

OTDK dolgozat

Paramágneses kávésav származékok szintézise és antioxidáns vizsgálata

Vörös Patrik

Kémia BSc.

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar



Témavezető: Dr. Bognár Balázs egyetemi adjunktus
Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet

2014

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
2. Előzmények	4
2.1. A szabad gyökök keletkezése és hatásai	4
2.2. Kávésav származékok	6
2.3. Nitroxid gyökök átalakulásai	10
2.4. Antioxidáns mérések előzményei	11
2.4.1. ABTS gyök kation módszer	11
2.4.2. DMPO-OH addukt vizsgálata ESR spektroszkópiával	12
3. Célkitűzések	12
4. Saját eredmények.....	14
4.1. Kávésav-fenetil-észter szintézise kávésvából.....	14
4.2. Öt- és hattagú nitroxidokkal módosított kávésvav-fenetil- észter típusú vegyületek szintézise	14
5. Antioxidáns vizsgálatok eredményei	18
5.1. ABTS gyök kation mérés eredményei	18
5.2. DMPO-OH módszer eredményei.....	19
6. Kísérleti rész.....	22
7. Összefoglalás	27
8. Köszönetmondás	28
9. Irodalomjegyzék.....	29

1. Bevezetés

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében már több, mint 30 éve foglalkoznak stabilis szabad gyökök szintézisével és ezen nitroxid gyökök más vegyülettípusra történő kapcsolásával. A stabilis szabad gyököket először spin jelzőként kezdték el alkalmazni, később számos más területen is használták őket. A nitroxid szabad gyökök alkalmazhatók antioxidánsként, prooxidánsként, illetve ferromágneses anyagok előállítására egyaránt. Ezentúl alkalmazásuk fellelhető még az analitikában spincsapda és redox indikátorok szerepében.

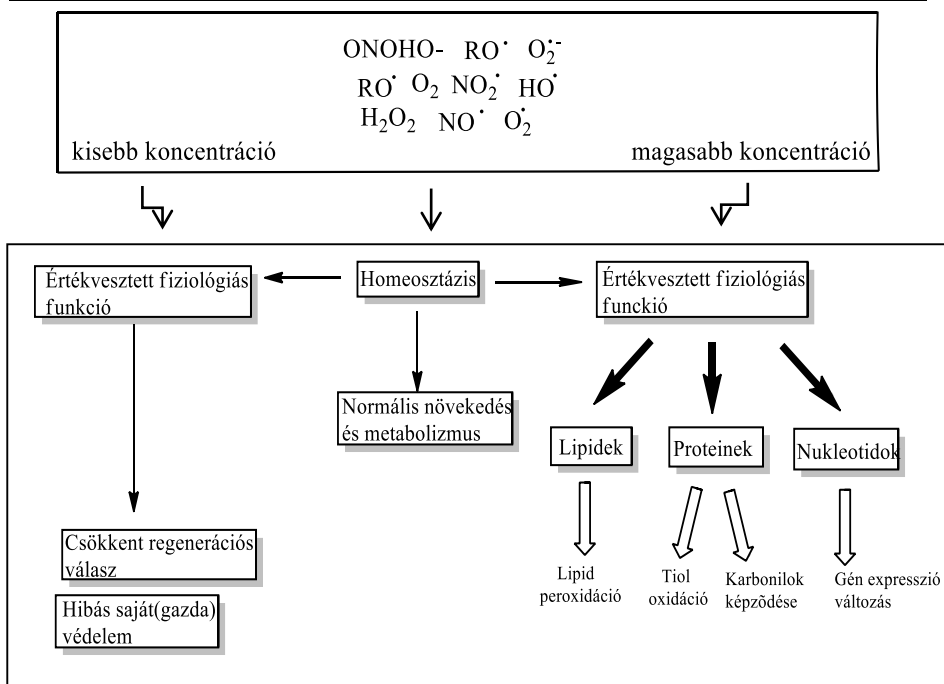
Az elmúlt évtizedekben számos nitroxid szabad gyökhöz kapcsolt vegyületet állítottak elő (aminosavak, gyógyszerek, zsírsavak, kardioprotektív szerek, helyi érzéstelenítők, kemoprotektív szerek). Legutóbb antioxidáns molekulák (pl. rezveratrol) paramágneses analogonjait szintetizálták. Ezen munkák eredményeként több cikk, közlemény jelent meg. Szakdolgozóként a kávésav típusú, stabilis nitroxid gyököt tartalmazó, antioxidáns hatású vegyületek előállítása volt a feladatom.

2. Előzmények

2.1. A szabad gyökök keletkezése és hatásai

Az oxidatív légkörben lejátszódó oxidációs/redukciós folyamatokban Reaktív Oxigén Származékok (ROS) képződnek. Az oxigén a terminális oxidáció végső elektron akceptora, továbbá számos enzim működésének a feltétele, így például a különböző oxidázok vagy oxigenázok esetében (1. ábra). Ezen folyamatok során az oxigén egyelektron-átmenetes reakcióban redukálódik, szükségszerűen keletkeznek reaktív intermedierek is: O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$, amelyek nélkülözhetetlenek például az immunrendszer működésében. A gyökök nem csak biokémiai úton keletkezhetnek, hanem a különböző nagy energiájú sugárzások (UV, ionizáló sugárzások) révén is generálódhatnak a humán szervezetben.¹ A reaktív intermedierek magas koncentrációja a biomolekulák, fehérjék, lipidek, nukleinsavak károsodását okozza, ezért az evolúció során számos enzimatis és nem-enzimatis antioxidáns kaszkád alakult ki, melyek feladata a ROS és RNS (Reaktív Nitrogén Származékok) megfelelő egyensúlyi koncentrációjának fenntartása.² Ha ezek mennyisége meghaladja az antioxidáns rendszer kapacitását, számos pathológiás elváltozás alakulhat ki, mint például a diabétesz, a tumoros elváltozások, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, szív- és érrendszeri megbetegedések.^{3,4}

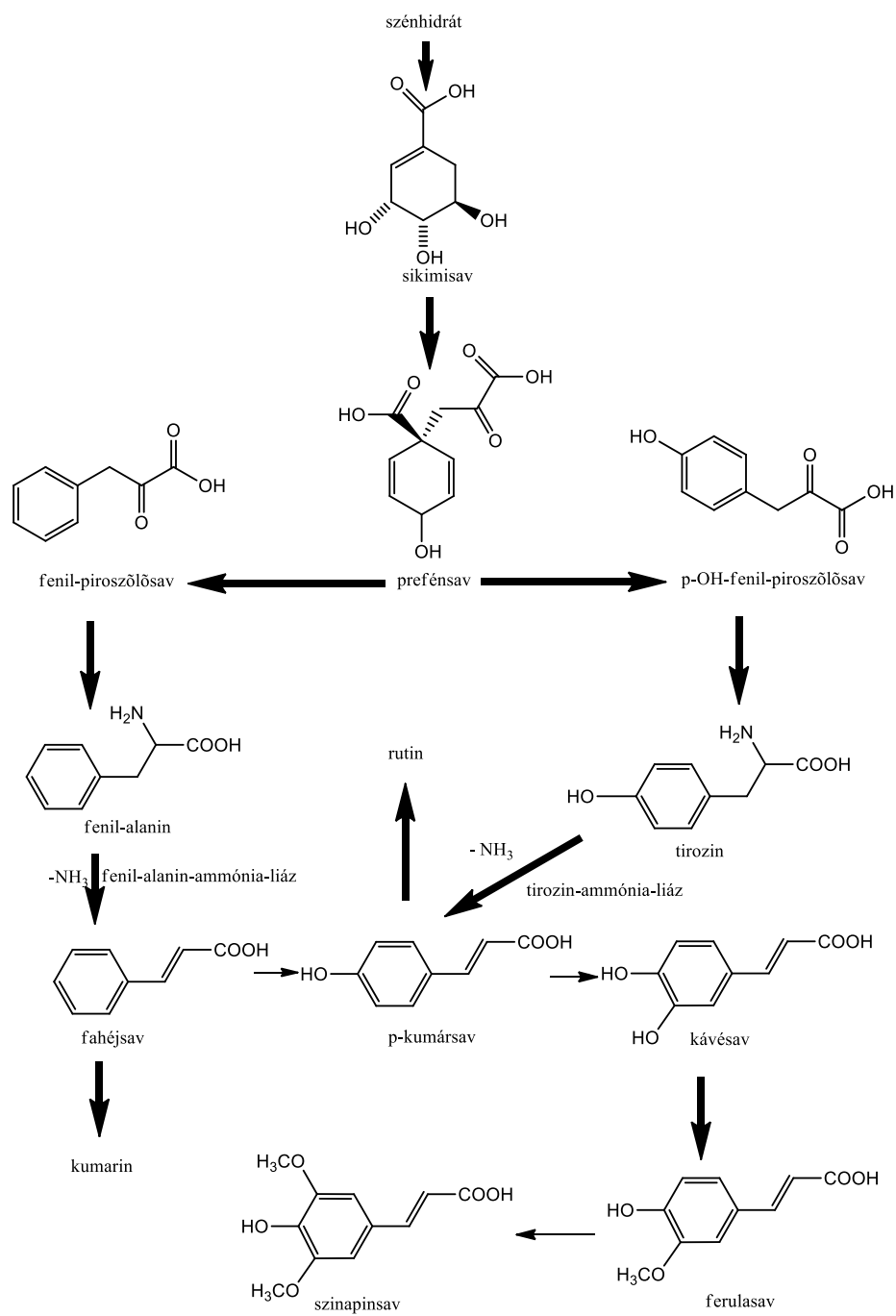
Endogén források Mitokondrium Peroxiszómák Lipoxigenázok NADPH oxidáz Citokróm P450	Antioxidáns védelem Enzimatis rendszer CAT, SOD, GPx Nem-enzimatis rendszer Glutation, Vitaminok (A, C, E)	Exogén források UV fény Ionizáló sugárzás Kemoterápia Gyulladást okozó citokinek Környezeti toxinok
--	--	--



1. ábra: Szabad gyökök keletkezése és hatásai az élő szervezetben.

2.2. Kávésav származékok

A természetben számos növényi eredetű antioxidáns vegyület fordul elő, például a telítetlen zsírsavak (pl.: linolsav, olajsav), a karotionoidok (pl.: likopin, A-vitamin), illetve a több vegyületcsaládot (flavonoidok, fenolsavak) is magába foglaló polifenolok. A számos zöldségben, gyümölcsben és a kávébabban előforduló kávésav (1), vagy az elsőként Magyarországon propoliszból izolált kávésav-fenetil-észter (CAPE) (2) a fenolsavak közé tartoznak.^{5,6} A nyers kávéban a koffein klorogénsavhoz kötve fordul elő. A növények a kávésavat bioszintetikus úton állítják elő, másodlagos anyagcsere folyamatok során a szénhidrátokból kiindulva különféle fahéjsav származékok, kumarinok keletkeznek. A sikimisav útvonal fontos alternatív lehetőség az aromás aminosavak, illetve egyéb fenil-propán vázas vegyületek bioszintézisére. A prefénsavból fenil-piroszölősavon keresztül fenil-alaninon át fahéjsav és abból para-kumársav szintetizálódik. A prefénsavból para-hidroxi-fenil-piroszölősav is szintetizálódik, majd ebből tirozinon keresztül szintén para-kumársav keletkezik. A para-kumársavból kávésav bioszintetizálódik, ezután további lépésekben ferulasav, majd szinapinsav keletkezik (2. ábra).⁷

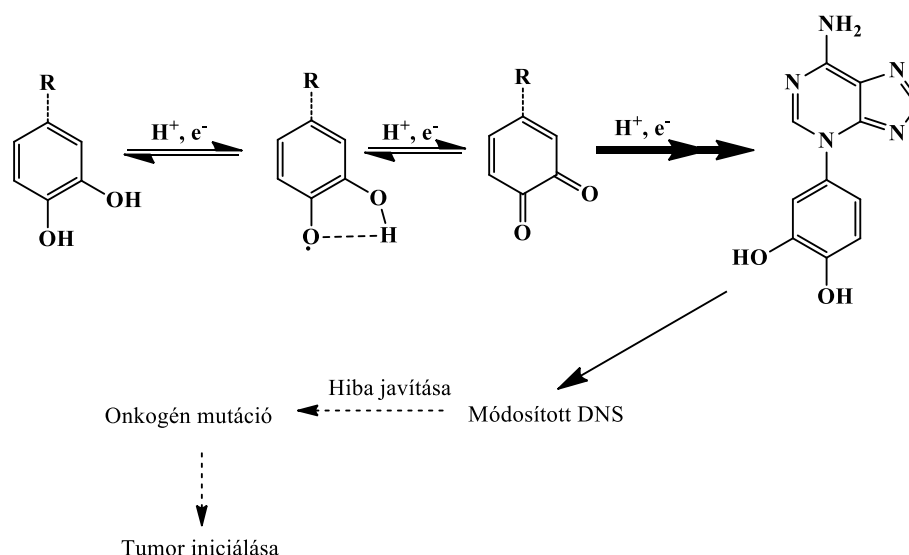


2. ábra: Néhány természetben előforduló fenol bioszintézise.

A kávésav és a kávésav-fenetil-észter hatékony antioxidáns tulajdonságát elsősorban a katekol gyűrűnek köszönheti⁷, továbbá egyes vizsgálatok alapján az aromás gyűrűvel konjugációban lévő kettős kötés is növeli az oxidációs-redukációs reakciók sebességét. A katekol származékok antioxidáns hatását három tényező biztosítja:⁸

1. A reaktív intermedierek redukálása, mialatt a diol szemikinonná, majd kinonná oxidálódik.
2. Fe^{2+} -, illetve Fe^{3+} -komplekképzés, amely által lecsökkenti a Fenton-reakcióhoz szükséges hozzáférhető Fe^{2+} -ionok koncentrációját.⁹
3. Prooxidáns enzimek (COX, NADH-oxidáz) gátlása.

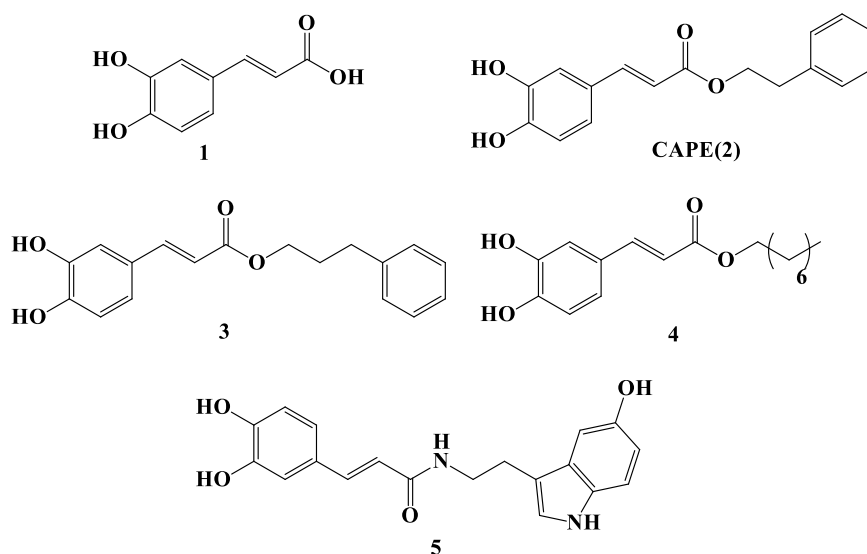
A körülményektől függően ezek a származékok prooxidánsként is viselkedhetnek, mivel a szemikinon-kinon átalakulás ROS helyett molekuláris oxigénnel is bekövetkezhet, mely során szuperoxid gyök anion képződik. Továbbá nagy kinon koncentráció esetén a kinonok Michael-addícióban reagálhatnak nukleotid egységekkel, ami mutációhoz vezethet (3. ábra).¹⁰



3. ábra: Pirokatechin lehetséges átalakulásai az élő szervezetben.

Az esetleges káros hatások ellenére azonban a vegyületek összességében nagyon kedvező, széles spektrumú biológiai hatással rendelkeznek. A kávésav-fenetil-észterrel kapcsolatban megállapították, hogy erőteljesebb antioxidáns hatású, mint a kávésav és antitumor hatással is rendelkezik, ezen felül megemlítendő antivirális, antiszeptikus, továbbá antibiotikus, antibakteriális, gyulladáscsillapító, immunstimuláns és antiarterioszklerotikus hatása is.¹¹⁻¹⁴ Cukorbeteg patkányokon folytatott vizsgálatok során felfedezték, hogy a kávésav-fenetil-észterrel kezelt állatok védve voltak a cukorbetegség által előidézett oxidatív stressz ellen, és bizonyították, hogy gátolja a lipid peroxidációt is.¹⁵

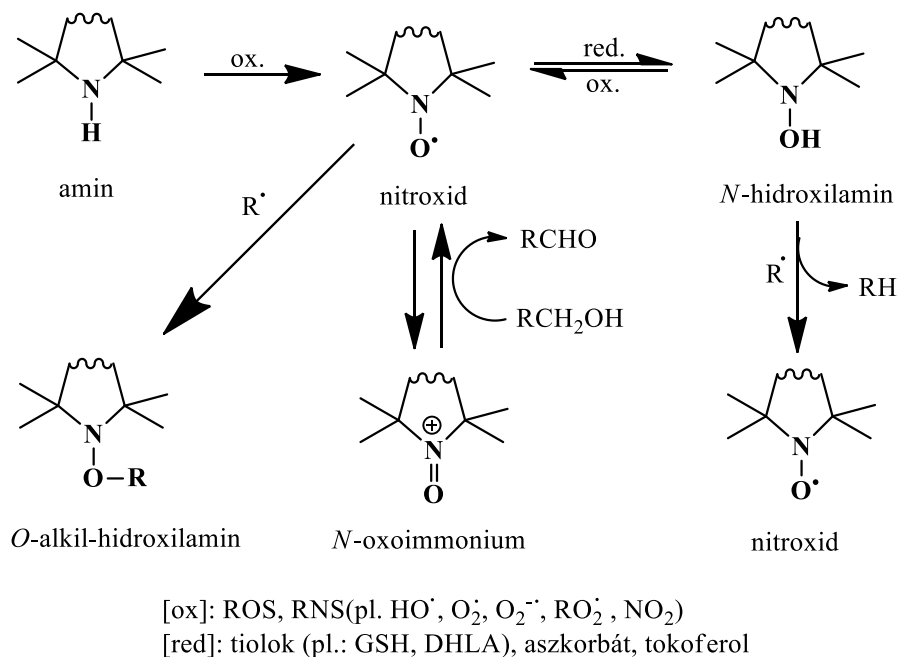
A természetben előforduló kávésav származékok kedvező biológiai aktivitása miatt számos kutatócsoport foglalkozott új vegyületek szintézisével. Ezek közül kiemelhetők a kávésav-fenpropil-észter¹⁶ (3), amely gátolja a HIV integráz enzimet, a kávésav-oktil-észter (4), amelynek amerikai és kínai kutatók eredményei alapján, kifejezettebb az antitumor hatása, mint a CAPE-nek.¹⁷⁻¹⁸ Takahashi és Miyazawa kávésav-serotonin származékokat állítottak elő, melyek közül az 5 származék szelektív COX-2 inhibitor¹⁹ (4. ábra).



4. ábra: Bioaktív kávésav származékok.

2.3. Nitroxid gyökök átalakulásai

A 1980-as évektől kezdve egyre szélesebb körben alkalmazzák a sztérikusan gátolt szekunder aminokat és azok *N*-oxidjait, mint mesterséges antioxidáns kismolekulákat.²⁰ Antioxidáns hatásuk azon alapul, hogy ezek az aminok képesek részt venni a szervezetben lejátszódó egyelektronos folyamatokban, így beépülnek a már korábban említett kaszkád rendszerekbe. Az *N*-hidroxilamin, illetve az amin a C- és az E-vitaminhoz hasonlóan, mint proton és elektron donorok vesznek részt az oxidációs-redukció reakciókban,^{21,22} míg a nitroxid képes reaktív gyökökkel rekombinálódni,²³ illetve *N*-oxoimmóniummá oxidálódni vagy *N*-hidroxilaminná redukálódni.²⁴ Az *N*-hidroxilamin–nitroxid–*N*-oxoimmónium egyensúlyi rendszer szuperoxid dizmutáz és kataláz-szerű hatással rendelkezik, bár ennek aktivitása fiziológiás körülmények között megközelítőleg csak ezredrésze az enzimekének (5. ábra).



5. ábra: A nitroxid gyökök és prekursoraik lehetséges átalakulásai a szervezetben.

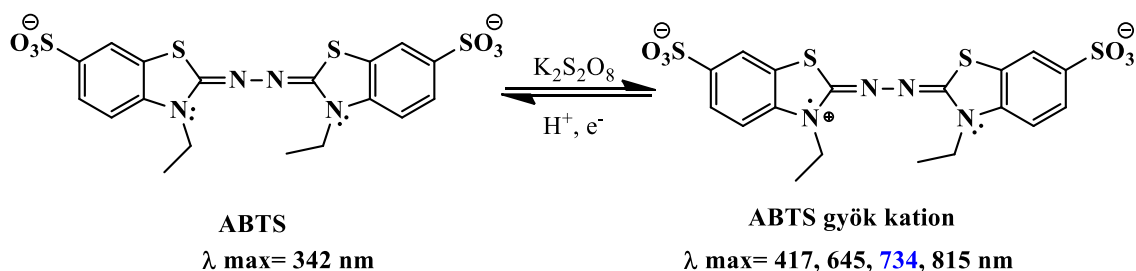
2.4. Antioxidáns mérések előzményei

Az általunk szintetizált vegyületek antioxidáns tulajdonságait két módszerrel vizsgáltuk:

1. Spektrofotometriásan mértük az e^- és H^+ donor képességet az ABTS gyök kation redukcióján keresztül.
2. Elektronspin-rezonancia spektroszkópiával (ESR) a Fenton-reakció gátlását vizsgáltuk a DMPO-OH addukt képződésének inhibícióján keresztül.

2.4.1. ABTS gyök kation módszer

Az antioxidáns vegyületek két mechanizmus szerint semlegesítik a szabad gyököket: egy elektron transzferrel vagy proton transzfer által. Az ABTS módszer alkalmas ezek együttes vizsgálatára²⁵ (6. ábra).



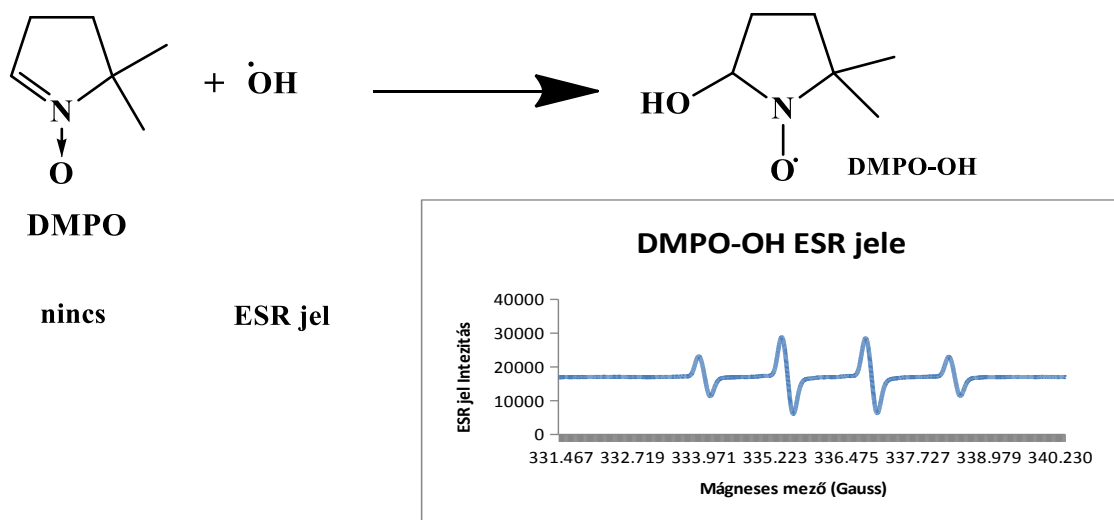
6. ábra: ABTS gyök kation generálása $K_2S_2O_8$ -tal.

Az $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobisz-(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav) gyök kation generálására kálium-perszulfátot használtunk. A reakció 12-16 órát vesz igénybe. Így olyan színes oldat keletkezik, melynek abszorpciós maximuma 417, 645, 734 és 815 nm-en van. Ezek közül a 734 nm alkalmazható leginkább az antioxidáns anyag és az ABTS gyök kation közötti reakció spektrofotometriás monitorozására.

2.4.2. DMPO-OH addukt vizsgálata ESR spektroszkópiával

Megvizsgáltuk az új származékok Fenton-reakciót gátló aktivitását is. Lopes és munkatársai tanninok Fenton-reakció gátlását vizsgálták azáltal, hogy a katekol képes komplexálni a Fe^{2+} - és a Fe^{3+} -ionokat.²⁶ Lengyel kutatók különböző nitroxidok mérései során azt tapasztalták, hogy a nitroxidok oxidálni képesek a Fe^{2+} -ionokat, ezáltal hatékonyan gátolják a Fenton-reakciót.²⁷ A vizsgálatok során a DMPO-OH gyök ESR jel intenzitásának a csökkenését mértük. Ezt a módszert kínai kutatók sikeresen alkalmaztak fenil-propanoidok antioxidáns vizsgálata során.¹¹

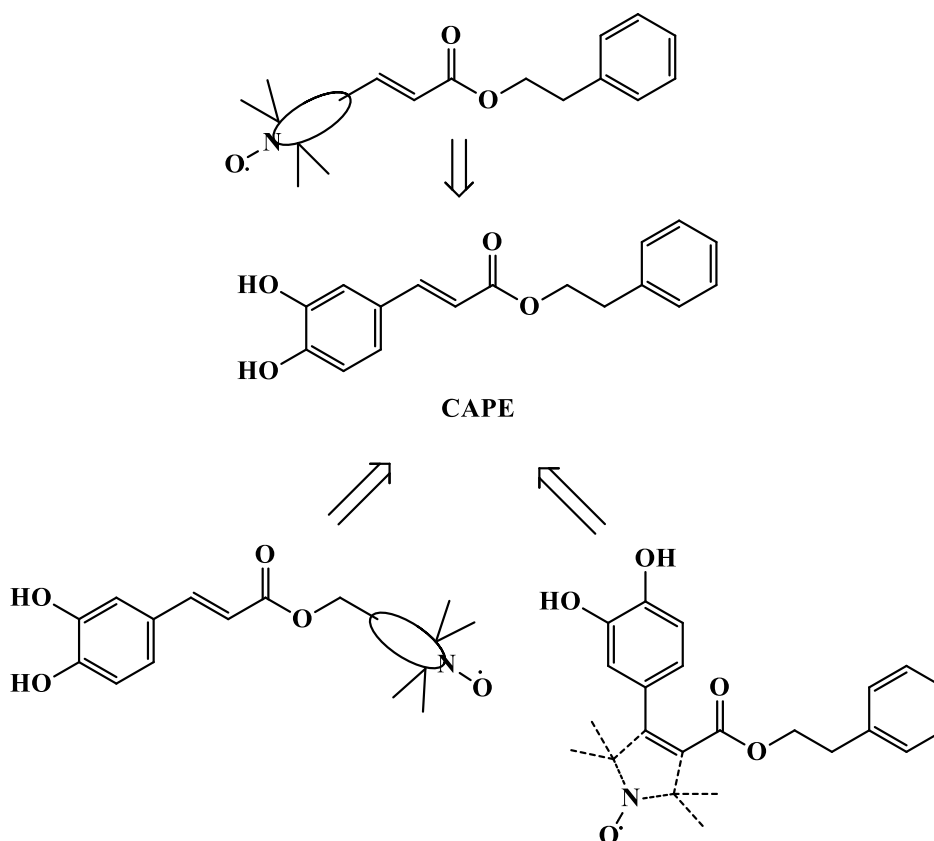
DMPO módszer elve: Az 5,5'-dimetil-1-pirrolin-*N*-oxid a hidroxil gyökkel néhány perc féléletidejű nitroxidot képez, amely kvartett jelét ESR spektroszkópián tudjuk mérni. Az antioxidánsok hatékonyságát a DMPO-OH jel alatti területének csökkenése mutatja (7. ábra).



7. ábra: DMPO-OH gyök vizsgálata ESR spektroszkópiával.

3. Célkitűzések

Az elmúlt évtizedekben intézetünkben számos biológiailag aktív nitroxidot állítottak elő. Több közleményben beszámoltak ismert természetes antioxidánsok paramágneses módosításáról. Többek között új flavon és flavanon származékokat,²⁸ paramágneses rezveratrolokat²⁹ és széleskörű biológiai hatással rendelkező kurkumin analogonokat állítottak elő.³⁰⁻³² Feladatom kávésav-fenetil-észter típusú, várhatóan antioxidáns hatást mutató vegyületek szintézise volt. A CAPE-t 5-tagú és 6-tagú nitroxidokkal kívántuk módosítani, amelyektől azt vártuk, hogy jobb antioxidáns hatást mutassanak, mint az alapvegyület. A módosítások a CAPE katekol gyűrűjét, az akrilát C-C kettős kötését és a fenetil csoportját érintették (8. ábra).

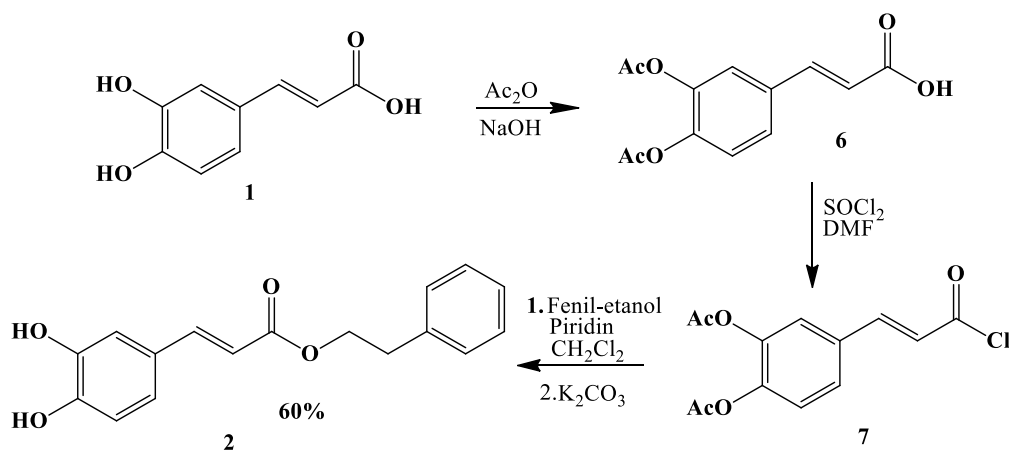


8. ábra: Tervezett kávésav-fenetil-észter módosítások.

4. Saját eredmények

4.1. Kávéssav-fenetil-észter szintézise kávéssavból

Első lépésben korábbi cikkekben már közölt kávéssav-fenetil-észtert állítottuk elő, hogy össze tudjuk hasonlítani antioxidáns hatását az új származékokkal. A kávéssavat (**1**) ecetsavanhidriddel reagáltatva védtük a fenolos hidroxil csoportokat (**6**), majd tionil-kloriddal savkloriddá alakítottuk (**7**). Nukleofil szubsztitúciós reakcióban fenil-etanollal, piridin bázis jelenlétében észterestítettünk. Az utolsó lépésben a védőcsoportokat kálium-karbonáttal távolítottuk el, így jutva a CAPE-hez (**2**) (9. ábra).³³

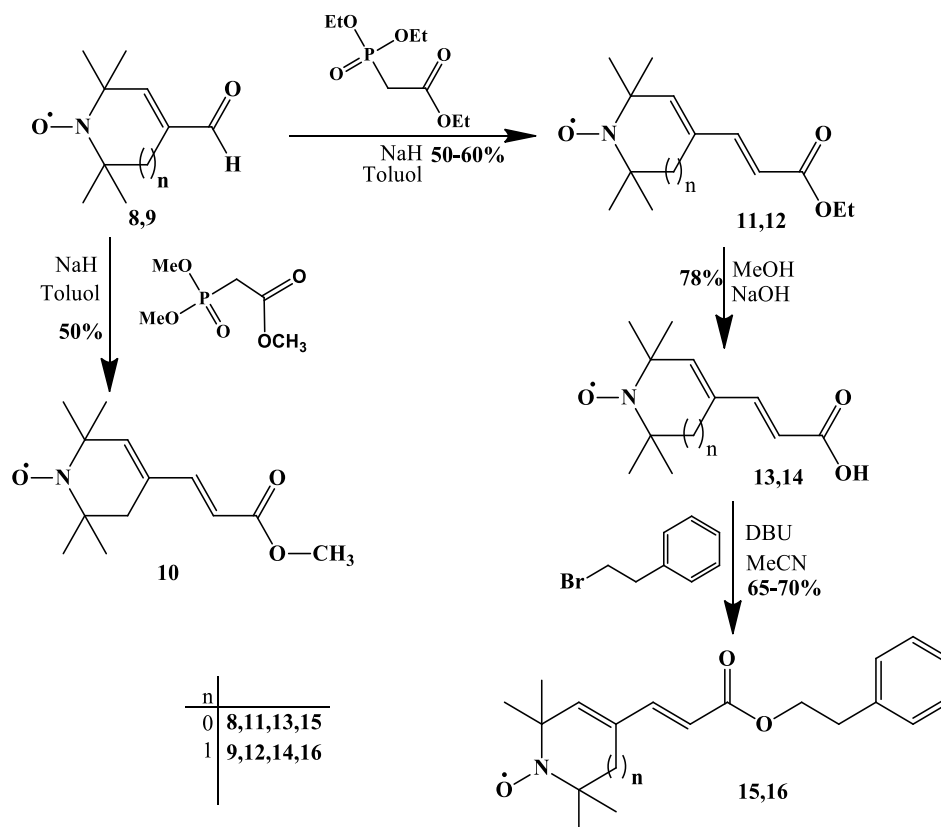


9. ábra: Kávéssav-fenetil-észter (**2**) szintézise.

4.2. Öt- és hattagú nitroxidokkal módosított kávéssav-fenetil-észter típusú vegyületek szintézise

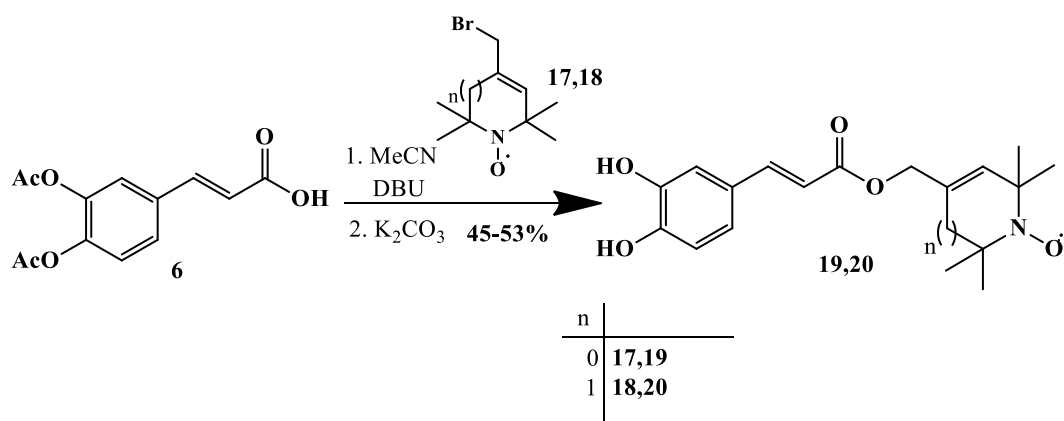
A kávéssav-fenetil-észteren kívül nyolc új kávéssav származékot állítottunk elő. A vegyületeket háromféleképpen módosítottuk. Az első módosítás során a katekol gyűrűt helyettesítettük pirrolin és tetrahidropiridin nitroxidokkal. A paramágneses 5-és 6-tagú aldehideket (**8**, **9**) Horner-Wadsworth-Emmons reakcióban³⁴ α,β -telítetlen észterekké alakítottuk (**10**, **11**, **12**), majd **11** és **12** etil-észtereket NaOH -dal hidrolizáltuk. Végül a kapott **13**, **14** karbonsavakat acetonitrilben feloldottuk és DBU mellett 1-fenetil-bromiddal reagáltattuk, így kaptuk a katekol gyűrűben

helyettesített észtereket (**15**, **16**). A **10** származékot nem alakítottuk tovább, így összehasonlítható az aromás gyűrűt tartalmazó, illetve nem tartalmazó paramágneses akrilsav-észterek antioxidáns tulajdonsága (10. ábra).



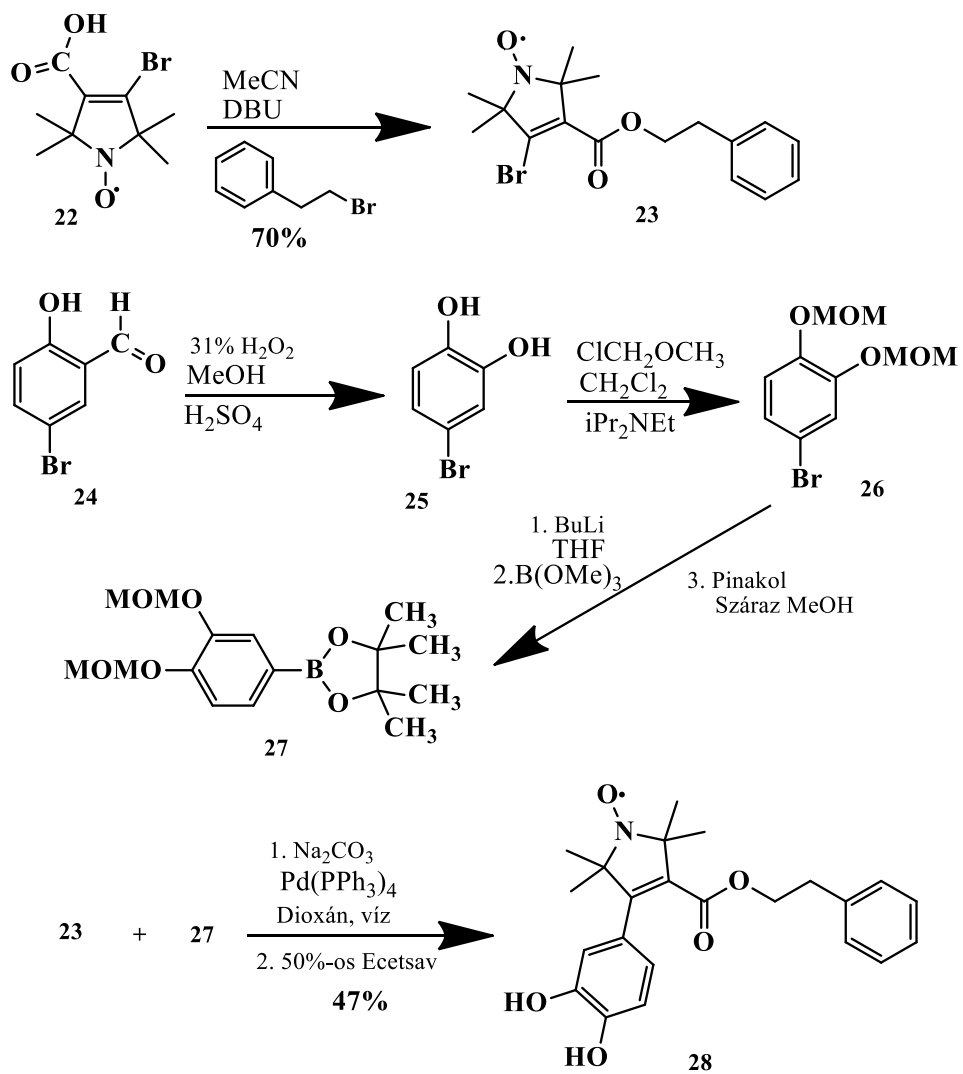
10. ábra: Katekol gyűrű helyettesítése nitroxidokkal.

A fenetil csoport módosításához az előzőleg előállított védett kávéssav (**6**) karboxil csoportját észterestítettük 5-tagú és 6-tagú allil-bromidokkal (**17**, **18**) DBU bázis jelenlétében, majd az acil csoportokat K_2CO_3 -tal eltávolítva jutottunk **19**, **20** kávéssav származékokhoz (11. ábra). Mivel a kapott **19**, **20** vegyületek katekol gyűrűvel és nitroxid funkciós csoporttal is rendelkeznek, várhatóan antioxidáns tulajdonsággal bírnak.



11. ábra: Fenetil csoportban módosított származékok szintézise.

A harmadik típusú módosításnál a fenil-akrilát kettős kötését cseréltük le 5-tagú telítetlen nitroxidra. A szintézishez két kulcsvegyületet kellett előállítanunk. A **23** észtert a **22** telítetlen karbonsavból a **15**, **16** nitroxidokhoz hasonlóan, míg a **27** pinakol-észtert a kereskedelemben kapható 5-bróm-szalicil-aldehidből (**24**) kiindulva állítottuk elő. Első lépésben a **24** aldehidet módosított Dakin-oxidációban H_2O_2 -dal bróm-katekollá (**25**) alakítottuk,³⁵ majd ezt metoxi-metil-kloriddal O-alkileztük (**26**).³⁶ A védett bróm-katekolt lítiáltuk, trimetil-boráttal reagáltattuk, végül a kapott boronsavat pinakollal észteresítve előállítottuk a pinakolátot (**27**). Az öttagú telítetlen nitroxid észtert (**23**) Suzuki-reakcióban vizes dioxánban, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ katalizátor és Na_2CO_3 jelenlétében kapcsoltuk a boronsav-észterrel (**27**), így jutva el a védőcsoportot tartalmazó kávéssav származékhoz. Végül a metoxi-metil csoportokat ecetsavval hidrolizálva megkaptuk a para-szubsztituált paramágneses katekolt (**28**) (12. ábra).



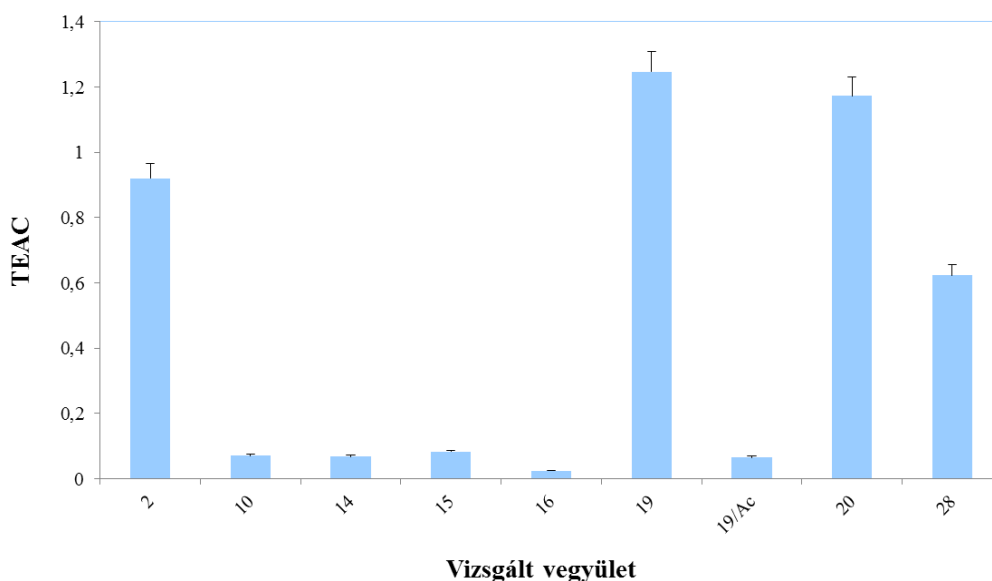
12. ábra: **28** CAPE származék szintézise.

5. Antioxidáns vizsgálatok eredményei

5.1. ABTS gyök kation mérés eredményei

A mérések során 1990, 1970, 1960 és 1950 μL ABTS oldatokhoz 10, 30, 40 és 50 μL (0,5 mM) antioxidáns oldatokat adtunk, így 2,5, 7,5, 10, 12,5 μM koncentrációjú oldatokat kaptunk. 6 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után megmértük az antioxidáns oldatok abszorpcióját, illetve a vak oldat elnyelését is. A koncentráció-abszorbancia függvények egyenesének meredeksége mutatja az antioxidáns hatékonyságot.

Az általunk vizsgált vegyületek ABTS gyök kationt redukáló képességét a 13. ábra mutatja be. Ezen az ábrán a vizsgált vegyületek Trolox Ekvivalens Antioxidáns Kapacitásainak (TEAC) értékeit prezentáljuk.



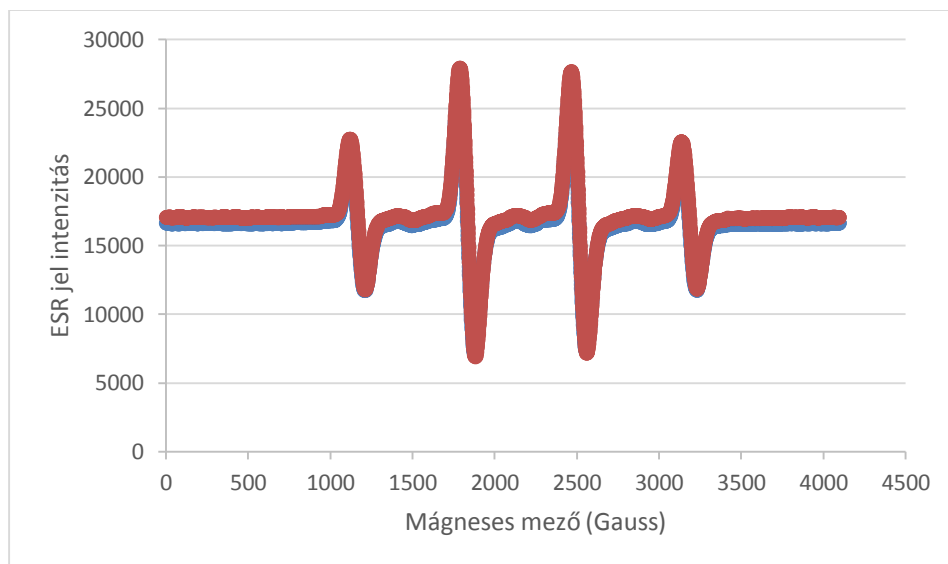
13. ábra: Vegyületek H^+ és e^- donor képességének vizsgálata.

Az előállított vegyületek közül a CAPE alapvegyület (**2**) és a **19**, **20** és **28** vegyületek jó antioxidáns aktivitást mutattak, ezen vegyületek TEAC aktivitása meghaladta a 0,5-ös értéket. A **10**, **14**, **15**, **16** és a **19/Ac** vegyületek vizsgálatánál gyenge (0,11 érték alatti) TEAC-t észleltünk. A **19**, **20** vegyületek jelentősen

meghaladják a trolox és a CAPE aktivitását egyaránt. Ezek a származékok katekol gyűrűt és nitroxid funkciós csoportot egyaránt tartalmaznak.

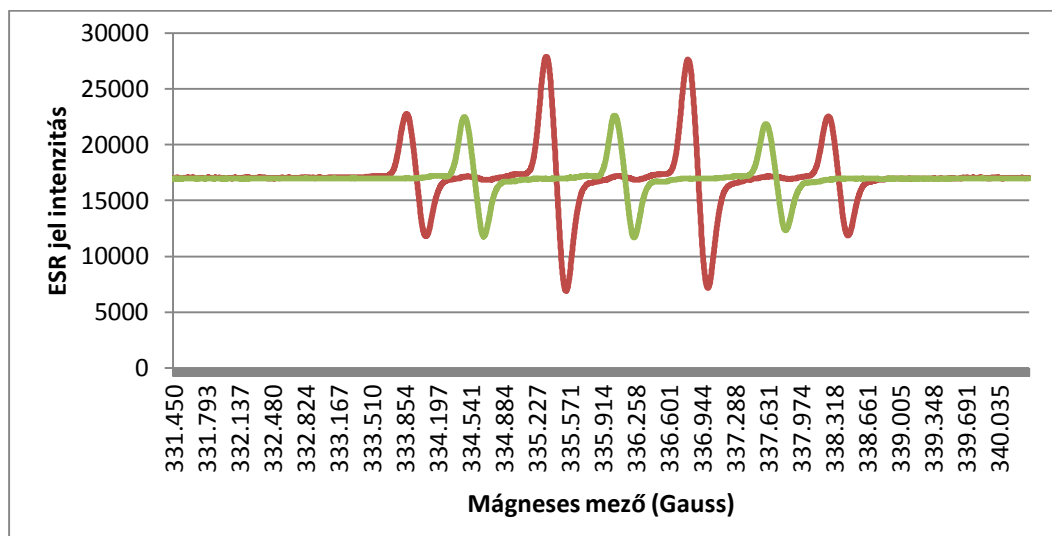
5.2. DMPO-OH módszer eredményei

Megvizsgáltuk a **2, 10, 14, 15, 16, 19/Ac, 19, 20, 28** vegyületek és a trolox Fenton-reakciót gátló hatását. DMPO (100 mM) vizes oldatában Fe^{2+} -ionok és H_2O_2 reakciójában hidroxil gyököt generáltunk, amelynek 5,5'-dimetil-1-pirrolin-*N*-oxiddal képzett adduktját (DMPO-OH) ESR spektroszkópiával detektáltuk. A mérés kivitelezéséhez az egyes komponensekre nézve 100 mM DMPO-t, 100 μM H_2O_2 -ot, 100 μM FeSO_4 -ot és 50 μM antioxidánst tartalmazó oldatokat készítettünk, majd a FeSO_4 hozzáadása után 10 perccel mértük a DMPO-OH ESR jelét. Az ESR kvartett jelének csökkenése mutatja a vegyületek antioxidáns hatékonyságát. 50 μM CAPE-t (2) tartalmazó DMPO oldat esetében (kék) kisebb a DMPO-OH koncentrációja, mint az antioxidánst nem tartalmazó oldatban (14. ábra).



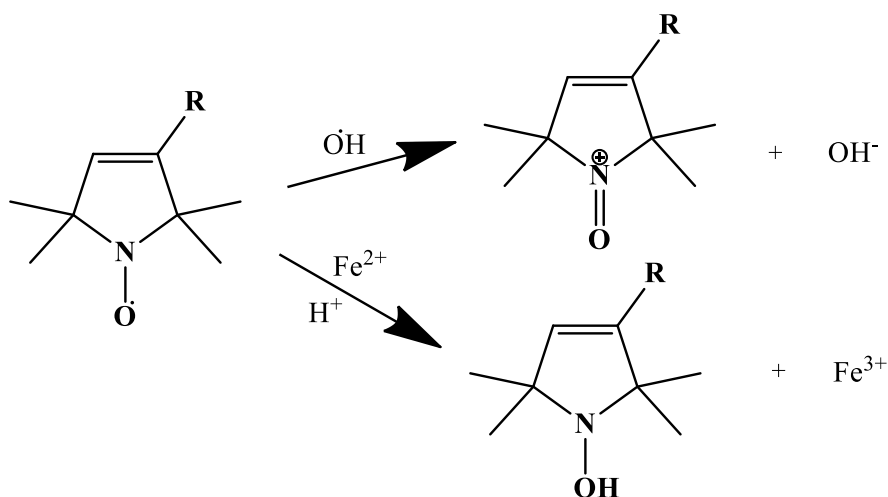
14. ábra: DMPO-OH ESR jele CAPE hiányában (bordó) és jelenlétében (kék).

A nitroxidot tartalmazó minták esetében az ESR jel módosul, mivel a DMPO-OH kvartettje mellett megjelenik a nitroxidok izotróp tripléttje is, ez azonban nem zavarja a mérést, mert, a DMPO-OH és a nitroxidok eltolódása, illetve a csatolási állandók különböznek. A Fenton-reakciós minták esetében a vegyületeink triplétt jele lecsökken, ami mutatja a nitroxid funkciós csoport reakcióban való részvételét (15. ábra).



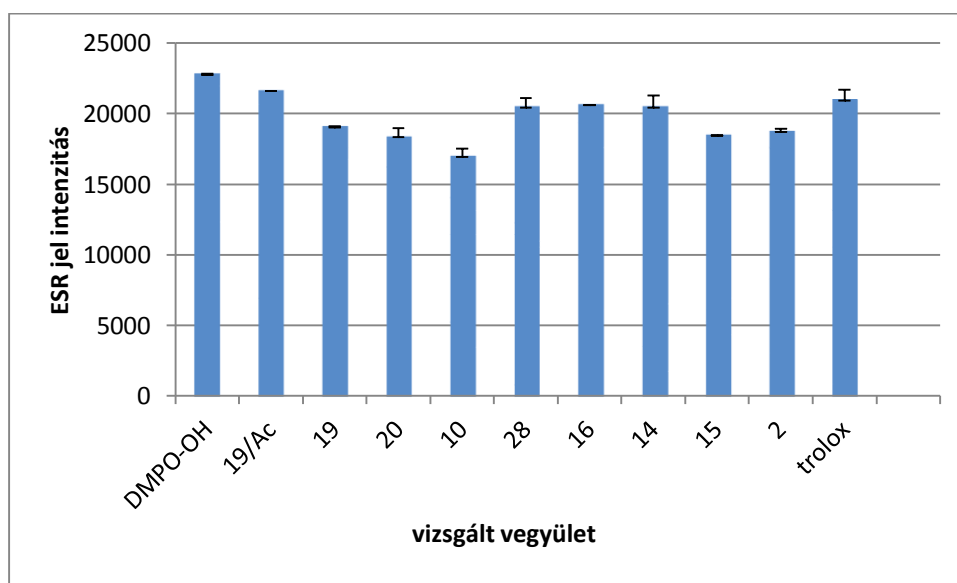
15. ábra: A **19** nitroxid ESR spektruma vizes oldatban (50 μ M) (zöld), illetve Fenton-reakcióban (bordó).

Glebska és munkatársai által közölt adatok alapján²⁷ ennek két oka is lehet. A nitroxid reakcióba léphet a képződött hidroxilgyökkel, vagy a vas(II)-ionokkal, bár az első esetben redukálószerként, a másodikban oxidálószerként viselkedik, a termék mindkettőnél diamágneses lesz, ezért ESR-jel csökkenést tapasztalunk (16. ábra).



16. ábra: Nitroxidok reakciói Fenton-körülmények között.

A 17. ábra foglalja össze a vegyületek hatását Fenton-reakcióban. Vegyületeink a **19/Ac** kivételével hatékonyabbak voltak a troloxnál, azonban a CAPE aktivitását csak a **10**, **15**, **20** nitroxidok haladták meg, az ABTS mérés esetében leghatékonyabbnak talált vegyületek (**19**, **20**) ebben az esetben is hatásosak voltak, azonban két, katekol gyűrűt nem tartalmazó észter (**10**, **15**) is jó antioxidánsnak bizonyult, ami igazolja, hogy a nitroxidok önmagukban is képesek gátolni a Fenton-reakciót.



17. ábra: DMPO-OH koncentráció csökkenésének vizsgálata.

6. Kísérleti rész

A vegyületek olvadáspontját Boetius olvadáspontmérő készülékkel határoztuk meg, az értékek nem korrigáltak. A tömegspektrumok VG TRIO-2 és Thermoquest Multi készülékekkel készültek, elektron impact ionizációval. Az elemanalízis méréseket EA1110 CHNS elemanalizátorral végeztük. A vegyületeket Merck szilikagélen (40-63 μ m szemcseméret) tisztítottuk. A vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokat GF₂₅₄ Merck-szilikagél lapokon végeztük. A **2**³³, **11**³⁷, **13**³⁷, **17**³⁸, **18**³⁹, **21**⁴⁰, **22**⁴¹ vegyületeket a korábban leírtaknak megfelelően állítottuk elő. A többi reagenst, oldószert a Reanal, Fluka vagy Aldrich cégektől szereztük be. A spektrofotometriai mérések Specord 40 készülékkel történtek, 734-nm-en. Az ESR spektroszkópai méréseket MiniScope MS200 műszerrel, míg az NMR mérést Bruker Avance III készülékkel 500 MHz-en difenil-hidrazin jelenlétében végeztük.

Általános leirat a Horner-Wadsworth-Emmons reakcióhoz (10, 12)

NaH (0,3 g; 12,5 mmol) száraz THF-os (10 ml) oldatához N₂ gáz alatt 0 °C-ra történő hűtés után trietil-foszfono-acetátot (1,12 g; 5,0 mmol), illetve a **10** vegyület előállítása esetében trimetil-foszfono-acetátot (910 mg, 5,0 mmol) adtunk, majd a 10 perc kevertetés után hozzáadtuk a **9** vegyületeket (910 mg, 5,0 mmol). Az elegyet 30 percig kevertetve refluxoltattuk, majd lehűtöttük, ezt követően sós vizet (20 ml) és étert (20 ml) adtunk a keverékhez, a fázisokat elválasztottuk, a vizes fázist további éterrel (20 ml) extraháltuk. Szárítás (MgSO₄) és szűrés után kromatográfiás tisztítással jutottunk az észterekhez. A **12** vegyületet a **14** származék szintéziséhez használtuk fel.

4-metil-(1-oxil-2,2',6,6'-tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)akrilát gyök (10): 655 mg (55%), narancssárga kristályos anyag, op.: 77-79 °C; R_f: 0,5 (Hexán/EtOAc, 2:1). MS (EI) m/z (%): 238 (M⁺, 93), 208 (28), 193 (30), 149 (100); Elemanalízis: C₁₃H₂₀NO₃ Számított: C 65,52; H 8,46; N 5,88; Mért: C 66,33; H 8,71; N 5,37. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7,34 (d, J=15,8 Hz, 1H), 5,914 (s, 1H), 5,2 (d, J=15,7 Hz, 1H), 3,789 (s, 3H), 2,229 (s, 2H), 1,318 (s, 6H), 1,231 (s, 6H) ppm.

(1-oxil-2,2',6,6'-tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)-akrilsav gyök (14) szintézise:

A **12** nitroxid (450 mg, 2,0 mmol) etanolos (10 ml) oldatához 10 %-os NaOH-ot (5 ml) adtunk, majd szobahőmérsékleten 1 órát kevertettük. A reakció lejátszódása után 5 %-os kénsavval savanyítottuk meg az oldatot, majd vizet adtunk hozzá, kloroformmal extraháltuk (2 x 20 ml), a szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk. Ezek után oszlopkromatográfiásan (Hexán/EtOAc) tisztítottuk. 350 mg (78 %) halványsárga kristály, op.: 155-157 °C; R_f: 0,19 (CHCl₃/Et₂O, 2:1). MS (EI) m/z (%): 224 (M⁺, 76), 194 (32), 179 (72), 149 (100); Elemanalízis: C₁₂H₁₈NO₃ Számított: C 64,26; H 8,09; N 6,25; Mért: C 63,00; H 8,10; N 5,53.

Paramágneses fenetil-észterek szintézise (15, 16, 24)

A **13, 14, 23** karbonsavakat (1,0 mmol) acetonitrilben (5 ml) oldottuk, majd DBU-t (167,5 mg, 11 mmol) és 1-fenetil-bromidot (277 mg, 1,5 mmol) adtunk az oldatokhoz. 24 órás szobahőmérsékleten történő állás után az oldószert lepároltuk, oszlopkromatográfiás (Hexán/EtOAc) tisztítás után jutottunk az észterekhez 65-70 %-os kitermeléssel.

4-fenetil-(1-oxil-2,2',5,5'-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)akrilát gyök (15): 222 mg (70%), citromsárga színű szilárd anyag, op.: 49-51 °C; R_f: 0,5 (Hexán: EtOAc, 2:1). MS (EI) m/z (%): 314 (M⁺, 6), 299 (5), 284 (18), 105 (100), 91 (44); Elemanalízis: C₁₉H₂₄NO₃ Számított: C 72,58; H 7,69; N 4,46; Mért: C 72,50; H 7,75; N 4,17.

4-fenetil-(1-oxil-2,2',6,6'-tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)akrilát gyök (16): 215 mg (65%), narancssárga színű szilárd anyag, op.: 61-63 °C; R_f: 0,61 (Hexán/EtOAc, 2:1). MS (EI) m/z (%): 328 (M⁺, 2), 179 (7), 149 (31), 105 (100); Elemanalízis: C₂₀H₂₆NO₃ Számított: C 73,14; H 7,98; N 4,26; Mért: C 72,97; H 8,04; N 4,02.

3-fenetil-(4-bróm-1-oxil-2,2',5,5'-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)karboxilát gyök (24): 257 mg (70%), sárga kristályos anyag, op.: 62-64 °C; R_f: 0,64 (Hexán/EtOAc, 2:1). MS (EI) m/z (%): 368 (M⁺, 17), 366 (M⁻, 17), 338 (1), 336 (1), 266 (4), 264 (4), 105 (100); Elemanalízis: C₁₇H₂₁BrNO₃ Számított: C 55,60; H 5,76; Br 21,76; N 3,81; Mért: C 55,78; H 5,92; N 3,59.

A 19, 20 észterek szintézise

A **6** karbonsavat (2,64 g, 10 mmol) acetonitrilben, DBU (1,67 g, 11 mmol) bázis jelenlétében **17**, **18** allil-bromidokkal (10 mmol) reagáltattuk szobahőmérsékleten, 24 órán keresztül, így kaptuk a **19/Ac**, **20/Ac** védett származékokat. A **19/Ac**, **20/Ac** vegyületeket (5,0 mmol) MeOH-CH₂Cl₂ (1:1, 20 ml) elegyében feloldottuk, majd K₂CO₃-ot (2,07 g, 15 mmol) adtunk hozzá, szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettük, majd bepároltuk. Ezután 5%-os H₂SO₄-at (30 ml) adtunk a maradékhoz és EtOAc-tal (2 x 20 ml) extraháltuk. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, majd kromatográfiásan (Hexán/EtOAc) tisztítottuk. A két reakció kitermelése 45-53% volt.

(1-oxil-2,2',5,5'-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)-metil-3-(3,4-dihidroxifenil)-akrilát

(19): 936 mg (45%), halványbarna kristály, op.: 118-120 °C; R_f: 0,38 (Hexán/EtOAc, 2:1). MS (EI) m/z (%): 332 (M⁺, 3), 317 (1), 182 (72), 107 (100); Elemanalízis: C₁₈H₂₂NO₅ Számított: C 65,05; H 6,67; N 4,21; Mért: C 63,14; H 7,05; N 3,83.

(1-oxil-2,2',6,6'-tetrametil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)-metil-3-(3,4-dihidroxifenil)-akrilát (20): 1,14 g (53%), sárga olaj, R_f: 0,25 (CHCl₃/Et₂O, 2:1). MS (EI) m/z (%): 346 (M⁺, 4), 307 (5), 234 (26), 163 (100); Elemanalízis: C₁₉H₂₄NO₅ Számított: C 65,88; H 6,98; N 4,04; Mért: C 65,19; H 7,33; N 3,79.

3-fenetil-karboxilát-4-(3,4-dihidroxifenil)-2,2',5,5'-tetrametil-2,5-dihidropirrol-1-oxil gyök (28) szintézise:

1. Suzuki-kapcsolás (védett **28** szintézise): A **23** (545 mg, 1,5 mmol) vegyület vizes dioxános deoxigenizált (N₂ átbuborékolatás 10 percen át) oldatához hozzáadtuk a Pd(PPh₃)₄ (75mg, 0,067 mmol) katalizátort majd a **27** (490 mg, 1,5 mmol) pinakolátot és 10%-os vizes Na₂CO₃ oldatot (5 ml). A reakcióelegyet nitrogén alatt három órán át kevertettük reflux hőmérsékleten. A reakció lejátszódása után az oldószert lepároltuk, a maradékot CHCl₃-ban (20 ml) feloldottuk és vízzel (10 ml) mostuk. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, szűrtük, bepároltuk. A terméket flashkromatográfiásan (Hexán/EtOAc) tisztítottuk.

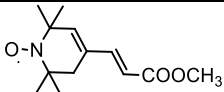
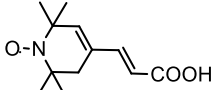
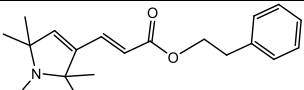
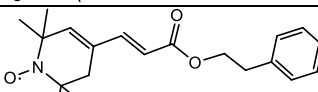
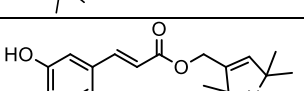
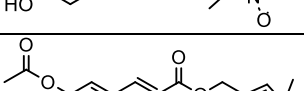
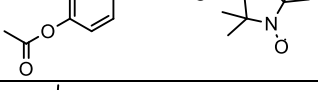
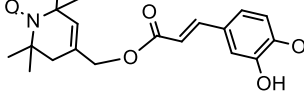
Fenetil-4-(3,4-bisz(metoximetoxi)fenil)-1-oxil-2,2',5,5'-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-karboxilát. Kitermelés: 420 mg (58%), barna olaj; R_f: 0,43 (EtOAc/Hexán, 2:1). MS (EI) m/z (%): 484 (M⁺, 6), 470 (1), 274 (30), 105 (100).

2. A védett **28** (400 mg, 0,82 mmol) vegyületet 50%-os CH₃COOH-ban feloldottuk (30 ml), majd cc. H₂SO₄ (0,1 ml) hozzáadása után 10 percig reflux hőmérsékleten kevertettük.

Ezután K_2CO_3 -tal semlegesítettük, vizet (20 ml) és EtOAc-ot (30 ml) adtunk hozzá, a fázisokat elválasztottuk, majd a vizes fázist további EtOAc-tal (20 ml) extraháltuk. $MgSO_4$ -on történő szárítás után az oldószert lepároltuk, majd a terméket oszlopkromatográfiásan (Hexán/EtOAc) tisztítottuk. Kitermelés: 260 mg (80%), világosbarna kristály; op.: 46-48 °C R_f : 0,19 (EtOAc/Hexán, 2:1). MS (EI) m/z (%): 396 (M^+ , 49), 381 (5), 366 (6), 105 (100); Elemanalízis: $C_{23}H_{26}NO_5$ Számított: C 69,68; H 6,61; N 3,53; Mért: C 59,94; H 7,57; N 1,97.

7. Összefoglalás

Várhatóan antioxidáns tulajdonságú, a katekol gyűrűben, a fenetil-csoportban és az α,β -telítetlen-észter C-C kettős kötésében módosított kávésav-fenetil-észter analogonokat állítottunk elő. Ezek antioxidáns tulajdonságát ABTS gyök kation módszerrel és Fenton-reakció gátlásán keresztül vizsgáltuk. Vegyületeink a Fenton-reakciót a troloxnál hatékonyabban gátolták. Közülük is kiemelhető kettő nitroxid (**19**, **20**), amelyek az ABTS módszer esetében is jóval hatékonyabbak voltak a kontroll vegyületnél ($\text{TEAC} > 1,17$). Eredményeink azt mutatják, hogy a katekol és a nitroxid antioxidáns funkciós csoportok szinergisztikus hatása kedvezően befolyásolja a vegyületek tulajdonságait, ezért ezek a vegyületek alkalmasnak tűnnek részletesebb biológiai vizsgálatokra is.

Vegyület		ABTS módszer	ESR módszer
Neve	Képlete	(TEAC értékek)	(Intenzitás, mT)
Trolox		1	22760
2		0,91	18720
10		0,07	16940
14		0,06	20440
15		0,08	18440
16		0,02	20600
19		1,24	19040
19/Ac		0,06	21600
20		1,17	18340
28		0,62	20440

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Bognár Balázs egyetemi adjunktusnak, a munkám szakmai irányításáért, Dr. Hideg Kálmán egyetemi tanárnak, Dr. Kálai Tamás egyetemi tanárnak a munkánk során felmerült problémák megoldásában nyújtott segítségért és Pápayné Dr. Sár Cecília egyetemi docensnek a munkám támogatásáért. Köszönet illeti a labor munkatársait Balog Máriát, Horváthné Csokona Violát, Kish Krisztinát, Kneif Adriennét és Lazsányi Noémit a kiindulási vegyületek szintézisében nyújtott segítségükért és az elemanalízis mérésekért.

9. Irodalomjegyzék

1. Finkel, T.; Holbrook, N. J. *Nature*, **2000**, 408, 239.
2. Bergendi, L.; Beneš, L.; Ďuračková, Z.; Ferenčík M. *Life Sciences* **1999**, 65, 1865.
3. Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, **1999**.
4. Perkins, M. J. *Radical chemistry; The fundamentals*, Oxford University Press, Oxford **2000**.
5. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. , Paganga, G. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20, 933.
6. Hou, W-C.; Lin, R-D.; Lee, T-H.; Huang, Y-H Hsu, F-L.; Lee, M-H. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, 85, 615.
7. Farkas, G.; *Növényi Biokémia*, 3. kiadás, Akadémiai Kiadó, Budapest **1984**.
8. Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. *Fitoterapia* **2002**, 73, 21.
9. Lopes, G. K.; Schulman, H. M.; Hermes-Lima, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1472, 142.
10. Tu, T. T.; Giblin, D. D.; Gross, M. L. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, 24, 1527.
11. Chang, Y-C.; Lee, F-W.; Chen, C-S.; Huang, S-T.; Tsai, S. H., Huang, S-H.; Lin, C-M. *Free Rad. Biol. Med.* **2008**, 43, 1541.
12. Irmak, M. K.; Koltuksuz, U.; Kutlu N. O., Yağmurca M.; Ozyurt H.; Karaman, A.; Akyol, O. *Uro. Res.* **2001**, 3, 190.
13. Scapagnini, G.; Foresti, R.; Calabrese, V.; Giuffrida Stella, A. M.; Green, C. J.; Motterlini, R. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 554.
14. Fadillioglu, E.; Oztas, E.; Erdogan, H.; Yagmurca, M.; Sogut, S.; Ucar, M.; Irmak, M. K.; *J. Appl. Toxicol.* **2004**, 24, 47.
15. Okutan, H.; Ozcelik, N.; Yilmaz, H. R.; Uz, E. *Clin. Biochem.* **2005**, 38, 191.
16. Natarajan, K.; Singh, S.; Burke, T. R.; Grunberger, D.; Aggarwal, B. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9090.

17. Nagaoka, T.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Saiki I.; Kadota S. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3351.
18. Etzenhouser, B.; Hansch, C.; Kapur, S.; Selassie, C.D. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *9*, 199.
19. Takahashi, T.; Miyazawa, M.; Kowakae, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2494.
20. Likhtenshtein, G. I.; Yamauchi, J.; Nakatsuji, S.; Smirnov, A. I.; Tamura, R. Nitroxides; *Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science* 1st ed. Wiley-VCH, **2008**.
21. Krishna, M. C.; DeGraff, W.; Hankovszky, O. H.; Sár, C. P.; Kálai, T.; Jekő, J.; Russo, A.; Mitchell, J. B.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3477.
22. Chen, K.; Swartz, H. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *970*, 720.
23. Li, B. B.; Gutierrez, P. L.; Blough, N. V. *Meth. Enzymol.* **1999**, *300*, 202.
24. Couet, W. R.; Brasch, R. C.; Sosnovsky, G.; Tozer, T. *N. Mag. Res. Imaging* **1985**, *3*, 83.
25. Re, R. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 231.
26. Lopes, B. K.G.; Schulmann, H.; Lima, M. M. H. *Biochim. Biophys.* **1999**, *1472*, 142.
27. Glebska, J.; Pulasky, L.; Gwozdzinky, K.; Skolimonsky, J. *Biometals* **2001**, *14*, 159.
28. Kálai T.; Kulcsár, Gy.; Ösz E.; Jekő J.; Sümegi B., Hideg, K. *Arkivoc.* **2004**, *12*, 266.
29. Kálai, T.; Borza, E.; Antus, Cs.; Radnai, B.; Gulyás F, G.; Fehér, A.; Sümegi, B.; Hideg, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7311.
30. Dayton, A.; Selvendiran, K.; Meduru, S.; Khan, M.; Kuppusamy, M. L.; Naidu, S.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2011**, *2*, 350.

31. Selvendiran, K.; Ahmed, S.; Dayton, A.; Kuppusamy, M. L.; Rivera, B. K.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *12*, 837.
32. Kálai, T.; Kuppusamy, M. L.; Balog, M.; Selvendiran, K.; Rivera, B. K.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5414.
33. Touaibia, M.; Guay, M. J. *Chem. Edu.* **2011**, *88*, 473.
34. Kálai, T.; Szabó, Z.; Jekő, J.; Hideg, K. *Org. Prep. Proc. Int.* **1996**, *28*, 289.
35. Alamgir, M.; Mitchell, P. S. R.; Bowyer, P. K.; Kumar, N.; Black, StC. D. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7136.
36. Fujikawa, N.; Ohta, T.; Yamaguchi, T.; Fukuda, T.; Ishibashi, F.; Iwao, M. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 594.
37. Mustafi, D.; Boisvert, E. W.; Makinen, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3674.
38. Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Lex, L. *Synthesis* **1980**, 914.
39. Hideg, K.; Csekő, J.; Hankovszky, H. O.; Sohár, P. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 1482.
40. Rozantsev, E. G. „Free Nitroxyl Radicals”, Plenum press: New York, **1970**.
41. Chudinov, A. V.; Rozantsev, E. G.; Rosinov, B. V.; *Izv. Acad. Nauk. Ser. Khim.* **1983**, 409.

