

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra anorganické a organické chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Hodnocení biologické aktivity hydroxybenzamidů

in vitro

Hradec Králové

květen 2006

Šárka Studená

Poděkování:

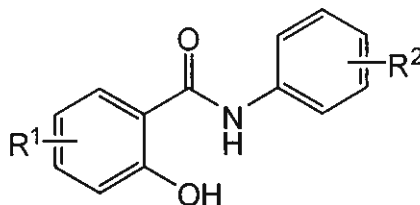
Za cenné rady a připomínky a za ochotu a nadšení při vedení diplomové práce děkuji PharmDr. Lence Kubicové, CSc.

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	5
3. TEORETICKÁ ČÁST	6
3.1. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU	6
3.2. MECHANISMY ANTIOXIDAČNÍHO ÚČINKU	6
3.3. PŘEHLED ANTIOXIDAČNÍCH LÁTEK	7
4. METODICKÁ ČÁST	9
4.1. SYNTÉZA SALICYLANILIDŮ	9
4.2. METODY STUDIA ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	10
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	12
5.1. PŘÍPRAVA SALICYLANILIDŮ	12
5.2. HODNOCENÍ ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY	13
6. VÝSLEDKY	14
7. DISKUSE A ZÁVĚR	25
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27

1. ÚVOD

Výzkum salicylanilidů (I) a jejich analog probíhá na katedře anorganické a organické chemie FaF UK už řadu let. Bylo publikováno několik referátů zabývajících se biologickou aktivitou salicylanilidů a jejich cyklických a sirných analog. Salicylanilidy mohou mít různé biologické účinky, např. antibakteriální, protituberkulózní, antimykotický, anthelmintický, moluskocidní, antiprotozoární, herbicidní, analgetický, protizánětlivý^{1,2}. Salicylanilidy byly v minulosti pro své účinky používány jak v medicíně (jako antiseptika a dezinficiencia), tak v průmyslu (jako průmyslové antioxidanty, ochraně různých materiálů, např. textilu, plastů, papíru před mikroflórou, do latexových emulzí a jiných barev, do omítek). Převážně se jednalo o halogenované látky. Později bylo od jejich použití většinou upuštěno pro časté vedlejší účinky, zejména fotokontaktní dermatitidy.



Salicylanilidy

V poslední době byla většina biologických aktivit salicylanilidů objasněna na molekulární úrovni. Salicylanilidy rozpojují oxidativní fosforylaci v mitochondriích, ale mohou ovlivňovat i různé regulační systémy u bakterií, hub, rostlin i živočichů³. Proto se nyní řadí salicylanilidy mezi základní modelové struktury pro vývoj nových typů antimikrobiálních, protinádorových a jiných léčiv. Také stoupá zájem o jejich využití v různých jiných aplikacích (antiseptika, průmyslová antioxidanta aj.).

2. CÍL PRÁCE

Předkládaná bakalářská práce je úvodní studií k výzkumu antioxidační, antiradikálové a fototoxické aktivity salicylanilidů a příbuzných látek. V této prvotní studii byly užity pouze běžné obecné screeningové metody. Cílem bylo provést na malé sérii salicylanilidů hodnocení antiradikálové aktivity pomocí dvou základních testů, a to reakcí se syntetickým radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem) a Griessovou reakcí. Práce je součástí výzkumu řešeného v rámci výzkumného záměru MŠMT MSM 0021620822.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. *Reaktivní formy kyslíku a dusíku*

V posledních letech se často setkáváme s pojmy oxidační stres, reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo reaktivní formy dusíku (RNS), volné radikály (VR). Pokud atom nebo molekula obsahuje ve svém valenčním orbitalu nepárový elektron, jedná se o volný radikál. Radikály jsou velmi reaktivní a snaží se rychle se navázat na jinou strukturu nebo získat další elektron a doplnit si tím elektronový pár do stabilní konfigurace. Tyto látky lehce reagují s biologickými strukturami a s řadou nízkomolekulárních metabolitů (mastnými kyselinami, aminokyselinami, lipidy, nukleovými kyselinami). Dalšími přeměnami z nich mohou vznikat jiné reaktivní látky, které nemají nepárový elektron, a tedy už nejsou radikály. Tyto látky se spolu s VR označují společným názvem reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) či dusíku (RNS)⁴⁻⁶.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku mají význam fyziologický i patogenetický. Za normálních okolností je v organismu produkce i účinek reaktivních forem kyslíku a dusíku v rovnováze. Porušení této rovnováhy, oxidační stres, vede k poškození molekul a tkání buď přímým účinkem volných radikálů, nebo dalšími produkty jejich reakcí⁴.

Volné radikály kyslíku: superoxidový anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový ($\cdot\text{OH}$), peroxy ($\cdot\text{ROO}$), alkoxy ($\cdot\text{RO}$), hydroperoxy ($\cdot\text{HO}_2$).

Volné radikály dusíku: oxid dusnatý ($\cdot\text{NO}$), oxid dusičitý ($\cdot\text{NO}_2$).

Další (neradikálové) reaktivní formy kyslíku: peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HOCl), ozon (O_3), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$).

Další (neradikálové) reaktivní formy dusíku: nitrosyl (NO^+), nitroxid (NO^-), kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičitý dimerní (N_2O_4), nitronium (NO_2^+), peroxyinitrit (ONOO^-), alkylperoxyinitrit (ROONO).

3.2 *Mechanismy antioxidačního účinku*

Působení antioxidantů musí být v rovnováze s tvorbou volných radikálů. Lidský organismus má své ochranné antioxidační mechanismy, které si utvářel během fylogenetického vývoje. V dnešní době se však používají i další syntetická antioxidační

léčiva, která se používají k profylaxi a léčbě různých onemocnění⁴. Některé nízkomolekulární antioxidanty mohou ale za určitých podmínek působit prooxidačně: např. vitamin E nebo vitamin C v přítomnosti kovových iontů (Fe^{3+} , Cu^{2+})^{4,6,7}. Podle vztahu k tvorbě volných radikálů je možno mechanismy antioxidační a antiradikálové aktivity rozdělit na 3 skupiny:

A. Mechanismy zabraňující tvorbě volných radikálů

Přechodné kovy působením na peroxid vodíku umožňují vznik hydroxylového radikálu. Jejich vyvázáním působí chelatační činidla, která slouží pro transport a ukládání těchto kovů. Dalším mechanismem je inhibice enzymů, které působí na tvorbu VR a odstranění peroxidu vodíku enzymatickou cestou.

B. Mechanismy odstraňující již vzniklé VR

Redukční látky poskytují elektron volným radikálům a samy se mění na stabilnější radikál. Superoxiddismutasa katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který je dále metabolizován a samotný patří mezi reaktivní formy kyslíku.

C. Reparační mechanismy odstraňující poškozené molekuly

Tímto mechanismem jsou například lipidové hydroperoxydy štěpeny glutathionperoxidasou. Zabrání se tak vzniku reaktivních aldehydů. Poškozenou DNA opravují endonukleázy. Oxidované proteiny snadno podléhají proteolytické degradaci a poté jsou eliminovány. Fosfolipázy odštěpují z fosfolipidů oxidované mastné kyseliny.

Některé látky působí více mechanismy: např. kyselina močová nebo flavonoidy mají redukční účinek a zároveň tvoří cheláty s přechodnými kovy.

3.3 Přehled antioxidačních látek⁴⁻⁶

A. Enzymy a stopové prvky

- superoxiddismutáza (SOD) - zinek, selen, měď, železo
- glutathionperoxidáza (GPx) - selen
- kataláza - železo
- mitochondriální cytochromoxidázový systém P-450
- laktoperoxidáza
- koenzym Q10

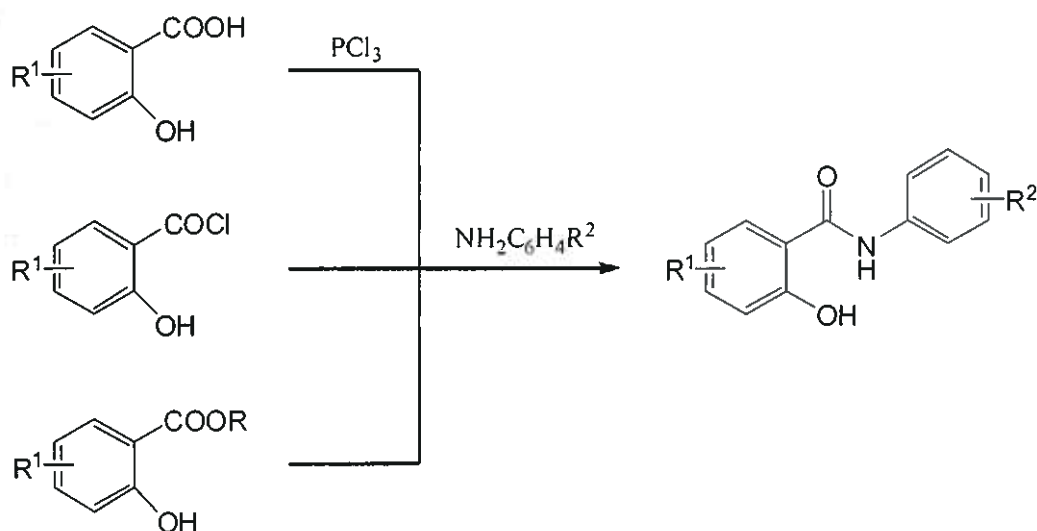
B. Neenzymové substráty s antioxidační aktivitou

- membránové (lipofilní) - tokoferoly a karotenoidy (retinol)
- nemembránové (hydrofilní) - vitamin C, glutathion, thioly, cystein, kyselina močová, bilirubin, glukóza, albumin, ceruloplazmin, transferin, laktoferin, feritin, haptoglobin, hemopexin
- flavonoidy
- cheláty - deferoxamin, dexrazoxan, penicilamin
- inhibitory xantinreduktázy (XOD) - alopurinol, kyselina listová
- inhibitory NADPH - oxidázy (adenosin)
- thioly - aceylcystein, cystein, methionin
- kyselina lipoová
- probucol
- lazaroidy(21 - aminosteroidy) - tirilazad
- nitecapon, stobandin, plazmalogeny- plasmenylethanolamin

4. METODICKÁ ČÁST

4.1 Syntéza salicylanilidů

Salicylanilidy lze připravit z kyseliny salicylové nebo jejich funkčních derivátů reakcí s aniliny za různých reakčních podmínek. Metoda vycházející z kyseliny salicylové spočívá v její reakci s anilinem za přítomnosti chloridu fosforitého. Z funkčních derivátů kyseliny salicylové se pro syntézu používají chloridy nebo estery³.



Nedávno byla popsána metoda “solvent-free” syntézy salicylanilidů reakcí esterů kyseliny salicylové s aniliny v mikrovlnném reaktoru⁸.

Pro syntézu salicylanilidů jsem zvolila reakci substituované salicylové kyseliny s příslušným anilinem a chloridem fosforitým v prostředí chlorbenzenu. Výhodou chlorbenzenu je snadná izolace produktu. Jako reakční prostředí se mohou použít i jiná rozpouštědla (např. toluen, xylen, pyridin). Ačkoli se pyridin jeví jako vhodné prostředí, protože váže vznikající chlorovodík, nevýhodou je pracnější izolace salicylanilidu z reakční směsi.

4.2 Metody studia antioxidační aktivity

Metody průkazu antioxidační a antiradikálové aktivity spočívají ve schopnosti analytu vychytávat VR. Ty jsou v reakční směsi syntetizovány nebo se přidávají. Obvykle se studuje antioxidační aktivita proti některým z těchto radikálů:

- 1. kyslíkové VR** - reaktivní formy kyslíku – ROS (hydroxyl, peroxy, superoxid)
- 2. reaktivní formy dusíku** - RNS (oxid dusnatý a jeho metabolity)
- 3. syntetické VR** - DPPH, ABTS, galvinoxyl

Ke stanovení antioxidační a antiradikálové aktivity se využívají různé metody, a to jak in vivo, tak in vitro.

Metody stanovení antioxidační a antiradikálové aktivity v podmínkách in vitro^{4,9}:

- metoda založená na inhibici oxidace kyseliny linolové
- Fentonova reakce
- reakce s guajakolperoxidázou
- metoda blednutí β - karotenu
- inhibice redukce cytochromu C III
- inhibice kyseliny močové
- inhibice aktivity prasečí pankreatické elastázy
- reakce s DPPH radikálem
- reakce s DMPD radikálem (N,N-dimetyl-p-phenylendiamin)
- reakcí s ABTS radikálem (2,2'-azinobis(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonát))
- metoda založená na oxidaci dihydro-2,7-dichlorofluoresceinu ABApem (2,2-azobis(2-amidopropan))
- chemiluminiscenční a fotochemiluminiscenční metody
- elektronová spinová rezonanční spektroskopie (ESR)

V mé bakalářské práci jsem ke stanovení antiradikálové aktivity látek ze skupiny salicylanilidů použila dvě základní metody pro stanovení této aktivity. Jsou to reakce s radikálem DPPH a Griessova reakce.

Metoda využívající radikál difenylpikrylhydrazyl – DPPH⁹

Metoda spočívá v reakci analyzovaného vzorku se syntetickým radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl, tj. 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) za vzniku DPPH-H⁺ (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazinu). Reakce je sledována spektrofotometricky při $\lambda = 517$ nm. Měří se pokles absorbance DPPH v závislosti na koncentraci vzorku.

Metoda využívající Griessovu reakci¹⁰

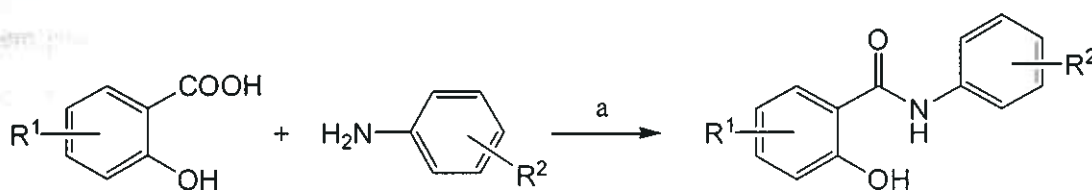
Běžně užívaná nepřímá metoda na stanovení reaktivních forem dusíku. Metabolity NO v organismu jsou nitráty a nitrity. Griessova reakce je založena na spektrofotometrickém stanovení dusitanů po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem. Měří se absorbance při 540 nm.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Příprava salicylanilidů

Do 250 ml Erlenmayerovy baňky s magnetickým míchadlem jsem předložila 0,02 mol substituované kyseliny salicylové, 0,02 mol substituovaného anilinu a 150 ml chlorbenzenu. Při laboratorní teplotě jsem přikapala 0,01 mol (2,5 ml) chloridu fosforitého a reakční směs jsem udržovala za stálého míchání pod zpětným chladičem v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W po dobu 15 minut. Průběh reakce jsem sledovala pomocí TLC na Silufolu UV 254/366. Jako mobilní fázi pro TLC jsem používala směs aceton-petrolether 1:4. Po skončení reakce jsem chlorbenzen oddestilovala a produkt čistila krystalizací ze směsi ethanol-voda.

Reakční schéma:



1a; R¹ = 3,5-Cl₂; R² = 3,4-Cl₂

1b; R¹ = 3,5-Br₂; R² = 4-Br

1c; R¹ = 4-Cl; 4 R² = -Cl

Teploty tání jsem měřila na Koflerově bloku a nekorigovala jsem je. Vzorke k analýze jsem sušila 24 hodin nad oxidem fosforečným při tlaku 66 Pa a teplotě 61°C. Infračervená spektra měřila paní I. Vencovská v tabletách bromidu draselného na přístroji NICOLET IMPACT 400.

Připravené salicylanilidy:

3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilid (**1a**). T.t. 149-150 °C (lit.¹¹ t.t. 149-151 °C); výtěžek 75 %, IČ: ν (C=O) = 1635 cm⁻¹

3,4',5-tribromsalicylanilid (**1b**). T.t. 227-228 °C (lit.¹¹ t.t. 225-227 °C); výtěžek 69 %, IČ: ν (C=O) = 1649 cm⁻¹

4,4'-dichlorsalicylanilid (**1c**). T.t. 221-223 °C (lit.¹² t.t. 223 °C); výtěžek 68 %, IČ: ν (C=O) = 1609 cm⁻¹

5.2 Hodnocení antiradikálové aktivity

K hodnocení antiradikálové aktivity jsem použila sérii 5 salicylanilidů. Sloučeniny **1a**, **1b** a **1c** jsem připravila (odst. 5.1). Sloučeniny **1d** (4'-fenylaminosalicylanilid) a **1e** (4'-isohexylaminosalicylanilid) nám byly poskytnuty Ing. M. Mečiarovou, PhD. z katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě⁸. Ostatní chemikálie byly zakoupeny od firem Merck a Sigma-Aldrich.

5.2.1. DPPH TEST¹³

Roztoky testovaných látek (koncentrace jsou uvedeny v tabulkách 1–6) jsem připravovala v 96% ethanolu. Roztok DPPH jsem připravila naředěním 4,1 mg DPPH do 25 ml 96% ethanolu. 1,4 ml vzorku jsem smíchala v kyvetě pro spektrofotometr s 0,1 ml roztoku DPPH a po 10 minutách stání jsem měřila absorbance při 517 nm. Slepé vzorky jsem připravovala z 1,4 ml vzorku smícháním s 0,1 ml 96% ethanolu. Stejným způsobem jsem stanovila antiradikálovou aktivitu kyseliny kávové. Hodnoty průměrných absorbancí uvedené v tabulkách 1–6 jsou aritmetickým průměrem tří měření (od každé koncentrace byly proměřeny tři vzorky a tři slepé vzorky).

5.2.2. GRIESSOVA REAKCE¹⁴

Roztoky testovaných látek (koncentrace jsou uvedeny v tabulkách 7–12) jsem připravovala v ethanolu 96%. Roztok pentakyano-nitrosoželezitanu disodného o koncentraci 0,1 mol/l jsem připravila rozpuštěním $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve fosfátovém pufru 7,4 (ČsL4). Griessovo činidlo jsem připravovala smícháním 100 ml 1% roztoku sulfanilamidu v 2% kyselině fosforečné a 100 ml 0,1% roztoku *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu v ve fosfátovém pufru 7,4 (ČsL4).

0,9 ml vzorku jsem smíchala v kyvetě pro spektrofotometr s 0,1 ml roztoku pentakyano-nitrosoželezitanu disodného a inkubovala 60 minut při 25 °C. Potom jsem přidala 0,5 ml Griessova činidla a po 10 minutách stání jsem měřila absorbanci při 546 nm. Hodnoty průměrných absorbancí uvedené v tabulkách 7–12 jsou aritmetickým průměrem tří měření (od každé koncentrace byly proměřeny tři vzorky a tři slepé vzorky).

6. VÝSLEDKY

6.1 Výsledky hodnocení antiradikálové aktivity

6.1.1 VÝSLEDKY TESTU DPPH

Tabulka 1 Výsledky testu DPPH pro 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilid (1a)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
5	0,203	0,01	0,193
2,5	0,209	0,002	0,207
1,79	0,205	0,008	0,197
1,43	0,208	0,008	0,2
1,07	0,187	-0,004	0,191
0,71	0,179	0,008	0,171
0,54	0,192	0,004	0,188
0,5	0,208	-0,005	0,213
0,32	0,255	0,007	0,248
0,29	0,199	-0,006	0,205
0,25	0,197	-0,006	0,203
0,21	0,195	0,007	0,188
0,14	0,233	0,006	0,227
0,11	0,296	0,006	0,29
0,07	0,26	-0,007	0,267
0,04	0,26	-0,007	0,267
0	0,295	0,001	0,294

Tabulka 2 Výsledky testu DPPH pro 3,4',5-tribromsalicylanilid (**1b**)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
4,98	0,233	0,015	0,218
2,49	0,242	0,018	0,224
1,78	0,245	0,016	0,229
1,42	0,24	0,006	0,234
1,07	0,249	0,012	0,237
0,71	0,257	0,007	0,25
0,53	0,257	0,012	0,245
0,50	0,255	0,003	0,252
0,32	0,245	0,003	0,242
0,28	0,248	0	0,248
0,25	0,25	-0,001	0,251
0,21	0,249	0,004	0,245
0,14	0,251	0,001	0,25
0,11	0,251	-0,002	0,253
0,07	0,249	-0,001	0,25
0,04	0,25	0,001	0,249
0	0,252	-0,002	0,254

Tabulka 3 Výsledky testu DPPH pro 4,4'-dichlorsalicylanilid (1c)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
5,03	0,117	-0,003	0,12
2,52	0,153	-0,002	0,155
1,80	0,143	0,011	0,132
1,44	0,145	0,012	0,133
1,08	0,167	0,006	0,161
0,72	0,146	0,007	0,139
0,54	0,174	0,012	0,162
0,50	0,2	0,006	0,194
0,32	0,221	0,01	0,211
0,29	0,224	0,006	0,218
0,25	0,219	0,006	0,213
0,22	0,21	0,006	0,204
0,14	0,244	0,003	0,241
0,11	0,242	0,011	0,231
0,07	0,235	0,004	0,231
0,04	0,245	0,011	0,234
0	0,309	-0,002	0,311

Tabulka 4 Výsledky testu DPPH pro 4'-fenylaminosalicylanilid (**1d**)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
0,95	0,048	0,014	0,034
0,48	0,058	0,01	0,048
0,34	0,048	0,009	0,039
0,27	0,04	0,009	0,031
0,20	0,046	-0,004	0,05
0,14	0,048	0,008	0,04
0,10	0,043	0,006	0,037
0,10	0,042	0,006	0,036
0,06	0,048	-0,001	0,049
0,05	0,037	0,002	0,035
0,05	0,041	-0,005	0,046
0,04	0,052	0,006	0,046
0,03	0,052	-0,003	0,055
0,02	0,066	0,001	0,065
1,36e-02	0,111	0,005	0,106
9,53e-03	0,147	0,008	0,139
8,17e-03	0,16	0	0,16
6,81e-03	0,179	0,003	0,176
5,45e-03	0,2	0,003	0,197
4,10e-03	0,23	0,004	0,226
2,72e-03	0,262	0,006	0,256
2,04e-03	0,274	0,004	0,27
1,36e-03	0,277	0,005	0,272
0	0,32	-0,004	0,324

Tabulka 5 Výsledky testu DPPH pro 4'-isohexylaminosalicylanilid (1e)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
0,99	0,028	0,007	0,021
0,50	0,033	0,014	0,019
0,35	0,038	0,005	0,033
0,28	0,028	-0,002	0,03
0,21	0,029	0,003	0,026
0,14	0,034	0,007	0,027
0,11	0,036	0,002	0,034
0,10	0,029	0,011	0,018
6,38e-02	0,047	0,01	0,037
5,67e-02	0,042	0,003	0,039
4,96e-02	0,048	0,007	0,041
4,25e-02	0,044	0,007	0,037
2,83e-02	0,086	0,003	0,083
2,13e-02	0,101	0,003	0,098
1,42e-02	0,129	0,008	0,121
9,92e-03	0,144	0	0,144
8,50e-03	0,163	0	0,163
7,10e-03	0,187	0,001	0,186
7,09e-03	0,21	-0,001	0,211
5,67e-03	0,232	-0,003	0,235
4,25e-03	0,27	0,007	0,263
2,83e-03	0,277	0,001	0,276
2,13e-03	0,296	0,005	0,291
1,42e-03	0,311	0,001	0,31
0	0,325	0,006	0,319

Tabulka 6 Výsledky testu DPPH pro kyselinu kávovou

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
0,06	0,022	-0,008	0,03
0,04	0,023	0,002	0,021
0,03	0,025	0,003	0,022
0,02	0,026	0,007	0,019
1,71e-02	0,032	0,007	0,025
1,43e-02	0,037	-0,004	0,041
1,14e-02	0,065	0,002	0,063
8,57e-03	0,103	-0,002	0,105
5,71e-03	0,158	-0,004	0,162
4,29e-03	0,19	0	0,19
2,86e-03	0,215	0,002	0,213
2,00e-03	0,244	-0,002	0,246
1,43e-03	0,261	-0,001	0,262
1,14e-03	0,274	0	0,274
8,57e-04	0,278	-0,005	0,283
5,71e-04	0,268	-0,006	0,274
2,86e-04	0,291	0,002	0,289
0	0,291	0	0,291

6.1.2 VÝSLEDKY GRIESOVY REAKCE

Tabulka 7 Výsledky Griessovy reakce pro 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilid (1a)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
4,9	0,337	0,023	0,314
2,72	0,351	0,014	0,337
1,09	0,417	0,027	0,39
0,54	0,432	0,01	0,422
0,49	0,439	0,013	0,426
0,44	0,446	0,02	0,426
0,38	0,448	0,014	0,434
0,33	0,465	0,009	0,456
0,27	0,461	0,02	0,441
0,22	0,495	0,035	0,46
0,16	0,497	0,049	0,448
0,11	0,522	0,021	0,501
5,44e-02	0,509	0,02	0,489
0	0,525	0	0,525

Tabulka 8 Výsledky Griessovy reakce pro 3,4',5-tribromsalicylanilid (1b)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz- Asl)
0,56	0,606	0,033	0,573
0,50	0,581	0,028	0,553
0,45	0,569	0,023	0,546
0,39	0,645	0,025	0,62
0,33	0,608	0,027	0,581
0,28	0,547	0,034	0,513
0,22	0,568	0,075	0,493
0,17	0,793	0,032	0,761
0,11	0,82	0,042	0,778
5,58e-02	0,728	0,109	0,619
0	0,525	-	0,525

Tabulka 9 Výsledky Griessovy reakce pro 4,4'-dichlorsalicylanilid (1c)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz- Asl)
0,50	0,46	0,051	0,409
0,44	0,455	0,028	0,427
0,39	0,481	0,068	0,413
0,33	0,499	0,082	0,417
0,28	0,452	0,019	0,433
0,22	0,455	0,012	0,443
0,17	0,517	0,018	0,499
0,11	0,565	0,031	0,534
5,51e-02	0,563	0,076	0,487
0	0,553	-	0,553

Tabulka 10 Výsledky Griessovy reakce pro 4'-fenylaminosalicylanilid (**1d**)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
0,95	0,115	0,011	0,104
0,42	0,188	0,008	0,18
0,21	0,232	0,013	0,219
0,11	0,354	0,011	0,343
9,53e-02	0,37	0,016	0,354
8,47e-02	0,394	0,013	0,381
6,35e-02	0,451	0,014	0,437
4,24e-02	0,49	0,009	0,481
3,18e-02	0,516	0,008	0,508
2,12e-02	0,546	0,001	0,545
1,10e-02	0,556	0	0,556
9,53e-03	0,55	0,002	0,548
8,47e-03	0,61	0,014	0,596
7,41e-03	0,621	0,012	0,609
6,35e-03	0,631	0,014	0,617
4,24e-03	0,645	0,009	0,636
3,18e-03	0,602	0,005	0,597
2,12e-03	0,672	0,008	0,664
0	0,718	-	0,718

Tabulka 11 Výsledky Griessovy reakce pro 4'-isohexylaminosalicylanilid (**1e**)

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
0,99	0,215	0,007	0,208
0,44	0,189	0,005	0,184
0,22	0,213	0,008	0,205
0,11	0,211	0,007	0,204
9,92e-02	0,202	0,005	0,197
8,82e-02	0,214	0,002	0,212
7,72e-02	0,205	0,006	0,199
6,61e-02	0,262	0,006	0,256
4,41e-02	0,334	0,009	0,325
3,31e-02	0,388	0,007	0,381
2,20e-02	0,509	0,004	0,505
1,10e-02	0,65	0,005	0,645
9,92e-03	0,667	0,006	0,661
8,82e-03	0,662	0,004	0,658
7,72e-03	0,665	0,005	0,66
6,61e-03	0,69	0,004	0,686
4,41e-03	0,729	0,006	0,723
3,31e-03	0,736	0,004	0,732
2,20e-03	0,739	0,003	0,736
0	0,802	-	0,802

Tabulka 12 Výsledky Griessovy reakce pro kyselinu kávovou

Koncentrace c [mmol/l]	Průměrná absorbance (vzorek)	Průměrná absorbance (slepý vz.)	Průměrná absorbance (rozdíl Avz-Asl)
0,21	0,14	0,034	0,106
0,18	0,153	0,039	0,114
0,16	0,149	0,027	0,122
0,14	0,154	0,029	0,125
0,11	0,157	0,026	0,131
0,09	0,166	0,026	0,14
0,07	0,22	0,053	0,167
0,05	0,24	0,039	0,201
0,02	0,299	0,026	0,273
0,02	0,32	0,026	0,294
1,82e-02	0,381	0,07	0,311
1,59e-02	0,348	0,008	0,34
1,37e-02	0,41	0,046	0,364
1,14e-02	0,42	0,028	0,392
9,11e-03	0,458	0,033	0,425
6,83e-03	0,513	0,039	0,474
4,56e-03	0,515	0,034	0,481
2,28e-03	0,537	0,042	0,495
2,05e-03	0,538	0,038	0,5
1,82e-03	0,543	0,038	0,505
1,59e-03	0,558	0,038	0,52
1,37e-03	0,574	0,039	0,535
0	0,522	-	0,522

7. DISKUSE A ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla pilotní studií k výzkumu antioxidační a fototoxické aktivity salicylanilidů a podobných látek. Tomu odpovídal výběr studovaných derivátů. Jednalo se především o dvě léčiva, dříve používaná v praxi (**1a**, 3,3',4',5-tetrachlorsalicylanilid; **1b**, tribromsalan). Skupina halogenovaných derivátů byla doplněna o 4,4'-dichlorsalicylanilid (**1c**), tedy salicylanilid substituovaný halogenem v jiné poloze acylové části molekuly než salicylanilidy používané dříve v medicíně. Čtvrtou látkou byl 4'-fenylaminosalicylanilid (**1d**), který byl v minulosti vyvinut a používán jako průmyslový antioxidant, a proto se dalo očekávat, že by měl vykazovat antiradikálovou aktivitu v použitých testech. Pátou látkou ze série salicylanilidů byl analog sloučeniny **1d**. 4'-Isohexylaminosalicylanilid (**1e**) je látka vyvíjená jako antioxidant na Slovensku.

Halogenované salicylanilidy jsem připravila reakcí substituované salicylové kyseliny s příslušným anilinem a chloridem fosforitým v prostředí chlorbenzenu v mikrovlnném reaktoru. Látky **1d** a **1e** jsme obdrželi od Ing. M. Mečiarové, PhD. z katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě.

V této prvotní studii byly užity pouze běžné obecné screeningové metody. Cílem bylo na malé sérii salicylanilidů provést hodnocení antiradikálové aktivity salicylanilidů pomocí dvou základních testů, a to reakcí se syntetickým radikálem DPPH a Griessovou reakcí. Hodnoty EC_{50} a korelační koeficienty byly vypočteny pomocí nelineární regresní analýzy sigmoidní „dose-response“ křivky závislosti absorbance na dekadickém logaritmu koncentrace testované látky^{15,16}.

Tabulka 13 Statistické hodnocení reakce s DPPH^{15,16}

Látka	EC_{50} [mmol/l]	R^2
1a	a	-
1b	37,22	0,8797
1c	0,56	0,9037
1d	6,68x10E-3	0,9936
1e	8,63x10E-3	0,9930
Kávová kyselina	5,64x10E-3	0,9932

a EC_{50} nebylo možno stanovit kvůli špatné rozpustnosti sloučenin

Tabulka 14 Statistické hodnocení Griessovy reakce^{15,16}

Látka	EC ₅₀ [mmol/l]	R ²
1a	a	-
1b	a	-
1c	a	-
1d	0,11	0,9830
1e	0,03	0,9841
Kávová kyselina	0,02	0,9968

a EC 50 nebylo možno stanovit kvůli špatné rozpustnosti sloučenin

V obou použitých testech vykazala nejvyšší antiradikálovou aktivitu kyselina kávová, která sloužila jako pozitivní kontrola. Srovnatelná aktivita byla nalezena u látek **1d** a **1e**. Ostatní sloučeniny (**1a–1c**) byly výrazně méně účinné nebo nevykázaly žádný efekt.

Je však nutné brát v úvahu i použitou metodiku testování. V této prvotní pilotní studii byly užity pouze běžné obecné screeningové metody. Halogenované salicylanilidy v těchto hydrofilních systémech nemohly projevit plně svůj možný antioxidační potenciál. Předmětem dalšího zkoumání by proto měla být jejich možná aktivita v lipofilním prostředí ve kterém mají lepší rozpustnost. Tato vlastnost by mohla být výhodná v protekci oxidačního poškození biologických membrán. Současná běžně používaná antioxidantia jako kyselina askorbová, hydroxyderiváty kyseliny skořicové nebo benzoové a flavonoidy jsou značně hydrofilní. Jedinými běžně používanými lipofilními scavengery kromě tokoferolu jsou karotenoidy, které však vykazaly možnou pozitivní korelaci s vyšší incidencí tvorby některých nádorových onemocnění⁴. Z tohoto hlediska by byl vývoj lipofilní antioxidačně dostatečně aktivní látky jednoznačným přínosem.

Práce bude součástí publikace v odborném tisku.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Kubicová L., Waisser K.: Biologická aktivita salicylanilidů. Českoslov. Farm. **41**, 208–216 (1992).
2. Šustr, M., Hrnčiarová, D., Látalová, M., Pravda, M., Kubicová, L.: Biological activity of *N*-substituted thiobenzamides and related compounds. Folia Pharm. Univ. Carol. **29**, 39–54 (2003).
3. Šustr, M.: Biologicky aktivní thiosalicylanilidy a jejich analoga. Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové (2005).
4. Štípek S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada. Praha 2000.
5. Racek J., Holeček V.: Enzymy a volné radikály. Chem. Listy **93**, 774–780 (1999).
6. Vertuani S., Angusti A., Manfredini S.: The antioxidants and Pro-oxidants network: An overview. Curr. Pharm. Des. **10**, 1677–1694 (2004).
7. Schneider C.: Chemistry and biology of vitamin E. Mol Nutr. Food Res. **49**, 7–30 (2005).
8. Veverkova, E., Meciarova, M., Toma, S., Balko, J.: Synthesis of substituted salicylanilides under microwave irradiation. Monatsh. Chem. **134**, 1215–1219 (2003).
9. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chem. Listy **98**, 174–179 (2004).
10. Kupková Z., Beneš L.: Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. Chem. Listy **98**, 116 – 122 (2004).
11. Lemaire H., Schramm C. H., Cahn A.: J. Pharm. Sci. **50**, 831 (1961).
12. Schräufstätter E., Meiser W., Gönnert R.: Z. Naturforsch 16b, 95 (1961).
13. Dorman H. J. D., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R.: J. Agric. Food Chem. **52**, 762 (2004).
14. Marcocci L., Maguire J. J., Droy-Lefaix M. T., Packer L: Biochem. Biophys. Res. Commun. **201**, 748 (1994).
15. Chobot V.: nepublikované výsledky.
16. Ronald J. Tallarida Drug synergism and dose-effect analysis. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 2000, 247 s.