioksidant, ki lahko donira več H atomov, reducira več molekul DPPH in obarvanost spojine po končani reakciji je manjša (23).

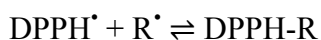
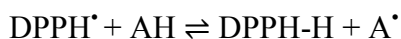


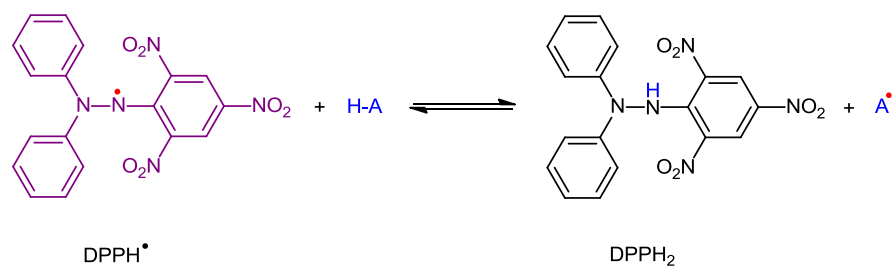
Slika 2: Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila.

Kolorimetrična metoda, ki jo je prvič uporabil Blois leta 1958, temelji na redukciji radikala DPPH, ki močno absorbira pri 515-520 nm (24). Test se izvaja pri sobni temperaturi, kar prepreči razpad testiranih molekul (20). Uporabljamo primerno topilo, ki je pri tej valovni dolžini transparentno. Seveda je pomembno tudi to, da je preiskovana spojina v izbranem topilu dobro topna. Najpogosteje uporabimo metanol ali etanol, ne moremo pa uporabiti vode ali acetona, saj dajeta nizke vrednosti obsega redukcije, poleg tega pa DPPH v vodi ni topen (22). Pri reakciji gre za prenos vodikovih atomov iz antioksidanta. Parameter, ki ga spremljamo, je absorbanca, ki s časom upada.

V uporabi so različni protokoli, ki se razlikujejo glede na uporabljene koncentracije DPPH (22,5 – 250  $\mu\text{M}$ ), inkubacijske čase (5 min – 1 h), reakcijsko topilo in pH vrednosti reakcijske zmesi. Previsoka koncentracija DPPH v reakcijski zmesi ima za posledico višjo absorbanco, kot jo izmerimo pri še zanesljivih spektrofotometričnih meritvah (absorbanca mora biti nižja od 1,0). Večina študij temelji na izbranem reakcijskem času, namesto na celotnem času, ki je dejansko potreben, da redoks reakcija poteče do konca in se vzpostavi dinamično ravnotežje (24). Posledica razlik v reakcijskih pogojih so zelo različni rezultati za standardne antioksidante, kot sta askorbinska kislina in butil-hidroksitoluen (BHT). Zato je praktično nemogoče primerjati rezultate različnih raziskav. Na absorbanco DPPH prav tako vplivajo svetloba, kisik in pH vrednost reakcijske zmesi (21, 25). Dobro je uporabiti tudi standard oziroma pozitivno kontrolo (vitamin C, vitamin E), da preverimo, ali je bil postopek izveden pravilno (22). Reakcijski mehanizem med antioksidantom in DPPH je odvisen od strukturne konformacije antioksidanta (20).

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH-H) je stabilen produkt reakcije med DPPH<sup>•</sup> in antioksidantom AH:





**Slika 3:** Reakcija DPPH z antioksidantom.

Zaradi reverzibilnosti reakcije med DPPH<sup>•</sup> in antioksidantom, redukcija radikala ni popolna, saj se DPPH-H pretvori v DPPH<sup>•</sup> (Slika 3). Reverzibilnost reakcije ocenimo z dodajanjem DPPH-H na koncu reakcije. Če se količina DPPH<sup>•</sup> poveča na platoju, je reakcija reverzibilna, v nasprotnem primeru pa je ireverzibilna. Zaradi reverzibilnosti reakcije lahko antioksidant smatramo za manj učinkovitega (24). Bolj kot je reakcija počasna, bolj kompleksen je njen mehanizem (20).

Stehiometrija nam pove, koliko molekul DPPH se reducira z eno molekulo reducenta (antioksidanta), vendar pa je to pogosto le teoretičen parameter, saj je razmerje redko celo število in se ne ujema vedno s številom H-atomov, ki jih lahko antioksidant teoretično odda (22, 24, 26). Množenje vrednosti EC<sub>50</sub> s številom dve, nam poda teoretično stehiometrijo, torej učinkovito koncentracijo posameznega antioksidanta, ki je potrebna za 100% redukcijo DPPH<sup>•</sup> (19). Antioksidante so na podlagi obsega redukcije DPPH v metanolu razvrstili v tri skupine:

- spojine, ki spadajo v skupino s hitro kinetiko, vsebujejo izolirane vinil-alkohole (npr. askorbinska kislina), hitro prenesejo vodikov atom, njihova aktivnost pa je tako močna, da z DPPH<sup>•</sup> poteče ireverzibilna reakcija;
- spojine, ki spadajo v skupino s hitro + počasno kinetiko in vsebujejo vsaj p-kateholno skupino (npr. klorogenska kislina) ter imajo na začetku kratko, vendar hitro, nato pa počasno kinetiko;
- spojine s počasno kinetiko, ki vsebujejo samo skupine, sposobne le počasnega prenosa vodikovega atoma, npr. izolirane fenole (npr. hesperetin), pri čemer je reakcija reverzibilna, razmerje med koncentracijo antioksidanta in ustreznim zniževanjem koncentracije DPPH<sup>•</sup> pa ni linearno, temveč hiperbolično (14, 27).

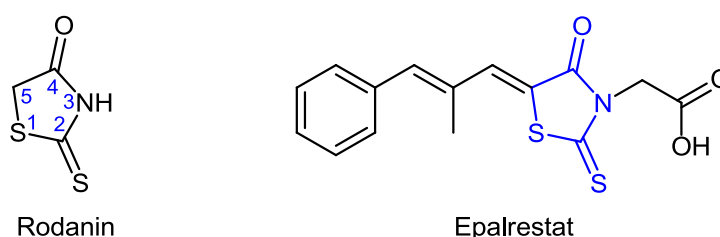
Vrednost EC<sub>50</sub> je efektivna koncentracija snovi, ki povzroči 50% znižanje začetne koncentracije DPPH. Večja kot je antioksidativna aktivnost, nižja je vrednost EC<sub>50</sub> (22, 28). Parameter je leta 1995 prvič uporabil Brand-Williams in je zelo uporaben, saj lahko te



vrednosti primerjamo ne glede na koncentracijo preiskovanih spojin (23). Točnost vrednosti  $EC_{50}$  je močno odvisna od natančnosti asimptote, to je končne koncentracije DPPH\*. Vrednost  $EC_{50}$  pa nam ne poda nikakršne informacije o hitrosti kinetike (27). Pogosto jo izrazimo z molskim razmerjem antioksidanta in DPPH\* ((mol/L) AO/ (mol/L) DPPH\*) (19). Veliko avtorjev uporablja parameter antiradikalska moč (ARP), ki je definiran kot recipročna vrednost  $EC_{50}$ :  $ARP = 1/EC_{50}$  (23).

## 1.6 RODANIN IN NJEGOVI DERIVATI

Rodanin sestavlja 5-členski obroč, ki vsebuje tiazolno jedro in karbonilno skupino na četrtem ogljiku (Slika 4). Ker so v preteklosti odkrili, da rodanini izkazujejo potencialno antidiabetično delovanje, se sedaj nekateri uporabljajo za zdravljenje diabetesa tipa 2. Epalrestat je reverzibilni inhibitor aldozne reduktaze in se uporablja za zdravljenje diabetične nevropatije, ki je eden od najpogostejših dolgoročnih zapletov pri bolnikih s sladkorno boleznijo (29, 30). Derivati rodanina so slabo topni v vodi, zato je njihova farmakološka uporabnost omejena. Vseeno pa nekateri med njimi izkazujejo pomembne biološke funkcije, kot so antibakterijsko, protiglivično, pesticidno, antihipertenzivno, antituberkulozno in antineoplastično delovanje. Lahko se uporabljajo tudi za zdravljenje revmatoidnega artritisa, osteoartritisa, degenerativne artroze in nekaterih težav povezanih z diabetesom (nevropatije, nefropatije, katarakte) (31). Delujejo tudi kot zaviralci nekaterih encimov, npr.  $\beta$ -laktamaze, aldozne reduktaze, histidinske dekarboksilaze, tirozinaze (29, 32).



**Slika 4:** Struktura rodanina z oštevilčenjem in zgradba epalrestata.

## 2 NAMEN DELA

V sklopu diplomske naloge bomo skušali določiti učinkovitost izbranih derivatov 5-benzilidenrodanina, kot potencialnih antioksidantov. S pomočjo UV-VIS spektroskopije bomo spremljali kinetiko redukcije DPPH z različnimi koncentracijami štirih izbranih 5-benzilidenrodaninov po Brand-Williamsovi metodi. Določili bomo učinkovite koncentracije izbranih spojin, ki bodo reducirale 50% začetne koncentracije DPPH ( $EC_{50}$ ).

Učinkovitost izbranih spojin kot potencialnih antioksidantov bomo nato ocenili na podlagi izračunanih vrednosti  $EC_{50}$ , ki jih bomo primerjali s hitrostjo redukcije z uveljavljenim antioksidantom  $\alpha$ -tokoferolom. Glede na to, da imajo izbrani derivati 5-benzilidenrodanina enak osnovni skelet, pričakujemo, da bomo lahko preko vrednosti hitrostnih konstant in  $EC_{50}$  ovrednotili elektronske in sterične vplive različnih funkcionalnih skupin.

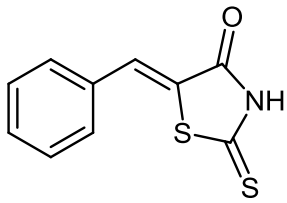
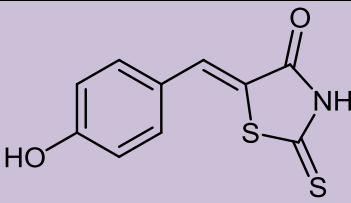
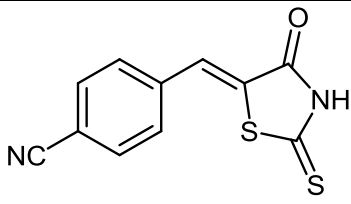
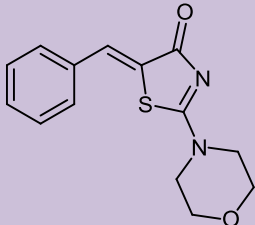
### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Spojine

Preiskovali smo štiri spojine (Preglednica I), ki so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Spremljali smo kinetiko njihove redukcije z DPPH, določili hitrostne konstante in efektivne koncentracije, ki so bile potrebne za redukcijo 50% začetne vrednosti DPPH ( $EC_{50}$ ).

Preglednica I: Predstavitev analiziranih spojin.

Spojina	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Kemijska struktura
<u>1</u>	5-benziliden-2-tioksotiazolidin-4-on	$C_{10}H_7NOS_2$	221,30	
<u>2</u>	5-(4-hidroksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on	$C_{10}H_7NO_2S_2$	237,30	
<u>3</u>	4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzonitril	$C_{11}H_6N_2OS_2$	246,31	
<u>4</u>	5-benziliden-2-morfolinotiazol-4(5H)-on	$C_{14}H_{14}N_2O_2S$	274,34	

### 3.1.2 Priprava spojin

a) Za spremljanje redukcije DPPH in določevanje hitrostnih konstant smo pripravili vzorce 1.400  $\mu\text{M}$  osnovnih raztopin spojin **1** – **3** v 5 mL metanola. Nadalje smo z njihovim redčenjem z metanolom pripravili vzorce spojin s koncentracijami, ki smo jih potrebovali za določanje kinetik redukcije DPPH (Preglednica II). Vzorci so bili lahko obarvani, vendar pa so morali biti bistri.

**Preglednica II:** Redčitve osnovnih raztopin preizkušanih spojin in njihove koncentracije za spremljanje kinetike redukcije z DPPH.

Vzorec	Koncentracija spojine ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracija spojine v reakcijski zmesi z DPPH ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracijsko razmerje c (DPPH) : c (analizirana spojina)
1	1.400	700	1:10
2	700	350	1:5
3	140	70	1:1
4	70	35	1:0,5

b) Za določitev efektivnih koncentracij, ki so bile potrebne za redukcijo 50% začetne koncentracije DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ) smo pripravili vzorce 2.500  $\mu\text{M}$  osnovnih raztopin spojin **1** – **4** v 10 mL metanola. Za pripravo ustreznih delovnih koncentracij smo jih redčili z metanolom (Preglednici III in IV).

**Preglednica III:** Koncentracije analiziranih spojin **1** in **2** za določitev vrednosti  $\text{EC}_{50}$ .

Vzorec	Koncentracija spojine ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracija spojine v reakcijski zmesi z DPPH ( $\mu\text{M}$ )	Koncentracijsko razmerje c (DPPH) : c (analizirana spojina)
1	1.000	500	1:4
2	750	375	1:3
3	625	312,5	1:2,5
4	500	250	1:2
5	375	157,5	1:1,5

6	250	125	1:1
---	-----	-----	-----

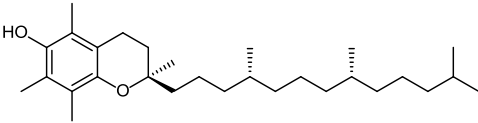
**Preglednica IV:** Koncentracije analiziranih spojin **3** in **4** za določitev vrednosti EC<sub>50</sub>.

Vzorec	Koncentracija spojine (μM)	Koncentracija spojine v reakcijski zmesi z DPPH (μM)	Koncentracijsko razmerje c (DPPH) : c (analizirana spojina)
1	2.500	1.250	1:10
2	1.875	937,5	1:7,5
3	1.250	625	1:5
4	833	416,5	1:3,33
5	625	312,5	1:2,5

### 3.1.3 Priprava vzorca standarda

Kot standard smo uporabili (±)-α-tokoferol, 95%, proizvajalca Acros Organics, ki je pri sobni temperaturi viskozna rumeno-rjava tekočina.

**Preglednica V:** Kemijske lastnosti (±)-α-tokoferola.

Spojina	IUPAC ime spojine	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Kemijska struktura
α-tokoferol	(2 <i>R</i> )-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-(4,8,12-trimetiltridecil)]-6-kromanol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430,71	

Za določitev učinkovite koncentracije α-tokoferola (EC<sub>50</sub>) smo pripravili vzorec 500 μM osnovne raztopine α-tokoferola. Z redčenjem z metanolom smo pripravili vzorce ustreznih koncentracij α-tokoferola.

**Preglednica VI:** Koncentracije vzorcev  $\alpha$ -tokoferola za določitev vrednosti  $EC_{50}$ .

Vzorec	Koncentracija spojine	Koncentracija spojine v reakcijski zmesi z DPPH ( $\mu$ M)	Koncentracijsko razmerje c (DPPH) : c ( $\alpha$ -tokoferol)
1	125	62,5	1:0,5
2	93,75	46,875	1:0,375
3	62,5	31,25	1:0,25
4	41,67	20,835	1:0,167
5	31,25	15,625	1:0,125
6	15,625	7,8125	1:0,0625

### 3.1.4 Kemikalije in reagenti

#### 2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH)

Najprej smo pripravili osnovno 700  $\mu$ M raztopino DPPH. V 25 mL merilno bučko smo približno natančno natehtali 6,90 mg DPPH in dodali približno 20 mL metanola ter raztopili kristale s stresanjem in soniciranjem z ultrazvokom. Nato smo merilno bučko dopolnili z metanolom do oznake, jo zaprli, ovili z aluminijasto folijo in raztopino hranili v hladilniku. Vsak dan smo pripravili svežo osnovno raztopino, saj se je na začetku eksperimentalnega dela izkazalo, da je DPPH v raztopini dokaj nestabilen, saj že po 24 urah koncentracije niso bile več primerljive.

Delovno, 140  $\mu$ M raztopino DPPH, smo pripravili iz osnovne raztopine tako, da smo v 10 mL penicilinko prenesli 4 mL metanola ter mu dodali 1 mL osnovne raztopine DPPH. Penicilinko smo zaprli s pokrovčkom in jo ovili z aluminijasto folijo, da smo jo zaščitili pred svetlobo. To raztopino smo nato uporabili za spremljanje kinetik redukcije DPPH ter določanje hitrostnih konstant.

Za določanje vrednosti  $EC_{50}$  smo potrebovali višjo koncentracijo osnovne raztopine DPPH kot za spremljanje kinetike redukcije, zato smo pripravili 10 mL 500  $\mu$ M osnovne raztopine v metanolu. To smo nato redčili na pol, tako da smo v penicilinko odmerili 5 mL metanola in dodali 5 mL raztopine DPPH ter tako dobili 250  $\mu$ M raztopino.

**Preglednica VII:** Kemikalije in reagenti, ki smo jih uporabili za pripravo raztopin DPPH in preiskovanih spojin.

Spojina	Kemijska formula	Molska masa (g/mol)	Proizvajalec
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394,32	SIGMA-ALDRICH
Metanol	$CH_3OH$	32,04	CARLO ERBA Reagents
Natrijev hidroksid	NaOH	56,11	Merck

### 3.1.5 Merilni pripomočki in aparati

Pri delu smo uporabili naslednje pripomočke:

- Polavtomatske pipete BRAND Transferpette®: 0,5 – 5 mL; Thermo SCIENTIFIC FINNPIPETTE® 100 – 1000 µL
- Nastavke za pipete, BRAND®
- 5 in 10 mL steklene penicilinke, neoLAB
- Plastične semi-mikro kivete 1,5 mL za enkratno uporabo, BRAND®
- Mikrotitrne plošče Techno Plastic Products®, 96 vdolbinic
- Parafilm M, BEMIS®
- Steklovino: 25 mL merilno bučko, stekleno palčko, čašo
- Kovinske žličke (različni proizvajalci)
- Osebna zaščitna sredstva.

Uporabili smo naslednje aparate:

- Analitski tehtnici AE240 in AG245, proizvajalca METTLER-Toledo
- UV-Visible spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca Varian, s programsko verzijo 3.00 (Slika 5)



**Slika 5:** UV-VIS spektrofotometer Cary 50.

- Ultrazvočni čistilnik Sonis 3, proizvajalca ISKRA Pio d.o.o.
- Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy HT Hybrid Reader, proizvajalca BioTek® Instruments, s programsko opremo Gen5, verzija 2.03.1 (Slika 6)



**Slika 6:** Čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy HT (BioTek®).

### **3.1.6 Računalniška programska oprema**

- Za risanje kemijskih struktur, poimenovanje spojin ter izračun molskih mas smo uporabili program ChemBioDraw Ultra, verzija 12.0.

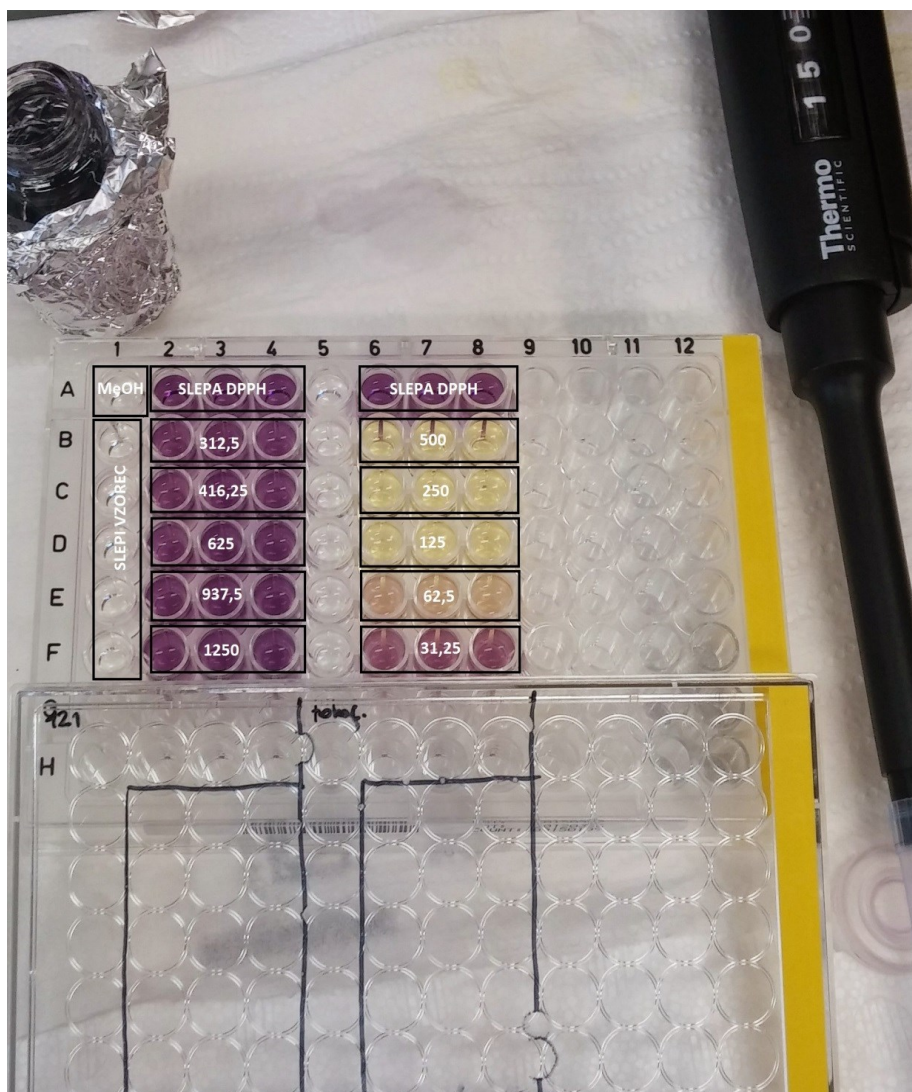


- Meritve absorbanc na spektrofotometru smo opravili s pomočjo programa Advanced Reads, Cary WinUV, Varian, verzija 3.00.
- Meritve absorbanc smo analizirali s programom MS Excel 2010; s tem programom smo izrisali tudi vse grafe.
- Protokol za meritve na mikrotitrskih ploščicah pri določanju vrednosti  $EC_{50}$  smo določili v programu Gen5, verzija 2.03.1.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Določanje vrednosti $EC_{50}$**

Meritve smo izvajali v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami, s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic. Na mikrotitrsko ploščico (Slika 7) smo lahko naenkrat nanesti vzorce treh različnih spojin, v šestih različnih koncentracijah, in sicer v triplicatih. V vsako vdolbinico smo nanesti po 150  $\mu$ L raztopine vzorca določene koncentracije in 150  $\mu$ L 250  $\mu$ M raztopine DPPH. Ploščico smo pustili v temi pri sobni temperaturi 90 minut, da je potekla redukcija DPPH, nato pa smo jo vstavili v čitalec in opravili meritev s pomočjo programske opreme Gen5 (BioTek). Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 517 nm. Meritve smo izvajali pri temperaturi 21,5°C, rezultate pa podali kot povprečne vrednosti absorbanc treh meritev.



**Slika 7:** Mikrotitrna ploščica po nanosu raztopin spojine **4** (desno) in  $\alpha$ -tokoferola (levo) ter DPPH.

Mikrotitrski čitalec ozadja ne odšteje samodejno, zato smo morali pri vsaki meritvi poleg vzorca nanesti tudi vzorec raztopine vsake preiskovane spojine same v metanolu, in na koncu njegovo absorbanco odšteti od absorbance analiziranega vzorca spojine.

Na podlagi izmerjenih rezultatov smo nato za vsako koncentracijo vsakega od vzorcev izračunali povprečje, odšteli ozadje ter izračunali vrednost  $EC_{50}$ .

### 3.2.2 Določanje kinetike redukcije DPPH in vrednosti hitrostnih konstant

Meritve smo opravili po prirejeni Brand-Williams-ovi metodi (19). Pred začetkom določanja kinetike redukcije DPPH smo najprej z UV-Vis spektrofotometrom posneli absorpcijski spekter raztopine DPPH in določili valovno dolžino maksimuma absorpcije. Absorpcijski maksimum je bil pri 517 nm, zato smo pri tej valovni dolžini izvedli tudi vse nadaljnje meritve.

Preverili smo tudi stabilnost radikala DPPH v metanolu: v kiveto smo odpipetirali 1 mL metanola in 1 mL osnovne raztopine DPPH ter 90 minut v časovnih intervalih na 10 sekund spremljali absorbanco pri valovni dolžini 517 nm, ki je morala ostati ves čas enaka. Ta postopek smo izvedli vedno pred začetkom merjenja vzorcev testnih spojin. Med potekom vseh meritev smo imeli kiveto ves čas pokrito s teflonskim pokrovčkom, da ni prišlo do izhlapevanja metanola, kar bi vplivalo na koncentracijo DPPH.

Med spremljanjem kinetike redukcije DPPH in preiskovanih spojin smo opazovali, kako različne koncentracije slednjih vplivajo na hitrost in končni delež redukcije radikala DPPH. Pred začetkom izvajanja meritev smo vedno posneli ozadje. Slepí vzorec za merjenje kinetike redukcije DPPH je bil čisti metanol, slepi vzorec za spremljanje kinetike redukcije testnih spojin pa smo pripravili tako, da smo v kiveto odpipetirali 1 mL metanola in 1 mL vzorca posamezne spojine z ustrežno koncentracijo.

Nato smo začeli z merjenjem kinetike redukcije DPPH, ob dodatku različnih koncentracij preiskovanih spojin. V kiveto smo prenesli 1 mL raztopine analizirane spojine z določeno koncentracijo (1.400, 700, 140 in 70  $\mu\text{M}$ ) in 1 mL 140  $\mu\text{M}$  DPPH ter vsebino dobro premešali s pipeto. Kiveto smo pokrili s teflonskim pokrovčkom in jo vstavili v spektrofotometer. Vsako meritev smo vedno začeli 30 sekund po dodatku raztopine DPPH. Absorbance smo izmerili pri valovni dolžini 517 nm, vsakih 10 sekund. Avtomatsko zajemanje podatkov se je ustavilo po 90 minutah. Meritve smo izvajali pri sobni temperaturi ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### 3.2.3 Določanje hitrostnih konstant in izračun vrednosti $\text{EC}_{50}$

a) Za vsako preiskovano spojino smo s pomočjo kinetike redukcije DPPH določili hitrostne konstante pri različnih koncentracijah, in sicer po Enačbi 1.

$$\ln\left(\frac{1 - \frac{\text{Abs}_f}{\text{Abs}_0}}{1 - \frac{\text{Abs}_f}{\text{Abs}_0}}\right) = -k \frac{\text{Abs}_f}{\epsilon} t \quad (\text{Enačba 1}) \quad (33),$$

kjer je:

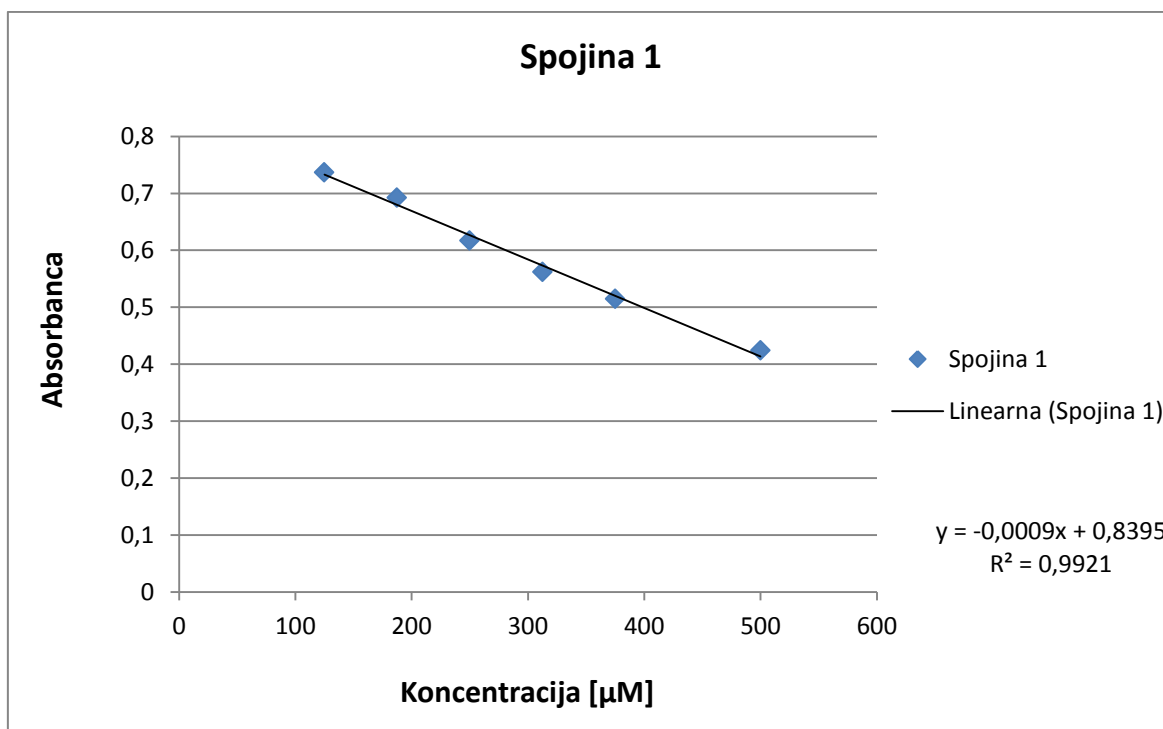
$\text{Abs}_f$	absorbanca ob koncu meritve	$k$	hitrostna konstanta
$\text{Abs}_0$	absorbanca ob času nič	$\epsilon$	molarni absorpcijski koeficient
$\text{Abs}$	absorbanca ob danem času	$t$	čas



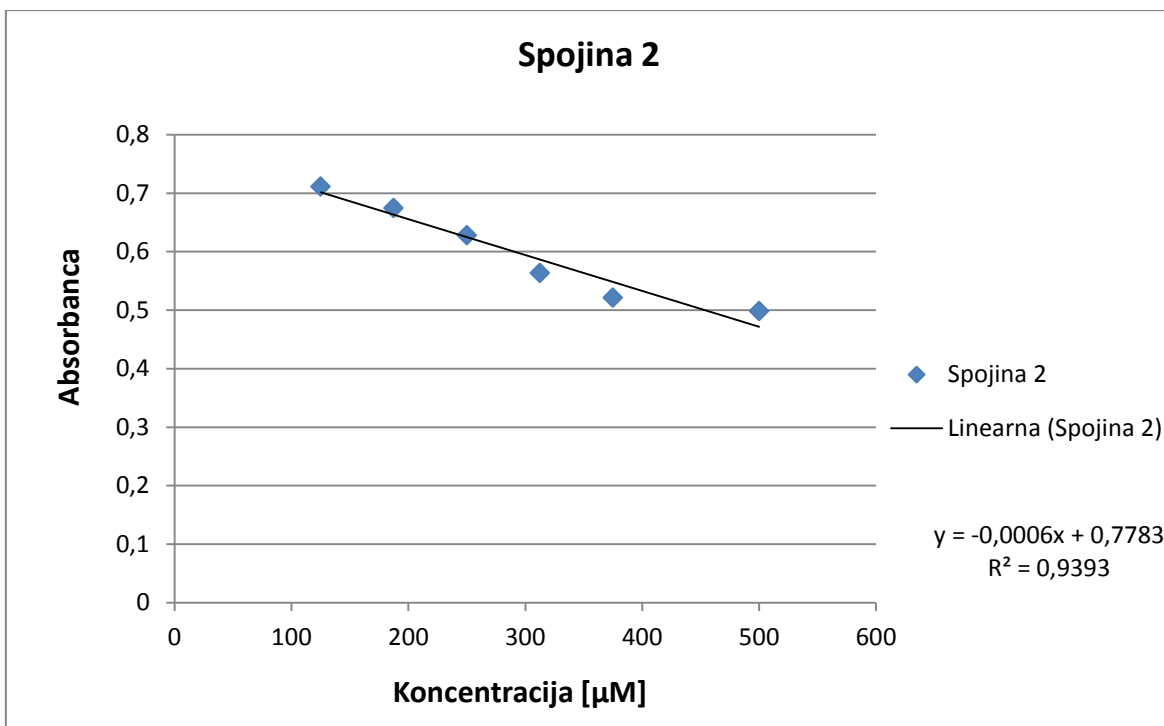
## 4 REZULTATI

Pri preučevanju antioksidativnega delovanja štirih spojin, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, smo spremljali kinetiko redukcije DPPH, ki so jo le-te kazale pri različnih koncentracijah in izračunali hitrostne konstante za vsako od njih. Določili smo tudi vrednosti  $EC_{50}$  za vsako spojino, in sicer pri šestih različnih koncentracijah ter rezultate primerjali s tistimi, ki smo jih določili za standardni antioksidant  $\alpha$ -tokoferol.

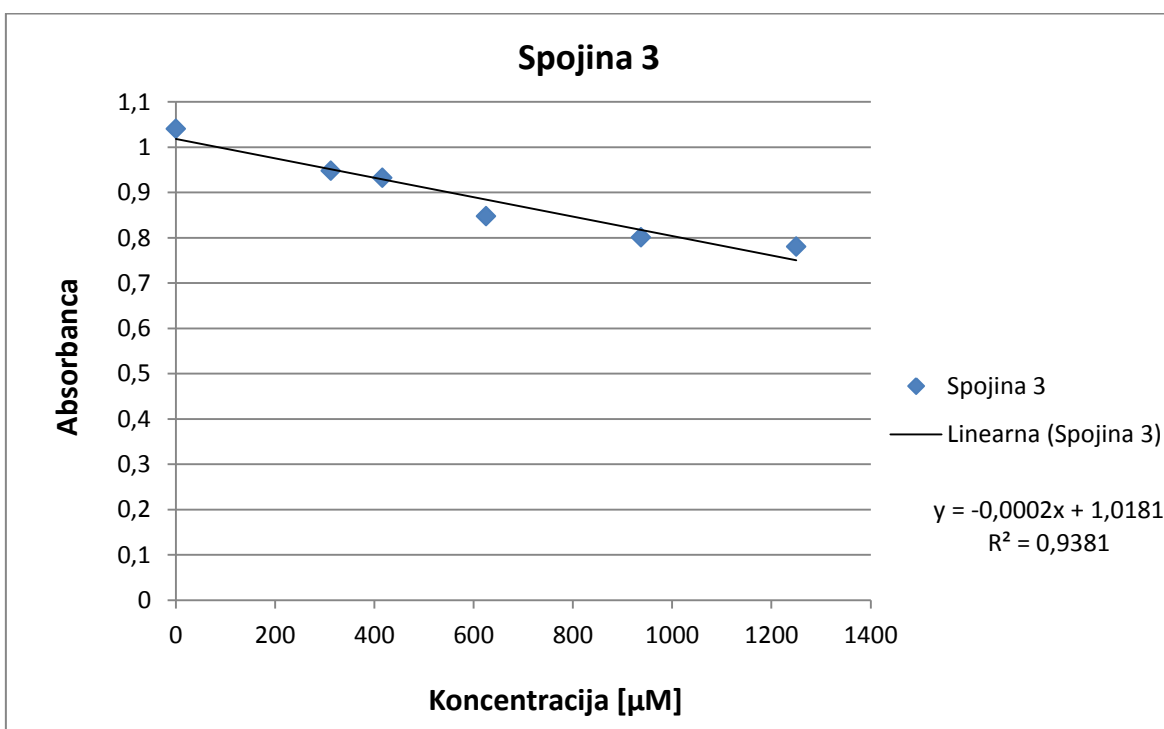
### 4.1 KVANTITATIVNO DOLOČANJE VREDNOSTI $EC_{50}$



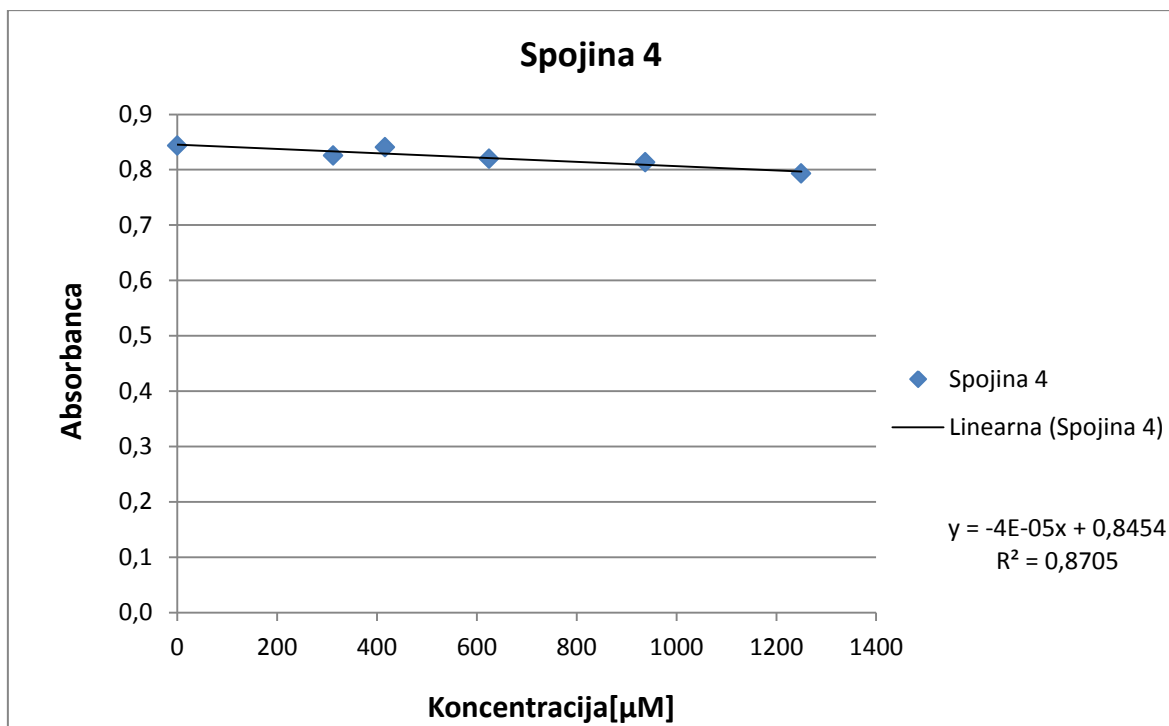
**Graf 1:** Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 1.



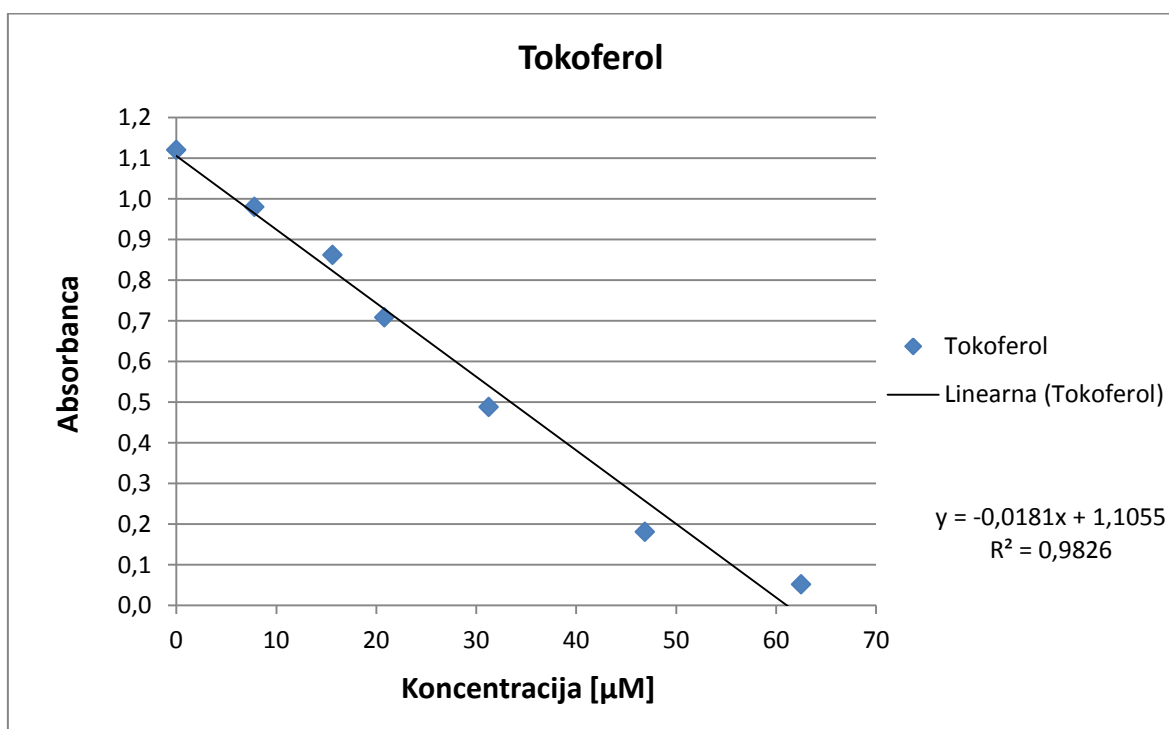
**Graf 2:** Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 2.



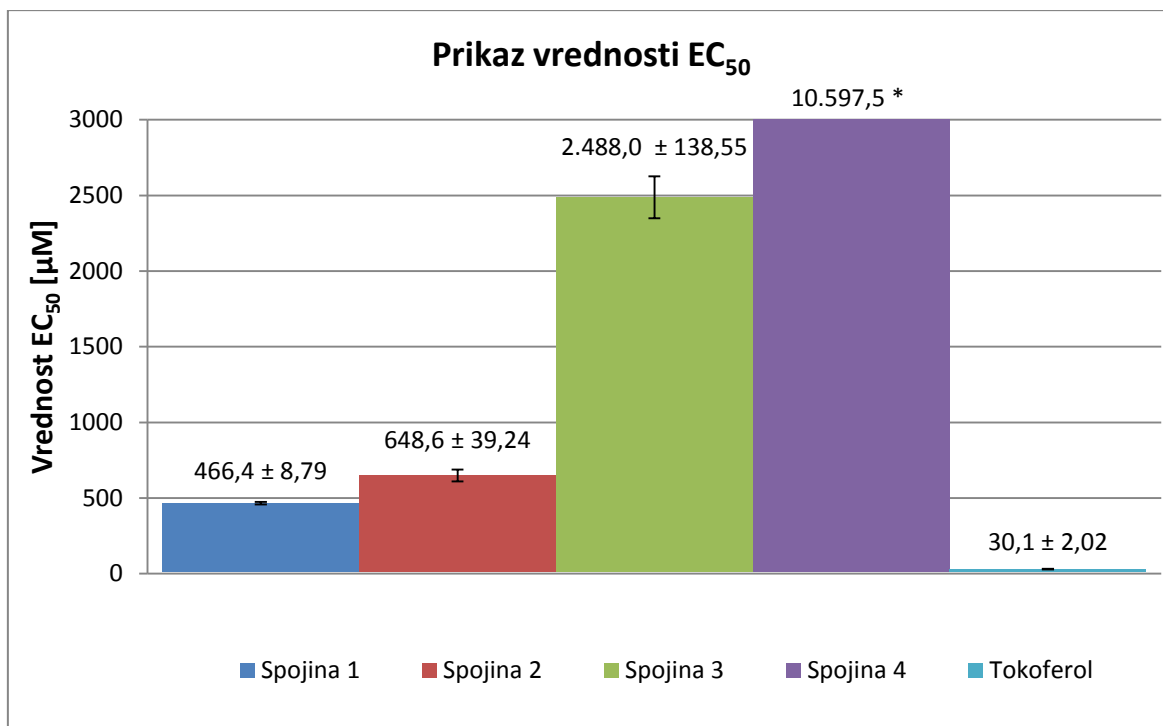
**Graf 3:** Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 3.



Graf 4: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij spojine 4.



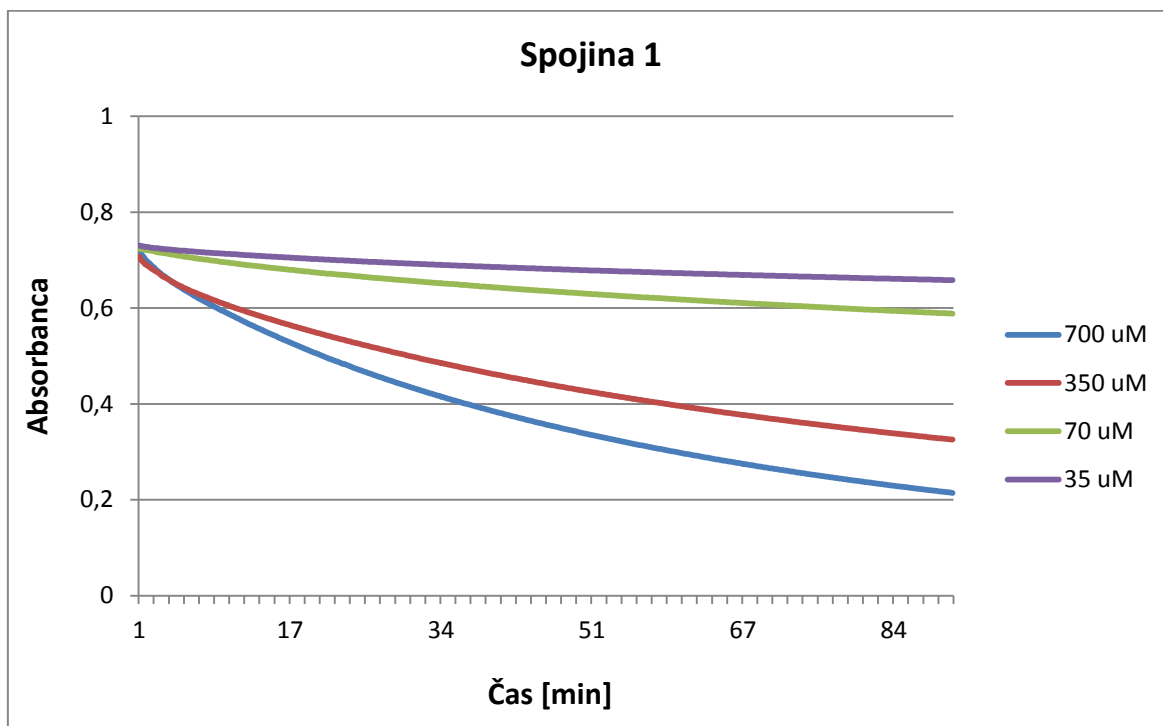
Graf 5: Absorbanca DPPH v prisotnosti različnih koncentracij  $\alpha$ -tokoferola.



**Graf 6:** Grafični prikaz vrednosti EC<sub>50</sub> s standardnimi napakami za spojine 1-4 in α-tokoferol.

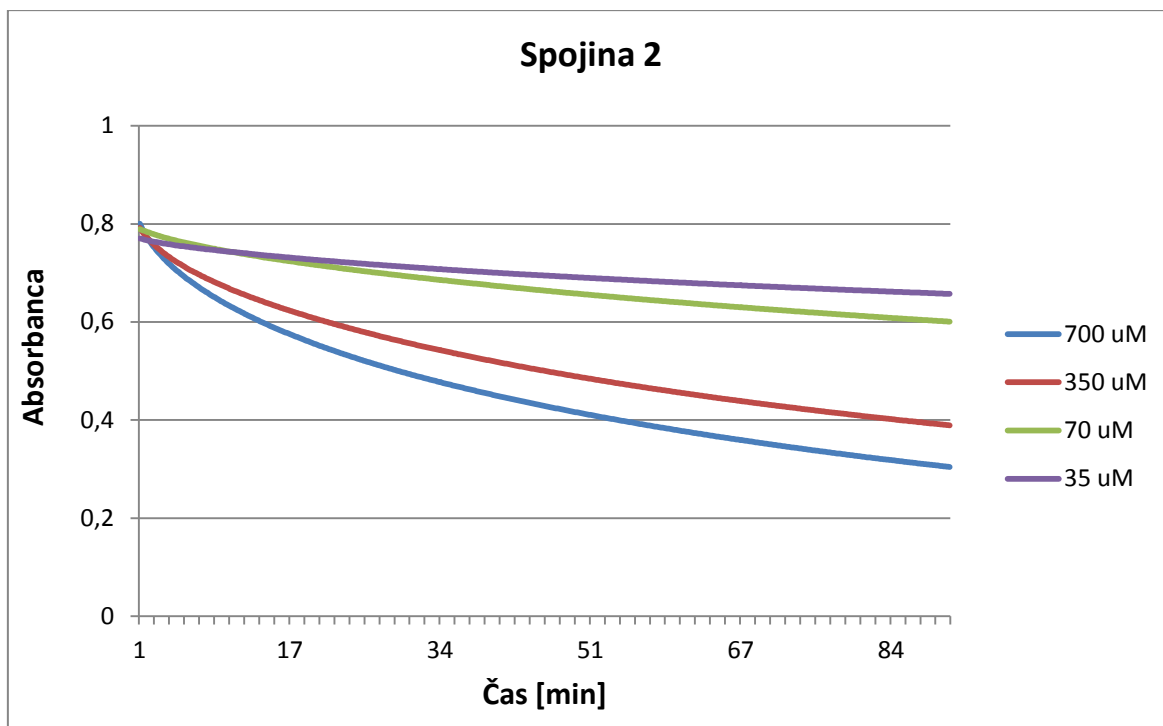
\*Opomba: Spojina nima antioksidativnih učinkov pri najvišji uporabljeni koncentraciji.

## 4.2 KINETIKA REDUKCIJE DPPH IN IZRAČUN HITROSTNIH KONSTANT

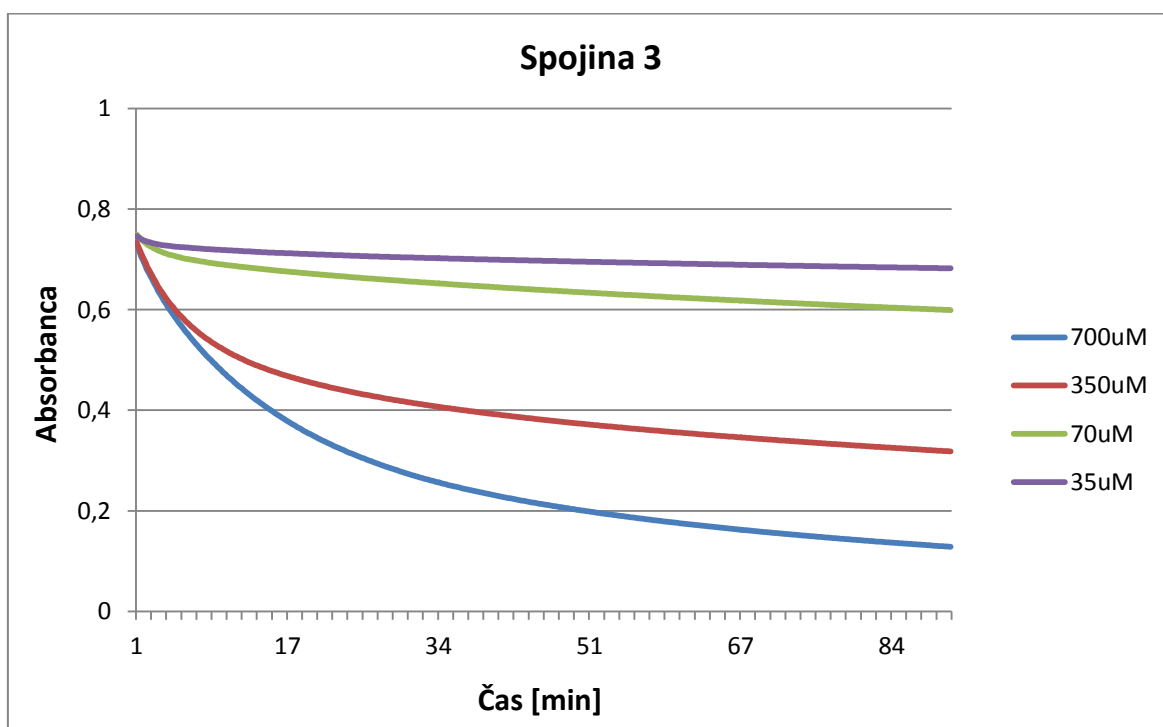


**Graf 7:** Kinetike redukcije DPPH z različnimi koncentracijami spojine 1.





**Graf 8:** Kinetike redukcije DPPH z različnimi koncentracijami spojine 2.



**Graf 9:** Kinetike redukcije DPPH z različnimi koncentracijami spojine 3.

**Preglednica VIII:** Odstotki preostalega DPPH v raztopini po 90 minutah spremljanja kinetike njegove redukcije.

<b>Spojina</b>	<b>Koncentracija [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>% DPPH</b>
<u>1</u>	700	29,85
<u>1</u>	350	46,03
<u>1</u>	70	81,35
<u>1</u>	35	90,11
<u>2</u>	700	38,01
<u>2</u>	350	49,17
<u>2</u>	70	76,10
<u>2</u>	35	85,34
<u>3</u>	700	17,54
<u>3</u>	350	43,37
<u>3</u>	70	79,94
<u>3</u>	35	91,36

Za kvantitativno določanje hitrostnih konstant smo uporabili molarni absorpcijski koeficient DPPH, ki smo ga izračunali z uporabo Enačbe 2:  $1,18 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Preglednica IX:** Hitrostne konstante psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 1.

<b>Spojina <u>1</u></b>	<b>700 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>350 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>70 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>35 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Hitrostna konstanta [<math>\text{L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}</math>]</b>	11,02	7,26	6,02	7,18

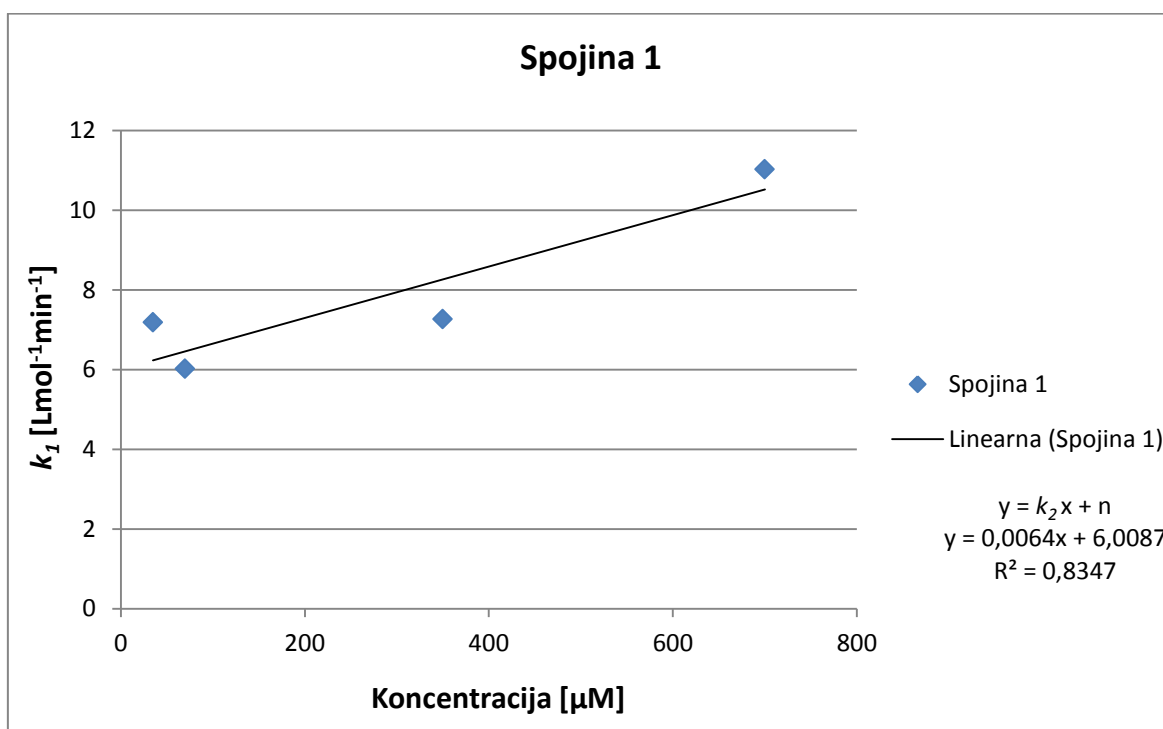
**Preglednica X:** Hitrostne konstante psevdo-prvega reda za različne koncentracije spojine 2.

<b>Spojina <u>2</u></b>	<b>700 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>350 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>70 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>35 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Hitrostna konstanta [<math>\text{L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}</math>]</b>	11,64	9,10	5,90	5,39

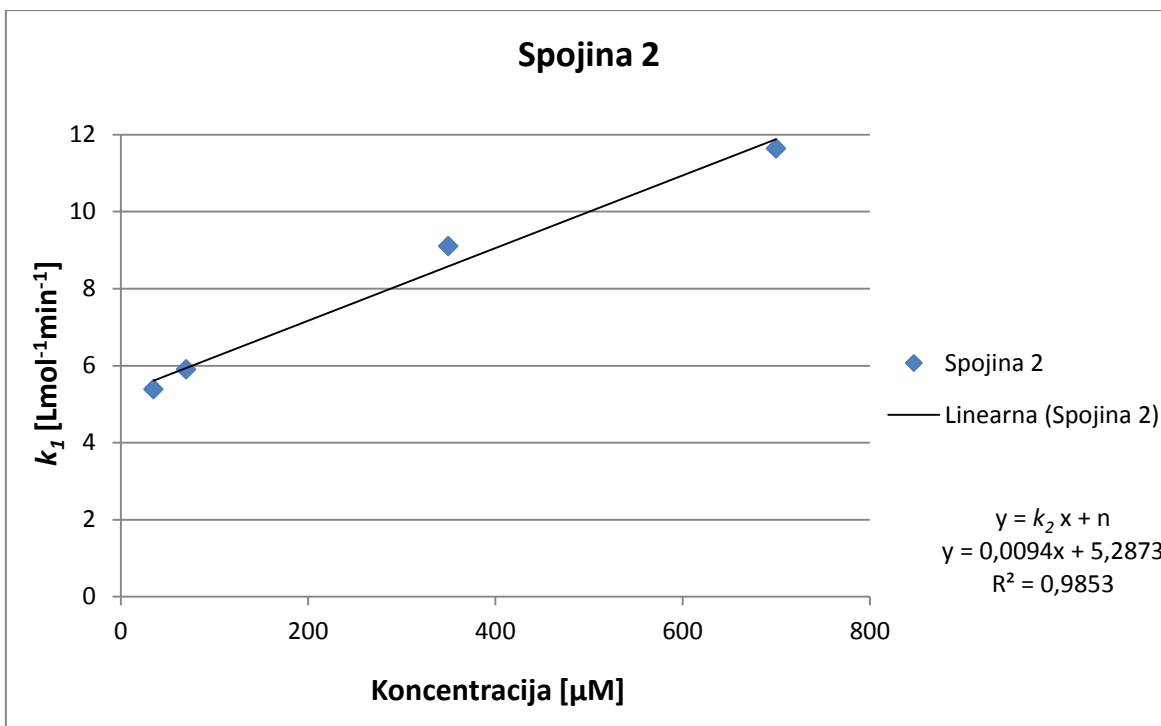
Preglednica XI: Hitrostne konstante psevdoprvega reda za različne koncentracije spojine 3.

Spojina <u>3</u>	700 $\mu\text{M}$	350 $\mu\text{M}$	70 $\mu\text{M}$	35 $\mu\text{M}$
Hitrostna konstanta [ $\text{L mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]	18,40	18,57	7,88	8,66

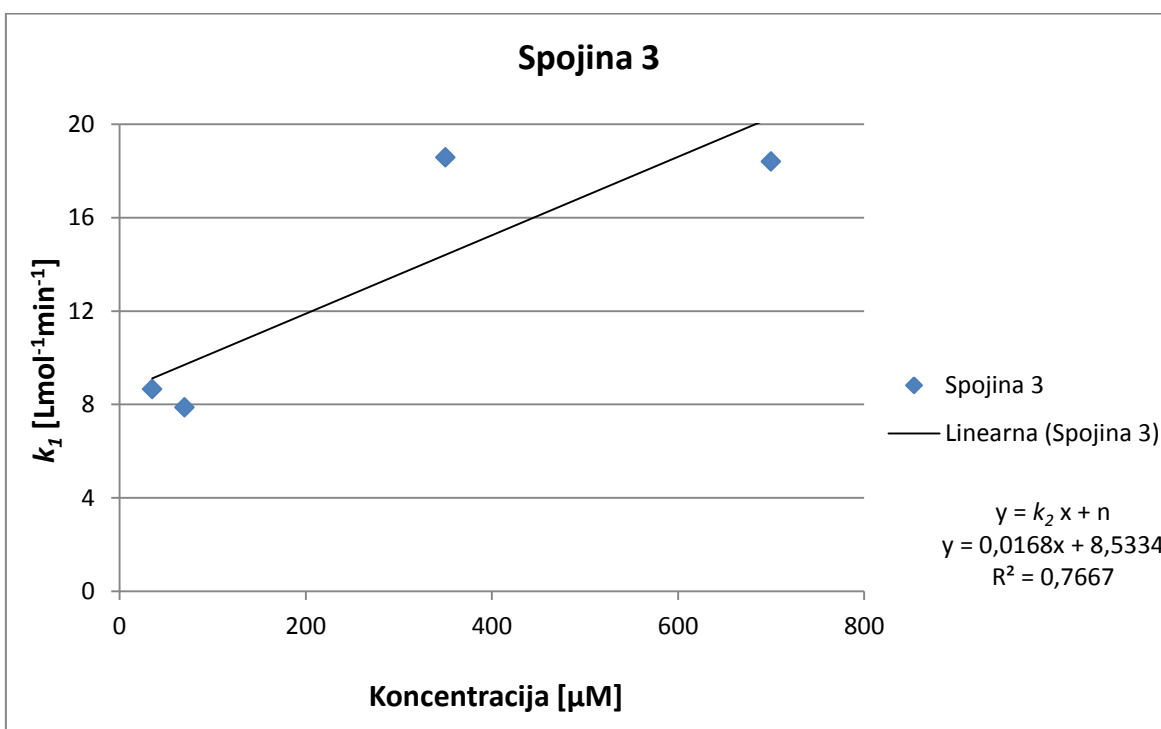
Hitrostne konstante psevdoprvega reda ( $k_1$ ) so navidezne konstante, odvisne od koncentracije, medtem ko so hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$ ) koncentracijsko neodvisne. Dobimo jih iz naklona linearne premice, ki jo prilegamo konstantam prvega reda na grafu, v odvisnosti od koncentracij analiziranega vzorca (34).



Graf 10: Grafični prikaz določanja hitrostnih konstant psevdoprvega reda za različne koncentracije spojine 1 in izračun hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$  - naklon premice).



**Graf 11:** Grafični prikaz hitrostnih konstant psevdoprvega reda za različne koncentracije spojine 2 in izračun hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$  - naklon premice).



**Graf 12:** Grafični prikaz hitrostnih konstant psevdoprvega reda za različne koncentracije spojine 3 in izračun hitrostne konstante drugega reda ( $k_2$  - naklon premice).

**Preglednica XII:** Vrednosti hitrostnih konstant  $k_2$  za analizirane spojine 1-3.

<b>Spojina</b>	<b>Hitrostna konstanta <math>k_2</math> [<math>\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}</math>]</b>
<b>Spojina <u>1</u></b>	$6,4 \times 10^{-3}$
<b>Spojina <u>2</u></b>	$9,4 \times 10^{-3}$
<b>Spojina <u>3</u></b>	$1,68 \times 10^{-2}$

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR KVANTITATIVNEGA DOLOČANJA VREDNOSTI EC<sub>50</sub>

Za pripravo raztopin vzorcev, DPPH in standarda ( $\alpha$ -tokoferol) za nadaljnje spremljanje kinetike redukcije DPPH, določanje hitrostnih konstant ter efektivne koncentracije EC<sub>50</sub>, smo za topilo izbrali metanol. V njem je DPPH dobro topen in stabilen, sam metanol pa bistveno ne vpliva na reakcijsko zmes. Ker kisik in svetloba vplivata na stabilnost DPPH, smo stekleno bučko z raztopino DPPH vedno dobro zatesnili, jo zaščitili pred svetlobo z alu folijo in največ 24 ur hranili v hladilniku pri 2 - 8°C. Oželek in sodelavci so namreč ugotovili, da izpostavljenost sončni svetlobi v 120 minutah zniža absorbanco DPPH za 20%, prav tako pa jo zniža tudi kisik, ki se v atmosferi nahaja v tripletnem stanju in neposredno reagira z molekulo DPPH v raztopini pod vplivom svetlobe (36).

Pri kvantitativnem določanju efektivne koncentracije, ki je potrebna za 50% zmanjšanje začetne koncentracije DPPH, smo v vdolbinice mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami v treh paralelkah za vsako testirano koncentracijo nanесли po 150  $\mu$ L preiskovanega vzorca določene koncentracije in 150  $\mu$ L 250  $\mu$ M raztopine DPPH (koncentracija DPPH v reakcijski zmesi je tako znašala 125  $\mu$ M).

Koncentracije vzorcev 1 in 2 v reakcijskih zmesih so bile nižje od koncentracij vzorcev 3 in 4. Sprva smo absorbance vseh preiskovanih vzorcev merili pri istih koncentracijah, vendar pa se je izkazalo, da rezultati pri spojinah 1 in 2 niso bili linearni, zato smo zanj izbrali nižje koncentracijsko območje. Tako je bilo v raztopini še dovolj DPPH, da smo ostali v linearnem območju. Za določanje efektivnih koncentracij EC<sub>50</sub> smo kot standard uporabili ( $\pm$ )- $\alpha$ -tokoferol, ki je ena od sinteznih oblik vitamina E. Pri  $\alpha$ -tokoferolu smo najprej izbrali previsoke koncentracije za določanje EC<sub>50</sub>, in sicer 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 62,5  $\mu$ M in 31,25  $\mu$ M, zato je redukcija DPPH potekla do končne točke že takoj ob njegovem dodatku v reakcijsko zmes, kar lahko vidimo na Sliki 7. Tokoferol kaže hitre spremembe v kinetiki redukcije in ne izkazuje dolgotrajnega učinka (37). Zato smo za preverjanje ustreznosti analizne metode za vrednotenje antioksidativnih lastnosti preiskovanih spojin izbrali nižje koncentracije standarda: 62,5  $\mu$ M, 46,9  $\mu$ M, 31,3  $\mu$ M, 20,8  $\mu$ M, 15,6  $\mu$ M ter 7,81  $\mu$ M. Pri vsaki analizirani spojini smo opravili tudi slepo meritev, torej meritev absorbance posameznega vzorca, raztopljenega v metanolu, brez dodatka DPPH, ker nam čitalec sam ni odšteval ozadja. To je pomembno zlasti takrat, ko

analizirana spojina absorbira svetlobo pri izbrani valovni dolžini, pri kateri merimo absorbanco DPPH. Prav tako smo pri vsakem vzorcu opravili tudi slepo meritev DPPH, torej samega DPPH brez dodatka analizirane spojine, da smo lahko določili začetno točko pri ničelni koncentraciji za posamezno testno spojino.

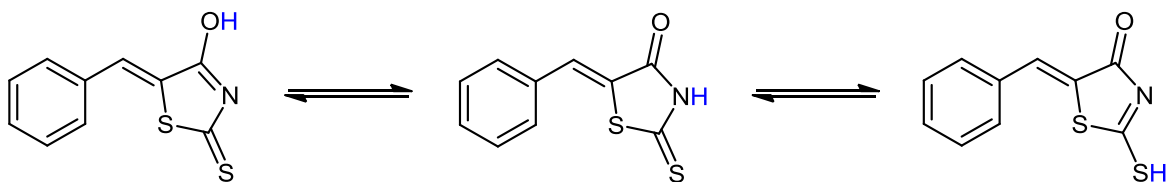
Da smo lahko pripravili najvišjo koncentracijo spojin **3** in **4**, smo jima dodali 100  $\mu\text{L}$  1 M raztopine NaOH kot topila za nastanek soli. Ker sta se ti spojini slabo raztapljali v vodi, bi njuna uporaba v kozmetičnih izdelkih s pretežno vodno sestavo lahko predstavljala težavo, zato bi morali za izboljšanje njune topnosti pripraviti vodotopni soli.

Določanje vrednosti  $EC_{50}$  ni vedno optimalna izbira, saj mora to potekati v linearnem območju analize metode, s čimer dobimo rezultate z manjšo napako. Odvisnost med deležem preostalega DPPH in koncentracijo antioksidanta naj bi bila linearna le do takrat, ko je v raztopini še več kot 60% DPPH. V primeru nelinearnega odnosa med koncentracijo antioksidanta in reduciranim DPPH pa ne moremo trditi, da velja naslednje: nižja kot je vrednost  $EC_{50}$ , bolj učinkovit je antioksidant. Za natančnejše rezultate bi lahko izvedli določitev  $EC_{20}$ , ki poda efektivno koncentracijo, ki je potrebna za 20% zmanjšanje začetne koncentracije DPPH, saj ta parameter omogoča rezultate v linearnem območju (23).

Dejansko smo tudi mi imeli težave z linearnostjo. Kadar je determinacijski koeficient regresijske premice v območju vrednosti 0,7 – 0,9, to kaže zgolj na visoko stopnjo linearne povezanosti, zato si želimo, da bi bila njegova vrednost nad 0,9 (38). Za natančnejše rezultate, oziroma rezultate z manjšo napako, mora biti na grafu odvisnosti odstotkov nereduciranega DPPH od koncentracije vsaj ena točka nad, ena pa pod vrednostjo  $EC_{50}$  (39). Pri spojinah **1**, **2** in **3** smo dobili zelo dobro prileganje premici, z vrednostjo determinacijskega koeficienta nad 0,9. Spojino **4** pa smo uporabili zgolj kot primer neučinkovitega antioksidanta, saj je iz Grafa 4 razvidno, da absorbanca pri različnih koncentracijah vzorca variira in ni linearna. Najbolj natančni sta bili meritvi spojine **1** in  $\alpha$ -tokoferola, kar je razvidno iz Grafov 1 in 5.

Iz enačb regresijskih premic smo nato izračunali vrednosti  $EC_{50}$ . Za spojino **1** je bila ta vrednost  $466,4 \pm 8,79 \mu\text{M}$ , za spojino **2** pa  $648,6 \pm 39,24 \mu\text{M}$ . Spojina **2** vsebuje na *para* mestu benzenovega obroča fenolno –OH skupino, ki lahko donira vodikov atom in zaradi katere bi jo lahko uvrstili med lovilce radikalov. Ko hidroksilna skupina odda vodik in dobi primanjkljaj elektrona, postane radikal, ki je stabiliziran z delokalizacijo nesparjenega elektrona po benzenovem obroču. Nekatere fenolne spojine lahko reducirajo toliko

molekul DPPH, kolikor imajo hidroksilnih komponent, reakcije pa potečejo zelo hitro. Pričakovali smo, da bo spojina **2** zaradi vezane –OH skupine precej reaktivnejša od spojine **1**, vendar pa rezultati kažejo drugače. Lahko bi sicer poskušali uvesti še kakšno hidroksilno skupino, vendar pa večje kot je število dodanih obročev na fenolnih spojinah in bolj kot so le-ti kompleksni, počasnejše so reakcije. Razlog za to je, da se morajo skupine, ki vstopajo v reakcije, pravilno orientirati proti središču DPPH, kjer je radikal. Najpomembnejši razlog, ki preprečuje antioksidativno delovanje fenolnih komponent, je sterično oviranje (40). Torej je trditev, da fenolne spojine reducirajo toliko molekul DPPH, kolikor imajo skupin –OH, neveljavna, saj so reakcije, kot smo že omenili, v večini primerov počasne in kompleksne (20). Vrednosti  $EC_{50}$  spojin **1** in **2** sta si dokaj podobni, in to kljub temu, da spojina **1** na fenilnem obroču nima vezane nobene hidroksilne skupine, ki bi lahko služila kot donor vodika. To si lahko razlagamo tako, da pri redukciji DPPH sodelujejo tudi vodikovi atomi, ki so vezani na dušik v rodaninskem obroču, o čemer je že poročalo nekaj avtorjev (28, 29, 41). Sicer pa je za antioksidativno delovanje ključna prosta tiolna (-SH) skupina ene od tautomernih oblik rodanina (Slika 8). Če ni žveplovega atoma na mestu 2 rodaninskega obroča, ni možne tiolne tautomerne oblike in zato v tem primeru praktično ni antioksidativnega delovanja.



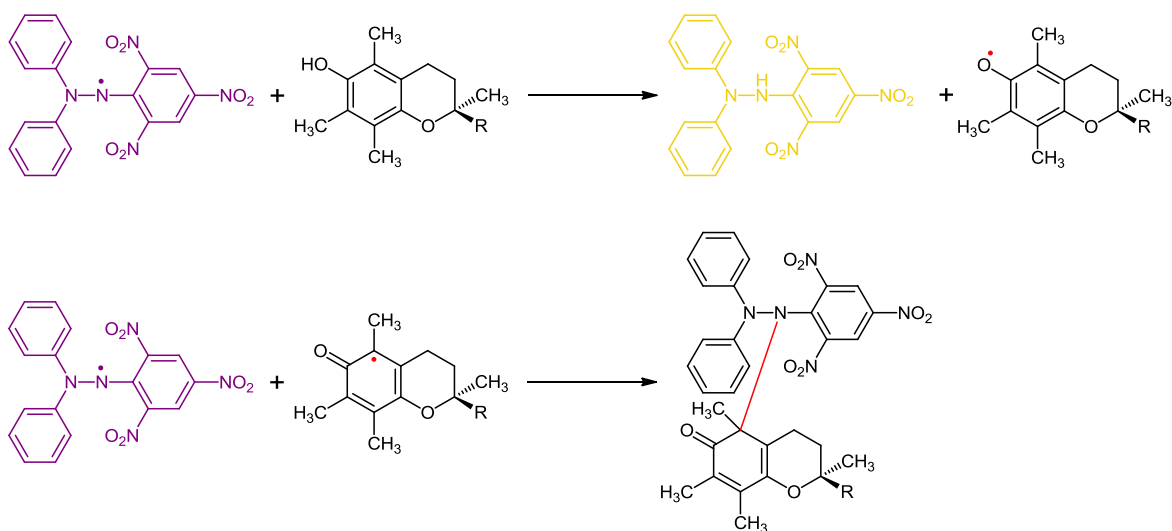
Slika 8: Tautomerija 5-benziliden-rodaninov.

Za spojino **3** je bila izračunana vrednost  $EC_{50}$   $2.488,0 \pm 138,55 \mu\text{M}$ . Spojina vsebuje ciano (-CN) skupino, ki privlači elektrone, s čimer stabilizira radikal, ki najverjetneje nastane z adicijo na dvojno vez na benzilnem ogljiku (42). Po drugi strani pa ciano skupina polarizira vez S-H v tiolni tautomeri obliki rodanina in s tem zmanjša možnost doniranja vodikovega atoma. Ker je skupina –SH bolj kislja, lažje odda proton in težje donira vodikov atom. Zato je spojina **3** slabši antioksidant kot spojini **1** in **2**.

Vrednost  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol je bila pričakovano najnižja, in sicer  $30,1 \pm 2,02 \mu\text{M}$ , torej je bil to najboljši reducent in antioksidant med preiskovanimi spojinami. Vrednosti  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol se sicer v literaturi v povprečju gibljejo okrog  $20 \mu\text{M}$ , vendar se precej



razlikujejo, tako da naš rezultat ne odstopa v veliki meri (24, 43). Reakcijski mehanizem med antioksidantom in DPPH je torej odvisen od strukture antioksidanta. Spojina  $\alpha$ -tokoferol vsebuje kromanolni obroč in izoprensko lipofilno stransko verigo. Hidroksilna skupina, ki je vezana na kromanolni obroč pa je odgovorna za antioksidativno delovanje, saj lahko odda vodikov atom (nastopa kot donor vodika), pri čemer nastane stabilna oblika DPPH-H (Slika 9).



Slika 9: Reakcija  $\alpha$ -tokoferola z DPPH.

Kljub temu, da vsebuje samo eno skupino  $-OH$ , lahko ena molekula  $\alpha$ -tokoferola reducira dve molekuli DPPH. Verjetno pride do dodatnih reakcij, ki so posledica dimerizacije tokoferilnega radikala ali reakcije med tokoferilnim radikalom in DPPH (39).

Radikal v molekuli DPPH je sterično oviran, saj se na eni strani radikala nahajata dva fenilna obroča, na drugi pa pikrilni obroč s tremi nitro skupinami, od katerih je ena nad, ena pod in ena v ravnini radikala. Zaradi te sterične oviranosti nekateri antioksidanti, ki sicer izkazujejo dobro antioksidativno delovanje *in vivo*, v testu DPPH *in vitro* delujejo kot antioksidanti s počasno kinetiko (40). Ob upoštevanju te predpostavke in ker je bila vrednost  $EC_{50}$  za tokoferol višja kot pri ostalih študijah, lahko sklepamo, da bi se morda lahko tudi naše preiskovane spojine izkazale kot boljši antioksidanti *in vivo*. Reakcije z radikali bi namreč lahko potekle hitreje, saj tisti, ki nastajajo *in vivo*, običajno niso sterično ovirani.

Za izračun natančnejših vrednosti  $EC_{50}$  pri tistih spojinah, pri katerih točke ne ležijo na premici, bi morali uporabiti kakšne druge statistične programe, npr. SigmaPlot ali GraphPad Prism, ki lahko upoštevajo več spremenljivk hkrati in omogočajo analizo z nelinearno regresijo (44).

## **5.2 KOMENTAR KINETIKE REDUKCIJE DPPH IN KVANTITATIVNEGA DOLOČANJA HITROSTNIH KONSTANT**

Najprej smo pripravili bolj koncentrirano osnovno raztopino DPPH, da bi se izognili napaki pri tehtanju, in sicer tako z 10-kratno koncentracijo, ki smo jo kasneje redčili 1/5 in tako dobili 140  $\mu\text{M}$  raztopino.

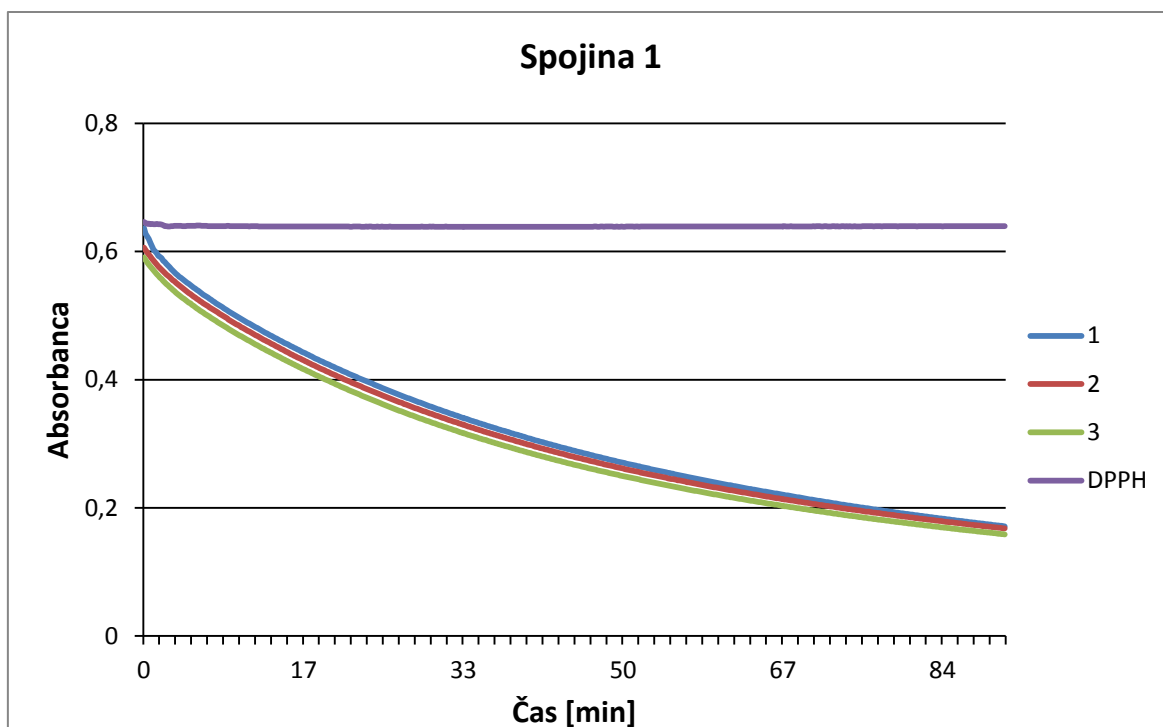
Pred začetkom spremljanja kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami smo vedno najprej preverili stabilnost DPPH v raztopini brez testne spojine. Absorbanca je morala biti v tem primeru ves čas merjenja konstantna. Na začetku izvajanja meritev smo absorbanco DPPH spremljali 90 minut, kasneje pa smo ta čas skrajšali na 5 minut, kar je bilo povsem dovolj. Na ta način smo se tudi prepričali, da bo dejansko prišlo do specifičnega upada absorbance pri spremljanju kinetike redukcije testnih spojin z DPPH izključno zaradi delovanja analiziranih spojin, in ne zaradi zunanjih dejavnikov, kot sta svetloba in kisik.

Zelo pomembno je, da vsako meritev kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami začnemo ob enakem času, saj je padec absorbance največji v začetnem delu reakcije. Zato smo z meritvijo absorbance začeli vedno 30 sekund po dodatku DPPH, saj smo nekaj časa potrebovali, da smo reakcijsko zmes premešali s pipeto.

Kinetiko redukcije DPPH s spojinami **1**, **2** in **3** smo spremljali pri enakih koncentracijah, in sicer pri 700  $\mu\text{M}$ , 350  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$  ter 35  $\mu\text{M}$ . Pri višjih koncentracijah smo imeli manjše težave s topnostjo spojin, zato smo si pomagali s soniciranjem z ultrazvočnim čistilnikom, saj je moral biti vzorec popolnoma raztopljen, sicer bi dejanska koncentracija odstopala od izračunane, delci pa bi sipali svetlobo v raztopini in tako vplivali na absorbanco.

Za spojino **1** smo najprej izvedli preliminarne meritve. Najprej smo absorbanco izmerili trikrat pri njeni najvišji uporabljeni koncentraciji, to je 700  $\mu\text{M}$ , da bi videli kako svetloba, kisik in odparevanje metanola vplivajo na že pripravljeno raztopino DPPH skozi čas, ker smo za vse tri testne spojine uporabili isto raztopino DPPH, ki smo jo medtem hranili v hladilniku zaščiteno pred svetlobo in kisikom. Ugotovili smo, da raztopine DPPH ni

potrebno pripravljati sproti, temveč lahko isto uporabljamo ves dan, seveda pod pogojem, da stekleno bučko, v kateri se nahaja, dobro zatesnimo in zaščitimo pred svetlobo.



Graf 13: Trikrat ponovljena določitev kinetike redukcije DPPH s spojino 1, pri koncentraciji 700 µM.

Spojini 1 in 2 imata skoraj enako kemijsko strukturo, le da lahko spojino 2 uvrstimo med fenole, ker ima na fenilnem obroču pripeto hidroksilno (-OH) skupino. Krivulje kinetike redukcije z DPPH pri enakih koncentracijah so si bile zelo podobne, kar je presenetljivo, saj smo pri spojini 2 pričakovali večji oziroma hitrejši padec absorbance. Krivulji spojine 1 pri koncentracijah 700 µM in 350 µM sta se bolj približali platoju kot primerljivi krivulji spojine 2, pri koncentracijah 70 µM in 35 µM pa so bile krivulje obeh spojin skoraj enake (Grafa 7 in 8).

Za razliko od krivulj spojin 1 in 2 sta bili krivulji kinetike redukcije DPPH s spojino 3 pri koncentracijah 700 µM in 350 µM strmejši, začetni padec absorbance pa je bil večji in se je po 90 minutah bolj približal platoju. Pri 350 µM koncentraciji spojine 3 je že po 25-30 minutah koncentracija DPPH padla za polovico. Krivulji 70 µM ter 35 µM koncentracij pa sta bili skoraj enaki kot v primeru spojin 1 in 2. Spojina 3 ima na benzilidenskem obroču vezano še ciano (-CN) skupino, ki je elektron-akceptorska in zato zmanjša njeno redukcijsko sposobnost (45).

Pri spojini **4** nismo spremljali kinetike redukcije DPPH, saj se je že pri predhodnih testiranjih izkazala kot neučinkovit antioksidant, predvsem pa smo imeli težave z njeno topnostjo. Ima malce drugačno strukturo kot prve tri spojine, saj je derivat spojine **1**, ki ima na mestu 2 rodaninskega obroča žveplov atom zamenjan z morfolinom. Prav skupina –SH oziroma žveplov atom pa je odgovoren za tautomerne oblike spojine in njeno antioksidativno delovanje, zato spojina **4** ni izkazovala antioksidativnega delovanja.

Iz Grafov 7-9 (spojine **1-3**) lahko razberemo, da so kinetike redukcije DPPH s testnimi spojinami, ponazorjene z nakloni krivulj, odvisne od uporabljenih koncentracij. Višja kot je koncentracija testnih spojin, hitrejša in intenzivnejša je reakcija z DPPH, posledično pa so strmejši tudi nakloni krivulj. Spojina, ki pri enaki koncentraciji hitreje reagira z DPPH, ima torej boljše antioksidativno delovanje. Najhitreje je z DPPH reagirala spojina **3**, vendar le pri obeh najvišjih koncentracijah. V kolikor bi spremljali kinetiko redukcije DPPH z  $\alpha$ -tokoferolom, bi dobili izredno strmo krivuljo, in to že pri nizkih koncentracijah, kar so opisali že Sharma in sodelavci (21).

Antioksidante lahko glede na hitrost, s katero reducirajo DPPH, razdelimo v tri skupine. V prvo skupino uvrščamo tiste s hitro in intenzivno kinetiko, ki za doseg platoja oziroma vzpostavitev dinamičnega ravnotežja potrebujejo manj kot 30 minut. V skupino s srednje hitro reakcijsko kinetiko uvrščamo antioksidante, ki za doseganje platoja potrebujejo od 30 do 60 minut, v zadnjo pa tiste s počasno reakcijsko kinetiko, ki dosežejo plato po več kot 60 minutah (24, 27).

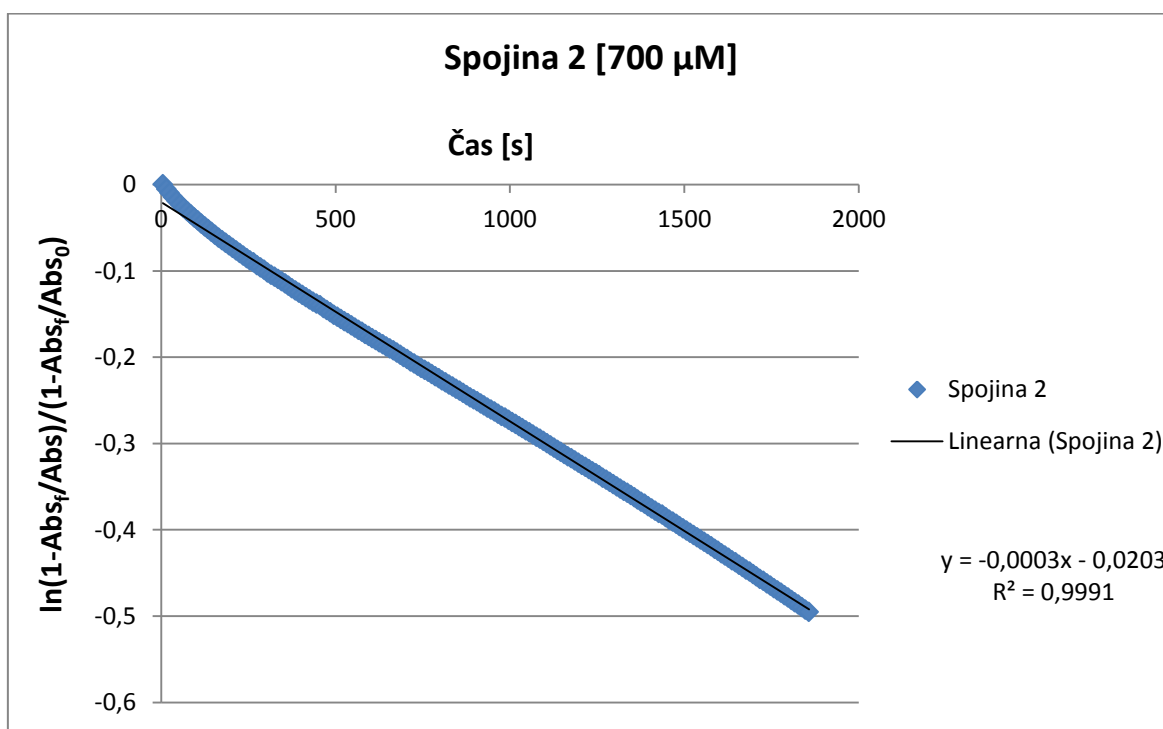
Pri spojinah **1-3** smo pri vseh testiranih koncentracijah izmerili padec absorbance po 90 minutah, vendar pa z nobeno koncentracijo nismo dosegli platoja (Graf 7 – 9). Zato lahko, glede na rezultate, spojine **1**, **2** in **3** pri vseh preiskovanih koncentracijah uvrstimo v skupino antioksidantov s počasno reakcijsko kinetiko.

Analiziranim spojinam smo pri vseh testiranih koncentracijah določili hitrostne konstante redukcije DPPH (Preglednice IV – XI). Te nam povedo, kako hitra je reakcija spojine z DPPH. Večja kot je hitrostna konstanta, hitrejša je reakcija. Na podlagi hitrostnih konstant smo lahko spojine razvrstili od tiste z najhitrejšim antioksidativnim delovanjem (spojina z najvišjo hitrostno konstanto), do tiste z najmanjšo hitrostno konstanto in torej z najpočasnejšim antioksidativnim delovanjem:

Spojina **3** > Spojina **2** > Spojina **1**

Vendar pa se moramo zavedati, da hitrostne konstante psevdo-prvega reda niso povsem linearno odvisne od koncentracij (Grafi 10 – 12). Največje hitrostne konstante je imela spojina **3**, in sicer predvsem pri koncentracijah 700  $\mu\text{M}$  in 350  $\mu\text{M}$ . Hitrostne konstante psevdo-prvega reda spojin **1** in **2** pa so si bile precej podobne, tako kot tiste vseh treh spojin pri koncentracijah 70  $\mu\text{M}$  in 35  $\mu\text{M}$ .

Pri računanju hitrostnih konstant psevdo-prvega reda smo si pomagali z risanjem odvisnosti  $\ln(1-\text{Abs}_t/\text{Abs})/(1-\text{Abs}_t/\text{Abs}_0)$  od časa (Graf 14). Za natančnejše rezultate smo si izbrali samo linearni del krivulje, ki predstavlja prvih 30 minut kinetike reakcije redukcije DPPH s testnimi spojinami. (25)



**Graf 14:** Prikaz vrednosti  $\ln(1-\text{Abs}_t/\text{Abs})/(1-\text{Abs}_t/\text{Abs}_0)$  v odvisnosti od časa v prvih 30 minutah reakcije redukcije DPPH s spojino **2**, pri koncentraciji 700  $\mu\text{M}$ .

Iz rezultatov meritev lahko sklepamo, da uvedba elektron privlačne skupine  $-\text{CN}$  na benzilidenski obroč (spojina **3**) zmanjša antioksidativno kapaciteto spojine, poveča pa hitrost redukcije DPPH. Uvedba skupine  $-\text{OH}$  na benzilidenski obroč (spojina **2**) pa presenetljivo nima pričakovanega pozitivnega vpliva na antioksidativne lastnosti, niti ne vpliva bistveno na hitrost redukcije DPPH. Substitucija žvepla na mestu 2 rodaninskega obroča z morfolinom (spojina **4**) pa bistveno zmanjša antioksidativno kapaciteto, pri čemer je hitrost redukcije DPPH tudi zelo majhna.

Ker je vprašanje stabilnosti preiskovanih spojin v kozmetičnih izdelkih zelo pomembno, bi morali opraviti še nadaljnje preiskave. Tako bi jih lahko analizirali s kromatografskimi tehnikami in masno spektrometrijo, in ugotavljali, kaj se dogaja z njimi v kozmetičnem izdelku skozi daljše časovno obdobje (npr. nastanek novih spojin).

Težave pri vgrajevanju spojin **1-4** v kozmetične izdelke bi nam predstavljala predvsem njihova topnost, prav tako pa bi morali preveriti tudi njihovo stabilnost v končnem izdelku ob izpostavitvi le-tega vplivom svetlobe in kisika.

## 6 SKLEP

V kozmetični industriji je vedno večje povpraševanje po sestavinah z antioksidativnim delovanjem, ki lahko zaščitijo tako organizem kot kozmetične izdelke pred radikalsko sproženimi reakcijami oksidacije. Nekaj novejših raziskav potrjuje, da imajo antioksidativne lastnosti tudi derivati 5-benzilidenrodanina.

Z določitvijo vrednosti  $EC_{50}$  smo med seboj primerjali spojine **1-4**, prav tako pa smo jih primerjali z že uveljavljenim antioksidantom  $\alpha$ -tokoferolom. Kot najboljši antioksidant se je izkazala spojina **2**, ki je imela najvišjo vrednost  $EC_{50}$ . Najšibkejše antioksidativno delovanje pa je po pričakovanju imela spojina **4**, ki smo ji z zamenjavo žvepla z morfolinskim obročem na mestu 2 na rodaninskem obroču, odvzeli možnost tvorbe tautomerne oblike s tiolno (-SH) skupino. Kontrolni antioksidant  $\alpha$ -tokoferol je v testu z DPPH izkazal slabše antioksidativno delovanje kot *in vivo*, zato lahko sklepamo, da bi tudi naše preiskovane spojine lahko hitreje reagirale z radikali *in vivo*.

Z metodo določanja kinetike redukcije stabilnega radikala DPPH smo pri treh (**1-3**) od štirih testnih spojin spremljali kinetiko nastanka neradikalske oblike DPPH-H z uporabo UV-VIS spektrofotometra. Spojine **1-3** so se v vseh izmerjenih koncentracijah izkazale kot antioksidanti s počasno reakcijsko kinetiko. Najboljše antioksidativno delovanje so spojine pokazale pri najvišjih dveh razmerjih DPPH:AO (1:10 in 1:5), pri razmerjih 1:1 in 1:0,5 pa bolj slabo, saj je v raztopinah ostalo kar od 76-91 % nereduciranega DPPH. Uvedba hidroksilne spojine na benzenov obroč v spojinu **2**, ki sicer služi kot donor vodika, ni bistveno vplivala na njeno antioksidativno kapaciteto, malenkost pa je pospešila hitrost reakcije z DPPH, zato so si bili rezultati pri spojinah **1** in **2** precej podobni. Z uvedbo skupine -CN na benzenov obroč v spojinu **3**, ki je elektron privlačna, pa smo sicer dosegli boljše antioksidativno delovanje, vendar pa počasnejšo redukcijo radikala.

Preden bi preiskovane spojine z antioksidativnim delovanjem lahko vgradili v kozmetične izdelke, bi morali opraviti dodatne raziskave, s katerimi bi ugotavljali, kaj se s spojinami tekom reakcije dogaja. Največjo težavo pri vgraditvi omenjenih spojin, kot aktivnih sestavin, v kozmetične izdelke, pa bi predstavljala njihova slaba topnost v vodi.

## 7 LITERATURA

1. Kristl J, et al.: Koža, sonce, zdravje, lepota. Izobraževanje farmacevtov. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2004.
2. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Med Razgl* 2006; 45: 141-153.
3. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R: Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. Hindawi Publishing Corporation 2013, Article ID 930164.
4. Farage M A, Miller K W, Elsner P, Maibach H I: Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science* 2008; 30: 87-95.
5. Barel A, Paye M, Maibach H: *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Third edition. Informa Healthcare, USA, 2009; 233-310.
6. Mravljak J. Radikali in oksidativni stres. *Farm Vest* 2015; 66: 127-132.
7. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393-406.
8. Poljšak B, Dahmane R: Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatol Res Pract* 2012; Article ID 135206; 1-4.
9. Kočevar Glavač N, Zvonar A, et al.: *Kozmetologija II: koža in sonce: kozmetično aktivne sestavine: izdelki za zaščito in aktivno nego kože: strokovno izobraževanje*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2012.
10. Trojak A, Kristl J: Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov. *Farm Vestn* 1999; 50: 443-453.
11. Halliwell B, Gutteridge J M C: *Free radicals in Biology and Medicine*. Fourth edition. Oxford University Press, 2007.
12. Gosenca M, Obreza A, Pečar S, Gašperlin M: A new approach for increasing ascorbyl palmitate stability by addition non-irritant co-antioxidant. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 2010; 11: 3: 1485-1492.
13. Rhee S G: Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental and Molecular Medicine* 1999; 31(2): 53-59.
14. Sendra J M, Sentandreu E, Navarro J L: Kinetic model for the antiradical activity of the isolated p-catechol group in flavanone type structures using the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as the antiradical probe. *Food Chem* 2007; 55: 5512-5522.



15. Gašperlin M, Gosenca M: Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Expert opinion in drug delivery* 2011. 1-15.
16. De S, Adhikari S, Tilak-Jain J, et al.: Antioxidant activity of an aminothiazole compound: Possible mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* 2008; 173: 215-223.
17. Zvezdanovic J, Daskalova L, Yancheva D, Cvetkovic D, et al.: 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones as novel and promising lipid peroxidation inhibitors.
18. [https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_E](https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E), dostopano: december 2015.
19. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food Science and Technology* 1995; 28: 25-30.
20. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. *LWT – Food Science and Technology* 1997; 30: 609-615.
21. Sharma O P, Bhat T K: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 2009; 113: 1202-1205.
22. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26(2): 211-219.
23. Carmona-Jimenez Y, Garcia-Moreno M V, Igartuburu J M, Barosso C G: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem* 2014; 165: 198-204.
24. Mishra K, Ojha H, Chaudhury N K: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH<sup>•</sup> assay: A critical review and results. *Food Chem* 2012; 130: 1036-1043.
25. Chat O A, Najjar 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 and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2013; 436: 343-353.
26. Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O: Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 615-622.
27. Sendra J M, Sentandreu E, Navarro J L: Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur Food Res Technol* 2006; 223: 615-624.
28. Hossain U S, Bhattacharya S: Synthesis of O-prenylated and O-geranylated derivatives of 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones and evaluation of their free radical scavenging

- activity as well as effect on some phase II antioxidant/detoxifying enzymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 1149-1154.
29. Bhati R S, Shah S, Suresh, Krishan P, Sandhu J S: Recent pharmacological developments on rhodanines and 2,4-thiazolidinediones. *International Journal of Medicinal Chemistry*. Volume 13, Article ID 793260.
  30. <https://en.wikipedia.org/wiki/Epalrestat>, dostopano: januar 2016.
  31. Tomašič T, Mašič L P: Rhodanine as a scaffold in drug discovery: A critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7(7).
  32. Revanthi R, Ananth D A, Sivasudha T, Shalini P E: Synthesis, characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial studies of rhodanine functionalized quinoline derivatives. *Advanced Science Focus* 2014; 2: 1-8.
  33. 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 and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2013; 436: 343-353.
  34. Martinčič R, Mravljak J, Švajger U, et al.: *In Silico* Discovery of Novel Potent Antioxidants on the Basis of Pulvic Acid and Coumarine Derivates and Their Experimental Evaluation. *PLoS ONE* 2015; 10(10).
  35. <https://support.office.com/en-us/article/STEYX-function-6ce74b2c-449d-4a6e-b9ac-f9cef5ba48ab>, dostopano: januar 2016.
  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): 487-490.
  37. Buenger J, Ackermann H, Jentzsch A, et al.: An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *International Journal of Cosmetic Science* 2006; 28: 135-146.
  38. [http://studentski.net/gradivo/upr\\_fhs\\_gel\\_kmg\\_sno\\_regresija\\_in\\_korelacija\\_01?r=1](http://studentski.net/gradivo/upr_fhs_gel_kmg_sno_regresija_in_korelacija_01?r=1), dostopano: januar 2016.
  39. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo 2015; 9.poglavje.
  40. 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.
  41. Wain A J, Wadhawan J D, France R R, Compton R G: Biphasic redox chemistry of  $\alpha$ -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): 836-842.
42. <https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrile#Reduction>, dostopano: januar 2016.
43. Rahman A U: *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products*. Elsevier B.V. 2005; 709.
44. Chen Z, Bertin R, Frolidi G: EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH<sup>•</sup> assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 2013; 138: 414-420.
45. Valgimigli L, Pratt D A: *Antioxidants in Chemistry and Biology*. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* 2012; 3: 1623-1678.