



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Julius Tamošiūnas

**3-[(4-METIL-3-NITROFENIL)AMINO]PROPANHIDRAZIDO
DARINIŲ SINTEZĖ, TECHNOLOGIJA IR BIOLOGINIŲ
SAVYBIŲ TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

KAUNAS, 2016

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**3-[(4-METIL-3-NITROFENIL)AMINO]PROPANHIDRAZIDO
DARINIŲ SINTEZĖ, TECHNOLOGIJA IR BIOLOGINIŲ
SAVYBIŲ TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas
Chemijos inžinerija (621H81004)

Vadovas

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentas

Doc. dr. Kęstutis Rutkauskas

Projektą atliko

Julius Tamošiūnas

KAUNAS, 2016



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Julius Tamošiūnas

(Studento vardas, pavardė)

Chemijos inžinerija, 621H81004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazido darinių sintezė, technologija ir biologinių savybių tyrimai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 16 m. birželio 07 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Juliaus Tamošiūno**, baigiamasis projektas tema „3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazido darinių sintezė, technologija ir biologinių savybių tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

IŽANGA	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1 Biologiškai aktyvių junginių sintezė	10
1.2 Biologiškai aktyvių junginių savybės	12
1.2.1 Nitro grupė junginiuose	12
1.2.2 Hidrazidai	13
1.2.3 Hidrazonai	14
1.2.4 Pirazolai	14
1.2.5 Pirolai	15
1.2.6 Pirolidin-2,5-dionai ir oksadiazolai	15
1.2.7 Antipirinas	16
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	17
2.1 Biologiškai aktyvių junginių sintezė	17
2.2 Biologiškai aktyvių junginių sintezės aptarimas	22
2.3 DPPH radikalo slopinimas	26
2.4 Antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą	26
2.5 Redukcinės savybės	27
2.7 Deoksiribozės apsauga nuo hidroksi-radikalų	28
2.8 ABTS radikalo slopinimas	29
2.9 Susintetintų junginių poveikis miežių augimui	29
2.10 Pigmentų kiekio augaluose nustatymas	30
2.11 Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH	30
2.12 Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą	31
2.13 Redukcinių savybių nustatymas augaluose	31
2.14 Antibakterinio aktyvumo nustatymas agar difuziniu metodu	32
3. REZULTATAI	33
3.1 Biologiškai aktyvių junginių sintezės rezultatai	33
3.2 Sintetintų junginių DPPH radikalo slopinimo įvertinimas	34
3.3 Sintetintų junginių antioksidacinio aktyvumo pagal FRAP metodą įvertinimas	35
3.4 Sintetintų junginių redukcinių savybių įvertinimas	37
3.5 Sintetintų junginių ABTS radikalo slopinimo įvertinimas	37
3.6 Sintetintų junginių vandenilio peroksido suardymo įvertinimas	38
3.7 Sintetintų junginių deoksiribozės apsaugos nuo hidroksi-radikalų įvertinimas	39

3.8 Sintetintų junginių poveikio miežių augimui įvertinimas	40
3.9 Sintetintų junginių įtakos miežių pigmentų kiekiui įvertinimas.....	41
3.10 Sintetintų junginių įtakos miežių DPPH radikalo slopinimo savybėms įvertinimas	42
3.11 Sintetintų junginių įtakos miežių antioksidaciniam aktyvumui pagal FRAP metodą įvertinimas	43
3.12 Sintetintų junginių įtakos miežių redukciniams savybėms įvertinimas.....	45
3.13 Sintetintų junginių antibakterinio aktyvumo agarų difuziniu metodu įvertinimas	45
4. REKOMENDACIJOS.....	47
IŠVADOS	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS	52

Tamošiūnas, Julius. 3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazido darinių sintezė, technologija ir biologinių savybių tyrimai. Magistro baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: Chemijos ir procesų inžinerija, Technologijos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: sintezė, biologija, tyrimai, technologija, hidrazidas.

Kaunas, 2016. 55 p.

SANTRAUKA

Šiame darbe vykdytos 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazido reakcijos su keliais skirtingais organiniais reagentais siekiant gauti įvairius jo darinius. Hidrazido gavimui 4-metil-3-nitroanilinas buvo veiktas akrilo rūgštimi, iš gautos karboksirūgšties gautas esteris, o šis veiktas su hidrazino monohidratu. Gavus hidrazidą, buvo vykdomos jo reakcijos su 2,4-pentandionu, 2,5-heksandionu, acetonu, anglies disulfidu, maleino rūgšties anhidridu ir malono rūgšties anhidridu, gaunant skirtingų organinių grupių darinius. Gautieji junginiai patvirtinti ^1H BMR, ^{13}C BMR bei elementinės analizės duomenimis.

Tirta hidrazido gavimo tarpinių junginių bei jo darinių biologinės savybės. Nustatytos antioksidacinės savybės, redukcinės ir DPPH bei ABTS radikalų slopinimo savybės, vandenilio peroksido suardymo bei deoksiribozės apsaugos nuo hidroksi-radikalų efektyvumas. Taip pat tirtas antibakterinis aktyvumas ir atrinktų medžiagų miežių augimo skatinimo gebėjimas.

Trys junginiai, pasižymėję geriausiu antioksidaciniu aktyvumu, buvo atrinkti miežių augimo *in vitro* reguliavimo tyrimams. 3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas geriausiai skatino miežių augimą, *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas turėjo didžiausią įtaką pigmentų kiekiui miežiuose, o 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tionas pasižymėjo didžiausia įtaka miežių antioksidacinėms savybėms. Metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino] propanoatas, 3-(2-{3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino] propanoil}hidrazinil)propano rūgštis ir *N*-(2,5-dioksopirolidin-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas pasižymėjo antibakteriniu veiksmingumu prieš *E. coli*. *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas parodė reikšmingus rezultatus daugumoje biologinių tyrimų ir buvo parinktas gamybai. Nubraižyta jo gamybos linija ir apskaičiuoti pagrindiniai reakcijos parametrai.

Tamošiūnas, Julius. Synthesis Of 3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propanehydrazide Derivatives, Technology And Investigation Of Biological Properties: Master's thesis in Chemical and Process Engineering / supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: Chemical and Process Engineering, Technological Sciences.

Key words: synthesis, biology, research, technology, hydrazide.

Kaunas, 2016. 55 p.

SUMMARY

This work involved performing reactions of 3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propane hydrazide with several different organic reagents with the goal of producing its various compounds. To get the hydrazide, 4-methyl-3-nitroaniline was reacted with acrylic acid, the resulting carboxylic acid was esterified, and the ester was treated with hydrazine monohydrate. After obtaining the hydrazide, it was used in reactions with 2,4-pentanedione, 2,5-hexanedione, acetone, carbon disulfide, malonic anhydride and maleic anhydride, resulting in compounds with different moieties. The compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, mass spectrometer and elemental analysis data.

Derivatives of the hydrazide as well as its synthesis intermediates were analyzed for their biological activity. Tests were done to determine the compounds' anti-oxidative, reductive and DPPH, ABTS radical inhibitive properties, hydrogen peroxide scavenging as well as deoxyribose hydroxyl radical protection effectiveness. In addition, antimicrobial and barley seedling growth stimulation properties of select compounds were tested as well.

The three compounds that showed the best antioxidative properties were chosen for *in vitro* barley seed growth regulation testing. 3-[(4-Methyl-3-nitrophenyl)amino]propanehydrazide stimulated barley growth the most, *N*-(2,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propanamide had the biggest effect on barley pigment amount and 5-{2-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]ethyl}-1,3,4-oxadiazole-2(3*H*)-thione showed the greatest effect on the sprouts' antioxidative properties. Methyl-3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propanoate, 3-(2-{3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propanoyl}hidrazinyl)propanoic acid and *N*-(2,5-dioxypyrrolidin-1-yl)-3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propanamide showed antimicrobial activity against *E. coli*. *N*-(2,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-3-[(4-methyl-3-nitrophenyl)amino]propanamide exhibited good results in many of the biological activity tests and was selected for further production. A principal technological production line of the compound was created, and the main reaction properties were calculated.

IŽANGA

Nauji junginiai nuolat sintetinami norint atrasti vis naujesnius ir efektyvesnius būdus žmonių poreikiams tenkinti. Junginiai su azoto turinčiomis grupėmis, ypač junginiai su nitro grupe pasižymi biologiniu ir pigmentiniu veiksmingumu. Tokie junginiai naudojami agrochemijoje, biotechnologijoje, dažų pramonėje, kosmetikoje, medicinoje. Šioms sritims visada ieškoma naujesnių šio tipo junginių su naudingomis savybėmis.

Kauno technologijos universiteto Organinės chemijos katedra ilgą laiką užsiima aminų, pirolų, pirazolų, kitų nitro junginių sinteze bei jų cheminiais ir biologiniais tyrimais. Šiame darbe buvo susintetintas 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas iš 4-metil-3-nitroanilino ir iš gauto hidrazido susintetinti skirtingi nauji junginiai su azoto turinčiomis grupėmis, kurios pasižymi analgetinėmis, priešūždegiminėmis, priešvėžinėmis, antibakterinėmis, antioksidacinėmis savybėmis, stimuliuoja augalų augimą *in vitro*. Pagal biologinių tyrimų rodiklius parinkta didžiausią potencialą rodžiusi medžiaga ir remiantis laboratorinės sintezės rezultatais sukurta teorinė šios medžiagos gamybos linija.

Darbo tikslas: Susintetinti naujus potencialiai biologiškai aktyvius 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazido darinius, nustatyti jų struktūrą, ištirti jų biologines savybes ir, parinkus gamybos technologiją, suprojektuoti atrinkto junginio principinę gamybos liniją.

Uždaviniai:

1. Susintetinti 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidą iš 4-metil-3-nitroanilino ir vykdyti jo reakcijas su įvairiais organiniais reagentais.
2. Ištirti visų sintetintų junginių antioksidacines savybes.
3. Įvertinti visų sintetintų junginių antibakterines savybes bei atrinktų junginių miežių augimą reguliuojančias savybes.
4. Nustatyti atrinktų junginių įtaką miežių antioksidacinėms savybėms.
5. Sudaryti ir nubraižyti atrinkto junginio gamybos schemą.

SANTRUMPOS IR PAAIŠKINIMAI

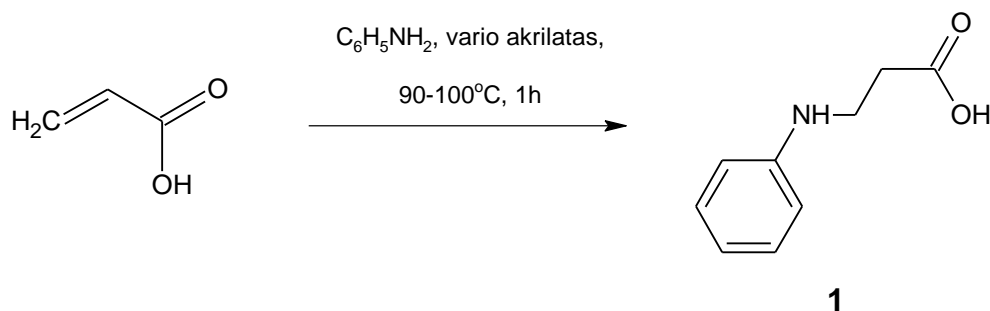
^1H BMR	– protoninis branduolių magnetinis rezonansas
^{13}C BMR	– anglies izotopo ^{13}C branduolių magnetinis rezonansas
δ	– poslinkis milijoninėmis dalimis
DMSO- d_6	– deuteriuotas dimetilsulfoksidas
DPPH	– 2,1-difenil-1-pikrilhidrazilas
ABTS	– 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgštis)
EDTA	– etilendiaminotetracto rūgštis
TPTZ	– 2,4,6-tripiridin-2-il-1,3,5-triazinas

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biologiškai aktyvių junginių sintezė

Yra nustatyta, jog anilinas reaguoja su akrilo rūgštimi. [2-5]. Lengvai vyksta *p*-fenilendiamino nukleofilinio prisijungimo prie akrilo rūgšties α anglies atomo reakcija, susidarant nuo di- iki tetrakarboksietildariniams. 4-Nitroanilinas šildant dalyvavo reakcijoje su akrilo rūgštimi ir gautas *N*-(4-nitrofenil)- β -alaninas [5].

Ši reakcija vyksta pagal Michaelio jungimąsi, kuriame vykdoma nukleofilinė prijungimo reakcija prie α,β -nesotaus karbonilinio junginio. Čia naudotas anilinas kaip nukleofilas. Aniliną prijungti prie akrilatų nėra efektyviausias būdas, tačiau reakcija vyksta nesunkiai [1] (žr. 1.1.1 schema).

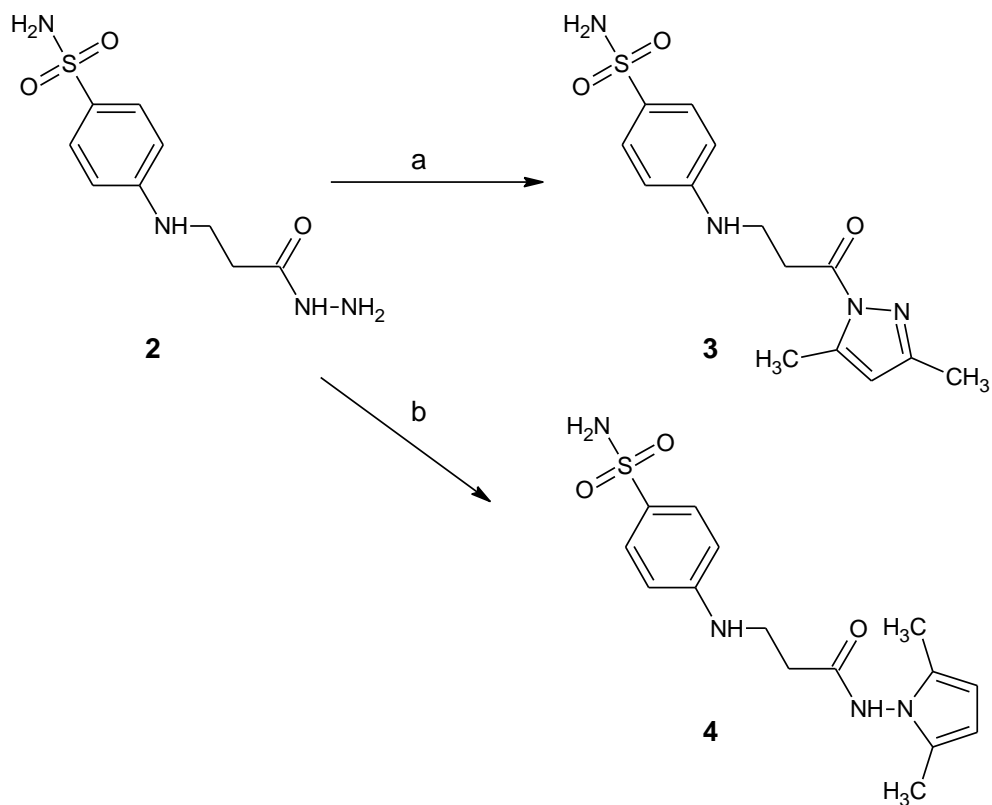


1.1.1 schema.

Naudojant paladžio katalizatorių gaunamos daug geresnės išėigos ir tokiu būdu galima prie anilino jungti didelę įvairovę Michaelio akceptorių.

Hidrazidai reaguoja su daugeliu organinių reagentų. Viena reakcijų kryptis yra gauti azolų darinius veikiant karbohidrazidus su diketonais. Kaip pavyzdį galima paimti hidrazidų reakcijas su 2,4-pentandionu [3],[6,7], 2,5-heksandionu [3,7].

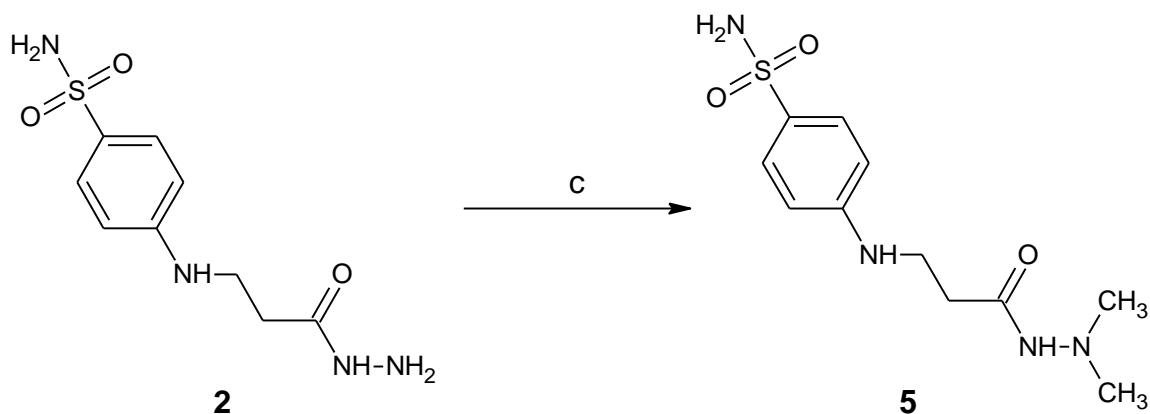
4-{[3-(3,5-Dimetil-1*H*-pirazol-1-il)-3-oksopropil]amino}benzen-1-sulfonamidas **3** buvo gautas veikiant hidrazidą **2** 2,4-pentandionu propan-2-olyje esant koncentruotai druskos rūgščiai. Šildant hidrazidui **2** reaguojant su 2,5-heksandionu, esant acto rūgščiai, gaunamas 4-({2-[*N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(sulfamoilfenil)amino] propanamidas **4** (žr. 1.1.2 schema).



1.1.2 schema

Čia: a – propan-2-ol/HCl, 2,4-pentandionas, 5 h; b – propan-2-olis/AcOH, 2,5-heksandionas, 10 min.

Taip pat galima vykdyti reakcijas su acetonu [3,7,8]. Hidrazidas **2** veiktas acetonu, gaunant junginį **5** (žr. 1.1.3 schema)

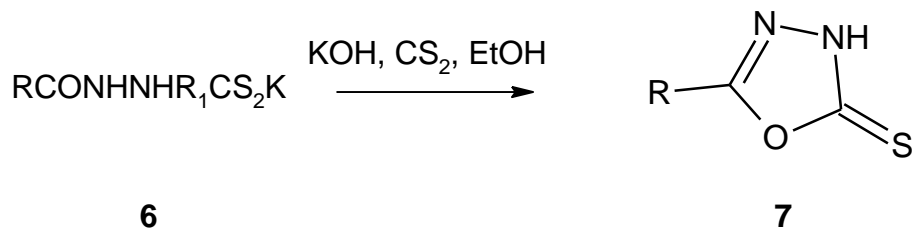


1.1.3 schema

Čia: c – metanolis, acetonas, 4h.

Nustatyta, kad hidrazidai kondensuojasi juos veikiant anglies disulfidu alkoholyje, esant šarminei aplinkai [9,10].

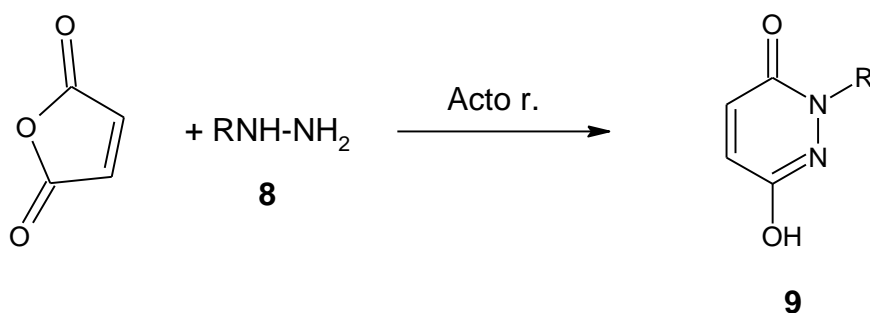
Vykiant žinimo junginio **6** reakciją su atitinkamos karboksirūgšties hidrazidu, anglies disulfidu, alkoholiu ir šarmu buvo gautas naujo tipo junginys **7** (žr. 1.1.4 schema).



1.1.4 schema

Čia: **6**, R – 4-piridil arba CH₃, R₁ – H arba fenil; **7**, R – CH₃.

Jų reakcijos su maleino bei malono rūgštimis jau aprašytos [11]. Atlikta reakcija tarp maleino r. anhidrido ir hidrazido **8**, gaunant maleino hidrazidą **9** (žr. 1.1.5 schema). Ši reakcija buvo vykdoma hidrazidą veikiant maleino r. anhidrido ir ledinės acto rūgšties mišiniu, kambario temperatūroje.



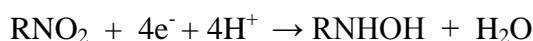
1.1.5 schema

Čia: **8**, R – SO₂C₆H₆ arba COCH₃; **9**, R – SO₂C₆H₆ arba COCH₃

1.2 Biologiškai aktyviųjų junginių savybės

1.2.1 Nitro grupė junginiuose

Junginiai, turintys nitro grupę pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu. Tokį aktyvumą jiems suteikia nitro grupės redukcinės savybės – redukuojant amino grupę susidaro biologiškai aktyvi amino grupė. Redukcijos metu susidaro laisvieji vandenilio ir kiti radikalai bei hidroksilamino dariniai, kurie toliau redukuojasi iki aminių, tačiau šie kitimai gali būti grįžtami. Tai apibrėžia šios reakcijos:

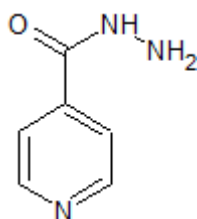


Aprašytos savybės leistų nukreipti vaistus į ląsteles esant mažam deguonies kiekiui. Didžiausią medicininių pritaikymą šiuo požiūriu turi nitro aromatiniai junginiai, kurie buvo panaudoti anaerobinių infekcijų gydyme, taip pat vėžio gydymuose kaip hipoksiniai vėžinių ląstelių citotoksinai bei radiacijos jautrikliai.

Nustatyta, kad tik organizmai, kurie sugeba vykdyti pakankamai stiprias oksidacijos-redukcijos reakcijas gali redukuoti nitro grupes iki biologiškai aktyvių junginių. Tikslus nitro grupių biologinio aktyvumo mechanizmas vis dar nėra galutinai nustatytas, bet medicininis ir priešvėžinis šių junginių panaudojimas priklauso nuo minėtų laisvųjų radikalų mechanizmų. Tiksliau, vieno elektrono poros $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^{\cdot-}$ oksidacijos-redukcijos savybės nusako visas nitro grupės biologines savybes [12,13].

1.2.2 Hidrazidai

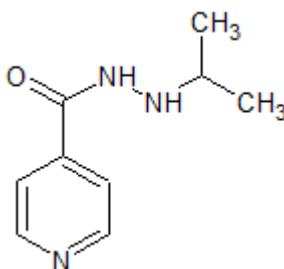
Hidrazidai bei hidrazonai turi daug skirtingų biologinių bei klinikinių pritaikymų. Nustatytos jų antimikrobinės, antimikobakterinės (ypač prieš tuberkuliozę), priešvėžinės, analgetinės, priešuždegimės, antidiabetinės, antimaliarinės savybės. Isoniazidas, arba INH (žr. 1.2.2.1 pav.) rodė aukštą *in vivo* slopinantį aktyvumą prieš *M. tuberculosis* [20].



1.2.2.1 pav. Isonikotinilhidrazidas arba izoniazidas (INH)

1.2.3 Hidrazonai

Hidrazonai ypač tinkami naudoti kaip reagentai daugeliui sudėtingesnių junginių. Vienas iš šių junginių, iproniazidas (žr. 1.2.3.1 pav.), naudojamas tuberkuliozės gydyme. Jis taip pat parodė antidepresantines savybes. Gydant tuberkuliozę hidrazidais, tokiais kaip INH, būtina žinoti, jog jie reaguoja su vitaminu B₆ sudarydami hidrazonus, todėl gali sukelti vitamino B₆ trūkumą. Junginiai, panašūs į iproniazidą *in vitro* antibakteriniuose tyrimuose parodė gerus rezultatus prieš antibiotikams atsparius bakterijų kamienus. [21]

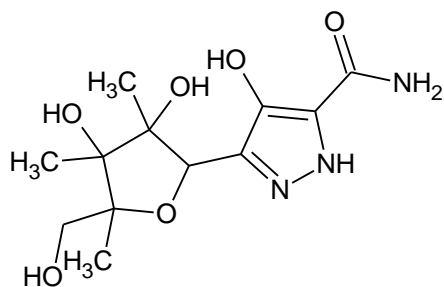


1.2.3.1 Iproniazidas

1.2.4 Pirazolai

Pirazolai žinomi dėl savo įvairiapusio biologiniu aktyvumo, veikia prevenciškai prieš uždegimus, grybelį, traukulius [6]. Rasta daugybė natūralių junginių su šia grupe, kurie turi platų biologinių savybių rinkinį ir pagal kuriuos kuriami įvairūs taikomieji vaistai. Didžioji dalis receptinių vaistų (~70 %) turi heterociklinių žiedų sistemas. Svarbi dalis yra vaistai, turintys pirazolo grupę. Vis daugiau tyrimų atliekama su pirazolais agrokultūrinėms bei medicininėms reikmėms. Taip pat įrodyta, kad įvairūs pakeistieji pirazolai gali būti panaudoti kaip chelatinimo bei gryninimo reagentai daugeliui metalų jonų. Gamtoje pirazolai randami retai. Numanoma, kad gyviems organizmams sunku sudaryti N-N jungtis, tačiau jie dideliais kiekiais sintetinami laboratorijose [14].

Daug dėmesio pirazolų antibakteriniam, antivirusiniam ir priešvėžiniam aktyvumui buvo pradėta skirti po natūralaus pirazolo C-glikozido, pirazofurino (4-hidroksi-3-β-D-ribofuranosil-1H-pirazol-5-karboksiamido) atradimo (žr. 1.2.4.1 pav.). Šis antibiotikas buvo aprašytas kaip turintis daug įvairių antibakterinių ir antivirusinių savybių, taip pat esantis aktyvus prieš keletą vėžinių ląstelių tipų. Šis atradimas paskatino daugelį ieškoti naujų pirazolų darinių su naudingomis biologinėmis savybėmis [15].



1.2.4.1 pav. Pirazofurinas

Priešvėžiniu aktyvumu pirazolai gali pasižymėti kaip platinos ar paladžio ligandai. *Cis*-platinas (*cis*-PtCl₂(NH₃)₂) yra gerai žinomas junginys su stipriomis priešvėžinėmis savybėmis, tačiau jis turi daug nepageidaujamų šalutinių efektų, tokių kaip nefrotoksiškumas, ototoksiškumas bei alergijų sukėlimas. Ieškant saugesnių alternatyvų, buvo atrasta, jog platinos (II) ir paladžio (II) kompleksai su pirazolais pasižymėjo panašiomis auglius šalinančiomis savybėmis [16].

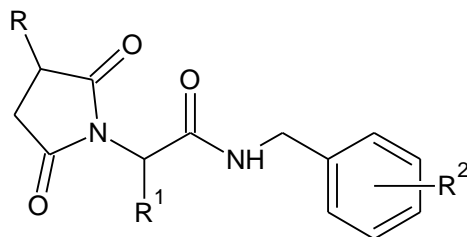
1.2.5 Pirolai

Pirolai randami įvairiuose biologiškai aktyviuose dariniuose kaip kofaktorių ir natūralių junginių sudedamosios dalys. Gamtinių darinių su pirolu pavyzdžiai yra vitaminas B₁₂, tulžies pigmentai, porfirinai, alkaloidai. Jie įeina į vaistų ir elektrai laidžių polimerų sudėtis.

Pirolai ir jų dariniai turi didelę reikšmę naujų vaistų sintezeje ir paieškoje. Žinomos jų priešūždegiminės savybės, *in vitro* citotoksinės savybės prieš auglių modelius, efektyvumas prieš hiperlipidemiją, priešauglinės savybės, taip pat žinomi kaip COX-1/COX-2 inhibitoriai [17-19].

1.2.6 Pirolidin-2,5-dionai ir oksadiazolai

Pirolidin-2,5-dionai (žr. 1.2.6.1 pav.) su skirtingais pakaitais buvo atrasti kaip potencialūs vaistai nuo epilepsijos. Daugumai šių junginių nustatytas efektyvumas elektrošoko (MES) bei poodinio pentilentetrazolo testavimuose. Jų dariniai toliau tirti kaip antikonvulsiniai preparatai, tarp kurių geriausiai pasižymėjo 2-(2,5-dioksirolidin-1-il)acetamidai [22].

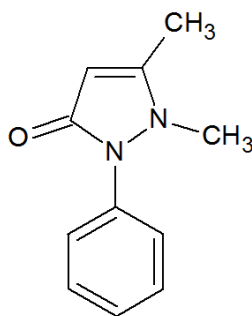


1.2.6.1 pav. Bendroji tirtų pirolidin-2,5-dionų struktūra

Grupė tirtų junginių su oksadiazolo grupe pasižymėjo priešuždegiminėmis, analgetinėmis savybėmis, mažu toksiškumu bei nesukeldavo opų [23].

1.2.7 Antipirinas

Pirazolonų dariniai antipirinas (žr. 1.2.7.1 pav.) ir 4-(*N,N*-dimetil)-aminoantipirinas yra naudojami, kaip analgetikai, antipiretikai ir priešuždegiminiai vaistai. Šių junginių biologinis aktyvumas yra pagrindžiamas jų sugebėjimu suardyti pavojingus radikalus. Nustatyta, kad antipirinas labai veiksmingas prieš ROO[•] (peroksilo-radikalą) [24]. Jo dariniai taip pat pasižymi antimikrobinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis [25].

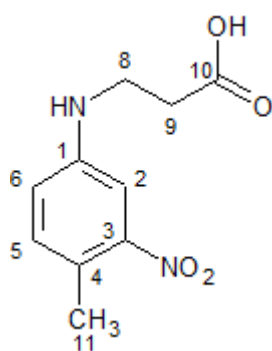


1.2.7.1 pav. Antipirinas

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Biologiškai aktyvių junginių sintezė

3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propano rūgštis (1)



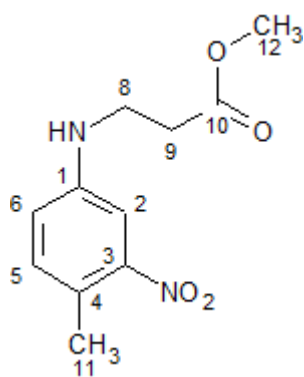
Mišinys 15,2 g (0,1 mol) 4-metil-3-nitroanilino, 9,46 g (0,13 mol) akrilo rūgšties ir 45 ml tolueno kaitinant maišytas 25h. Gautos nuosėdos filtruotos, piltos į 50ml 20% NaOH tirpalą. Mišinys filtruotas, filtratas rūgštintas acto rūgštimi, aušintas, filtruotas.

¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz) : δ =2.18 (s, 3H, CH₃), 2.58 (t, 2H, *J*= 7.0, CH₂CO), 3.39 (t, 2H, *J*= 7.0, CH₂N), 5.42-6.16 (pl.s, 1H, NH), 7.22 (d, 1H, *J*= 8.4, H-5 Ar.), 7.26 (d, 1H, *J*= 2.1, H-2 Ar.), 7.39 (dd, 1H, *J*= 2.1, 8.4, H-6 Ar.).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ= 17.71 (C-11), 33.58 (C-9), 39.08 (C-8), 102.04 (C-6), 110.43 (C-4), 130.08 (C-5), 130.25 (C-2), 147.12 (C-1/3), 173.45 (C-10).

Rasta, % C(54,64); H(5,34); N(12,61). C₁₀H₁₂N₂O₄. (224.213). Paskaičiuota, % C(53.57) H(5.39) N(12.49)

Metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanoatas (2)



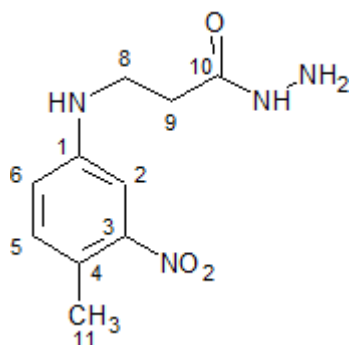
Mišinys 19,2 g (0,086 mol) propano rūgšties **1**, 3 ml koncentruotos sieros rūgšties ir 70 ml metanolio kaitinant maišytas 24h. Mišinys distiliuotas, neutralintas 10% natrio karbonato tirpalu, atšaldytas, filtruotas.

¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz) : δ = 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.69 (t, 2H, *J*= 7.0, CH₂CO), 3.45 (q, 2H, *J*= 7.0, 12.6, CH₂N), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 5.59 (t, 1H, *J*= 5.6, NH), 7.23 (dd, 1H, *J*=0.7, 7.0, H-5Ar), 7.27 (d, 1H, *J*= 2.1, H-2Ar), 7.40 (dd, 1H, *J*= 2.1, 7.0, H-6Ar).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ= 17.73 (C-11), 32.93 (C-9), 38.69 (C-8), 51.30 (C-12), 102.05 (C-6), 110.53 (C-4), 130.12 (C-5), 130.24 (C-2), 146.83 (C-3), 147.80 (C-1)171.87 (C-10).

Rasta, % C(54,90); H(5,86); N(12,21). C₁₁H₁₄N₂O₄. (238.240). Paskaičiuota, % C(55.46)
H(5.92) N(11.76)

3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (3)



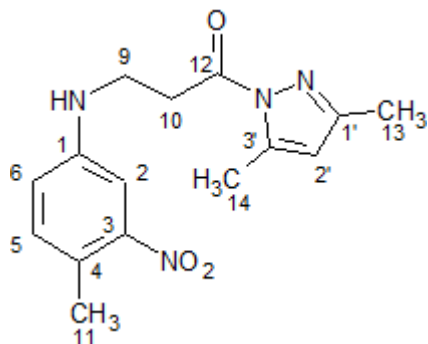
Mišinys 13,73 g (0,058 mol) propanoato **2**, 17,51 g (0,346 mol) hidrazino monohidrato ir 50 ml 2-propanolio kaitinant maišytas 3h. Gautos nuosėdos filtruotos, praplautos 2-propanoliu.

¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz): δ= 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.41 (t, 2H, *J*= 7.0, CH₂CO), 3.40 (q, 2H, *J*= 7.0, 12.6, CH₂N), 4.23 (s, 2H, NH₂), 5.62 (t, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, *J*= 7.7, H-5Ar), 7.28 (d, 1H, *J*= 2.1, H-2Ar), 7.40 (dd, 1H, *J*= 2.1, 7.0, H-6Ar.), 9.11 (s, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ=17.71 (C-11), 32.60 (C-10), 39.43 (C-9), 102.04 (C-6), 110.40 (C-4), 130.07 (C-5), 130.16 (C-2), 146.98 (C-3), 147.13 (C-1), 170.01 (C-10).

Rasta, % C(50,66); H(5,74); N(24,41). C₁₀H₁₄N₄O₃. (238.243). Paskaičiuota, % C(50.41)
H(5.92) N(23.52)

1-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propan-1-onas (4)



Mišinys 0,48 g (0,002 mol) hidrazido **3**, 0,6 g (0,006 mol) 2,4-pentandiono, 1 ml HCl ir 15 ml 2-propanolio kaitinant maišytas 20h. Gautos nuosėdos filtruotos, praplautos 2-propanoliu.

¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz): δ= 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CHCCH₃), 2.49 (d, 3H, *J*= 0.6, HC=CCH₃), 2.63 (t, 0.3H(1H), *J*= 7.2, CH₂CO), 3.39 (t, 1.7H(1H), *J*= 7.2, CH₂CO), 3.24 (q, 0.3H(1H), *J*= 2.1, 12.6, CH₂N), 3.55 (q, 1.7H(1H), *J*= 2.1, 12.6, CH₂N), 5.64 (s, 1H, CH), 5.68-5.70 (m, 1H, NH), 6.21 (s, 1H, HC=CCH₃), 7.26 (d, 1H, *J*= 8.4, H-5Ar), 7.36 (d, 1H, *J*= 2.1, H-2Ar), 7.40 (dd, 1H, *J*= 2.1, 8.4, H-6Ar).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ=13.32 (C-13), 13.97 (C-14), 17.79 (C-11), 34.57 (C-10), 38.60 (C-9), 101.98 (C-6), 110.44 (C-4), 111.12 (C-3'), 130.10 (C-5), 130.23 (C-2), 143.17 (C-2'), 146.90 (C-3), 147.12 (C-1), 151.44 (C-1'), 171.31, 171.72 (C-12).

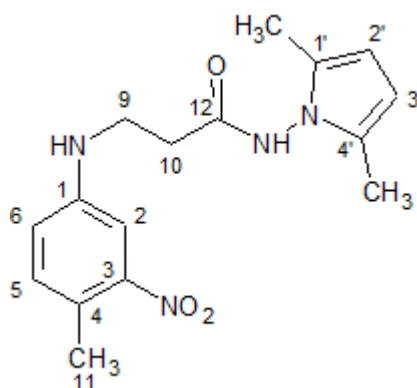
Rasta, % C(61,26); H(5,84); N(18,33). C₁₅H₁₈N₄O₃. (302.328). Paskaičiuota, % C(59.59) H(6.00) N(18.53)

N-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (5)

Mišinys 0,714 g (0,003 mol) hidrazido **3**, 0,684 g (0,006 mol)

2,5-heksandiono, 0,5 ml acto rūgšties ir 15 ml 2-propanolio

kaitinant maišytas 20h. Gautos nuosėdos kristalintos iš eterio.



¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz): δ =1.97 (s, 6H, 2CH₃), 2.20 (s, CH₃), 2.68 (t, 2H, *J*= 7.0, CH₂CO), 3.55 (q, 2H, *J*= 7.0, 12.6, CH₂N), 5.64 (s, 2H, 2 CH), 5.69 (t, 1H, *J*=5.6, NH), 7.24 (d, *J*=8.8, H-5Ar), 7.35 (d, 1H, *J*=2.1, H-2Ar), 7.42 (dd, 1H, *J*=2.1, 12.6, H-6), 10.66 (s, 1H, NH).

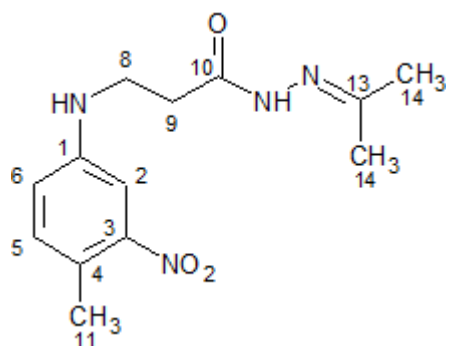
¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ=10.77 (2CH₃), 17.67 (C-11), 32.59 (C-10), 39.02 (C-9), 102.16 (C-2'/3'), 102.82 (C-6), 110.50 (C-4), 126.58 (C-1'/4'), 130.14 (C-5), 130.24 (C-2), 146.85 (C-3), 147.15 (C-1), 170.18 (C-12).

Rasta, % C(59,53); H(6,43); N(18,19). C₁₆H₂₀N₄O₃. (316.355). Paskaičiuota, % C(60.75) H(6.37) N(17.71)

N,N'-dimetil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (6)

Mišinys 0,714 g (0,003 mol) hidrazido **3** ir 27,7 g (0,55 mol)

acetono kaitinant maišytas 5h. Gautos nuosėdos filtruotos, praplautos 2-propanoliu.

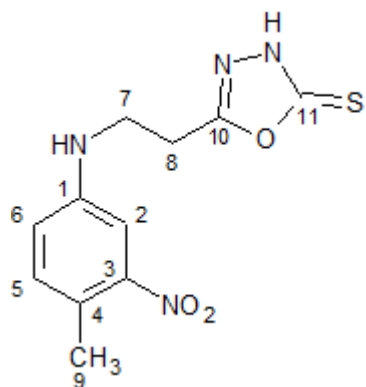


¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz): δ = 1.85, 1.86 (2s,(0.5/0.5)3H(Z),s-z/s-e), 1.92,1.93 (2s,(0.5/0.5)3H, (E), s-z/s-e), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.59 (1H(2H), J=7.0, (Z), s-z/s-e, CH₂CO), 2.88 (1H(2H), J=7.0, (E), s-z/s-e, CH₂CO), 3.46 (q, 2H, J=5.6, 7.2, 12.6, CH₂N), 5.61 (t, 0.5H(1H), J=5.6, NH), 5.63 (t, 0.5H(1H), J=5.6, NH), 7.19-7.42 (m, 3H, H-2,5,6 Ar), 10.02, 10.12 (2s, (0.5/0.5)1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ = 16.96, 17.70 (C-14, (Z)), 17.39 (C-11), 24.83, 25.00 (C-14 (E)), 31.98, 33.10 (C-10), 38.79, 39.36 (C-9), 101.89, 102.36 (C-6)110.30, 110.49 (C-4), 130.07, 130.12 (C-5), 130.16 (C-2), 150.43, 155.04 (C-13), 167.04, 172.83 (C-10, (Z/E)).

Rasta, % C(56,34); H(6,98); N(20,28). C₁₂H₁₈N₄O₃. (266.296). Paskaičiuota, % C(54.12) H(6.81) N(21.04)

5-{2-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3H)-tionas (7)



Mišinys 0,25 g (0,004 mol) KOH, 1,5 ml vandens, 7 ml etanolio ir 0,456 g (0,006 mol) CS₂ maišytas 15 min kambario temperatūroje.

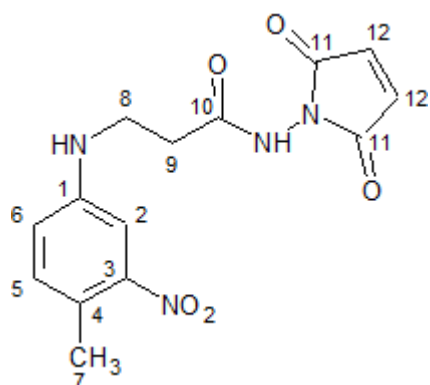
Gautas mišinys supiltas į karštą 0,952 g (0,004 mol) hidrazido **3**, 30 ml etanolio ir vandens mišinį ir maišytas 20 h. Gautas mišinys neutralintas koncentruota acto r., filtruotas, praplautas vandeniu.

¹H BMR (DMSO-d₆, 700 MHz): δ = 2,17 (s, 3H, CH₃), 3,03(t, 2H, J= 6.8, CH₂CO), 3.58 (q, 2H, J= 6.8, 12.8, CH₂N), 5.79 (t, 1H, J=5.6, NH), 7.25(d, 1H, J=8.4, H-5Ar), 7.31 (d, 1H, J=2.4, H-2Ar), 7.42 (dd, 1H, J=2.4, 8.4, H-6Ar), 13.66-14.8 (m,s, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ=17.88 (C-9), 24.61 (C-7), 39.4 (C-8), 102.18 (C-6), 110.74 (C-4), 130.3 (C-2/5), 146.48 (C-1/3), 162.43 (C-10), 177.72 (C-11).

Rasta, % C(46.58); H(4.54); N(19.02) S(12.41). C₁₁H₁₂N₄O₃S. (280.303). Paskaičiuota, % C(47.13) H(4.32) N(19.99) S(11.44)

N-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (8)

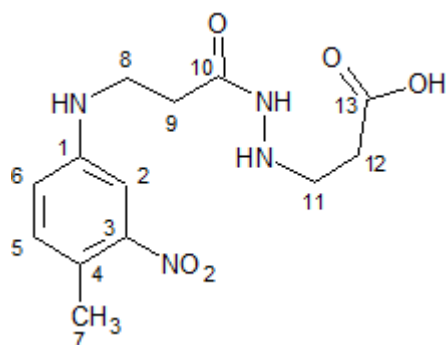


0,24 g (0,001 mol) hidrazido **3** tirpinta 20 ml etilacetato.
0,1 g (0,001 mol) maleino r. anhidrido tirpinta 10 ml etilacetato. Mišiniai sujungti ir maišyti 20°C 1,5 h. Etilacetatas nudistiliuotas, kristalinta iš vandens ir perkristalinta iš 2-propanolio, filtruota.

¹H BMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ=2.199 (s, 3H, CH₃), 2.58 (t, *J*=6.8, 2H, CH₂CO), 3.35-3.52 (m, 2H, CH₂N), 5.58 (t, *J*=5.2, 0.5(1H), NH), 5.65 (t, *J*=5.2, 0.5(1H), NH), 6.39 (q, *J*=12, 23.6, 4H, 2CH₂), 7.23-7.31 (m, H₅-Ar, H₂-Ar, 7.39-7.43 (m, H₆-Ar), 10.32 (s, 1H, NH)

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ=17.76 (C-7), 32.48, 32.60 (C-9), 39.49 (C-8), 102.06 (C-12), 102.12 (C-6), 127.46, 132.53 (C-11), 147.01 (C-1/3), 130.40, 130.19 (C-2/5), 169.1, 166.22(C-10)

3-(2-{3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanoil}hidrazinil)propano rūgštis (9)



0,24 g (0,001 mol) hidrazido **3** tirpinta 20 ml etilacetato.
0,12 g (0,001 mol) malono r. anhidrido tirpinta 10 ml etilacetato. Mišiniai sujungti ir maišyti 20°C 8 h. Kristalinta iš 2-propanolio, filtruota.

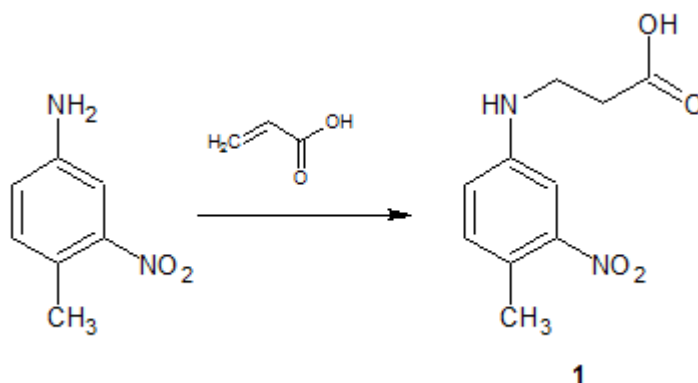
¹H BMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ=2.17(s, 3H, CH₃), 2.48-2.55 (m, CH₂CO), 3.38 (s, 2H, CH₂N), 3.45 (q, *J*=12.8, 6.8, CH₂N), 5.56 (t, *J*=5.2, 1H, NH), 7.20-7.30 (m, H₂-Ar, H₅-Ar), 7.43 (dd, *J*=2,2, H₆-Ar), 9.07 (s, 0,5(1H), NH), 9.15 (s, 0,5H(1H), NH), 9.88 (s, 1H(2H), CH₂CO), 9.93 (s, 1H(2H), CH₂CO), 10,06(d, *J*=4, 1H, NH).

¹³C BMR (DMSO-d₆, 175 MHz): δ=17.73 (C-7), 27.709 (C-11), 32.45 (C-12), 39.43(C-8), 102.08 (C-6), 110.58 (C-4), 130.15, 130.41 (C-2/5), 146.94, 147.15 (C-1/3), 169.96, 169.50 (C-10, 173.55 (C-13).

2.2 Biologiškai aktyvių junginių sintezės aptarimas

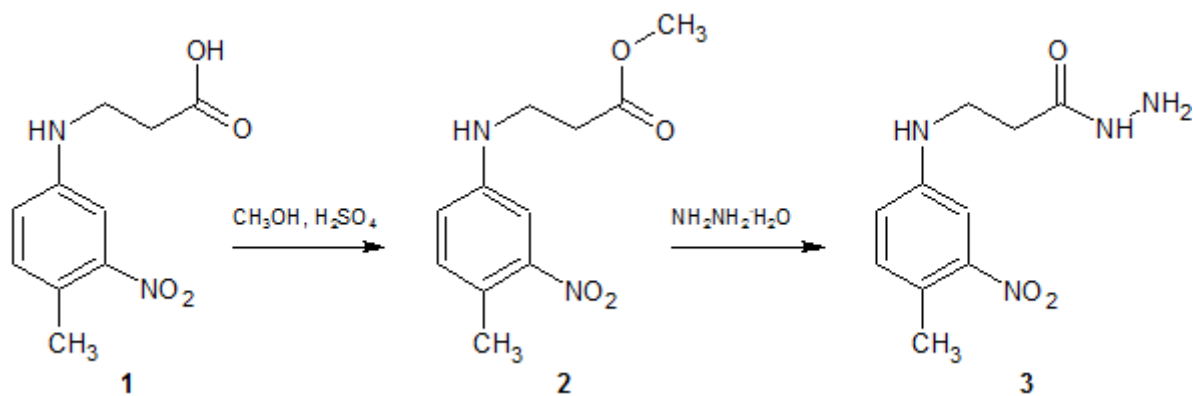
Susintetintų junginių ^1H BMR ir ^{13}C BMR spektrai užrašyti *Varian Unity Inova* spektrometru kambario temperatūroje 700, 400 MHz ^1H bei 175 MHz ^{13}C dažniuose, tirpikliais naudojant DMSO-d_6 , vidiniu standartu – TMS. Cheminiai poslinkiai matuoti δ skalėje milijoninėmis dalimis (m. d.). Elementinė analizė atlikta *Exeter Analytical CE-440 Elemental* aparatu. Medžiagų lydymosi temperatūra nustatyta aparatu *TS 25-11-1144-76*. Reakcijos eiga sekta ir gautų junginių grynumas nustatytas plonasluoksnės chromatografijos būdu, naudojant *Silufoil UV-254* plokšteles. Plokštelės ryškintos ultravioletinėje šviesoje, naudojant UV filtrą ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Aminai lengvai reaguoja su daugeliu rūgščių. 4-Metil-3-nitroanilinas dalyvavo reakcijoje su akrilo rūgštimi [2-3] ir prisijungė prie rūgšties α anglies atomo (žr 2.2.1 schema). Po kaitinimo gautas produktas grynintas jį ištirpinant natrio šarme ir, nufiltravus, silpnai rūgštinant acto rūgštimi.

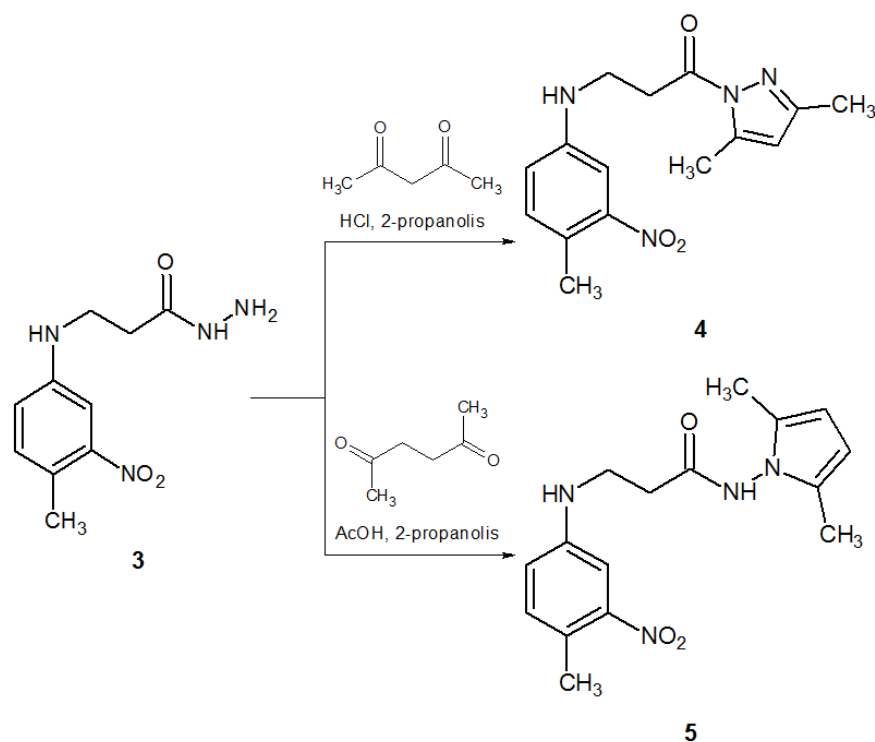


2.2.1 schema

3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propano rūgšties (**1**) susidarymą patvirtina ^{13}C BMR spektre matomi rūgšties grandies anglies atomai ties 33.58 bei 173.45 m. d. ir karboksigrupės anglies tripletas ties ^1H BMR spektro 2.58 m. d. Toliau gauta karboksirūgštis **1** esterifikuota metanolio katalizuojant sieros rūgštimi [1-2] ir mišinys po distiliacijos neutralintas ir šaldytas. Metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanoato (**2**) gavimas matomas iš naujai prisijungusio metilo esterio anglies atomo matomo ^1H BMR spektro 3.64 m. d. ir ^{13}C BMR spektro 51.30 m. d. poslinkiuose. Toliau esteris **2** veiktas šešiakartiniu hidrazino monohidrato pertekliumi siekiant gauti 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidą (**3**) (žr 2.2.2 schema), kuris susidaro greitai ir lengvai mišinį kelias valandas pakaitinus 2-propanolio terpėje. Kad susidarę hidrazidas **3**, matoma pagal ^1H BMR spektre ties 4.23 ir 9.11 m. d. stebimus naujus amino grupių singletus, pakeitusius metilo esterio grupę.

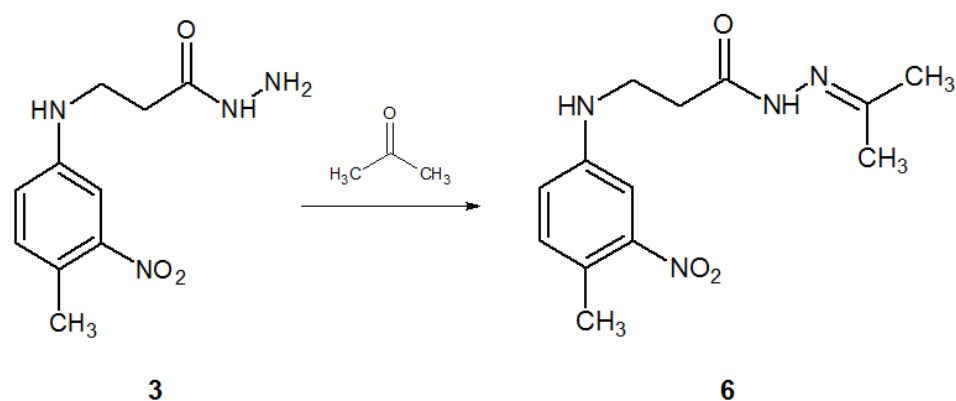


Gautas hidrazidas **3** veiktas skirtingais organiniais reagentais – 2,4-pentandionu, 2,5-heksandionu, acetonu, anglies disulfidu, maleino bei malono rūgščių anhidridais. 1-(3,5-Dimetil-1*H*-pirazol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propan-1-onas (**4**), *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**) bei *N,N'*-dimetil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**6**) gauti pagal metodiką [3].



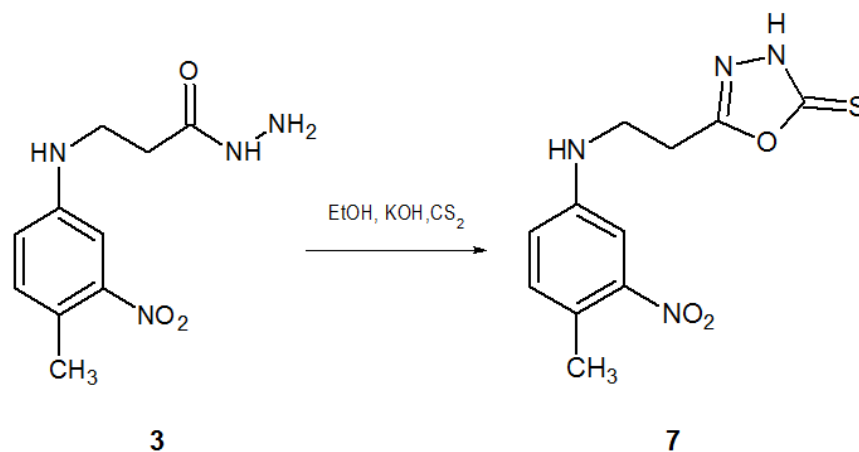
Junginys **4** gautas tirpiklyje 2-propanolyje reaguojant 2,4-pentandionui su hidrazidu **3** esant stipriai rūgštinei terpei, kuriai sudaryti panaudotas mažas kiekis koncentruotos druskos rūgšties (žr. 2.2.3 schema). Junginio gavimą užtikrina naujai stebimi penkianario žiedo anglies atomai ties ^{13}C BMR spektro 111.12 (C-3'), 143.17 (C-2'), 151.44 (C-1') m. d. ir dvi metilo grupės ties ^1H BMR spektro 2.21 ir 2.49 m. d.

Junginys **5** gautas vykstant reakcijai tarp hidrazido **3** ir 2,5-heksandiono tirpiklyje 2-propanolyje (žr 2.2.3 schema). Reakcijai reikalinga nestipri rūgštinė terpė gauta naudojant ledinę acto rūgštį. Susidarusios nuosėdos kristalintos iš dietilo eterio. Susidarymą įrodo naujai laisva NH grupė, stebima ties ^1H BMR spektro 10.66 m. d. ir toliau matomi penkianario žiedo anglieatomai ^{13}C BMR spektro 102.16 (C-2'/3'), 126.58 (C-1'/4') m. d. poslinkiuose.



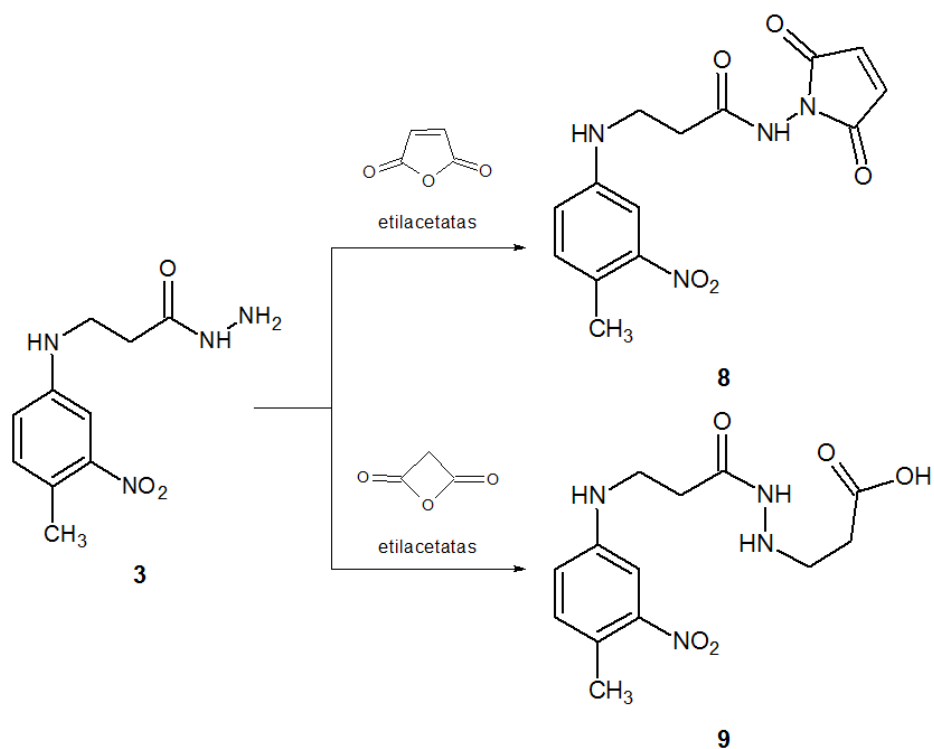
2.2.4 schema

Junginys **6** gautas hidrazidui **3** lengvai reaguojant su acetono pertekliumi (žr 2.2.4 schema) ir patvirtinimas dviem naujomis metilo grupėmis, stebimomis prie ^{13}C BMR spektro 16.96, 17.70 m. d. bei azoto atomu, prie kurio jos prisijungę, matomo ties ^1H BMR spektro 5.61 ir 5.62 m. d. poslinkių.



2.2.5 schema

Junginys **7** gautas paruošus anglies disulfido mišinį su kalio šarmu bei etanoliumi ir šį mišinį sumaišius su karštu etanolyje ištirpintu hidrazidu **3** (žr.2.2.5 schema) [10]. Junginį patvirtina naujai atsiradusi NH grupė matoma ^1H BMR spektro 13.66-14.8 poslinkiuose bei stebint naujo penkianario žiedo anglies atomus ties ^{13}C BMR spektro 162.43 ir 177.72 m. d.



2.2.6 schema

Junginys **8** gautas atskirai ištirpinus hidrazidą **3** ir maleino r. anhidridą etilacetate ir abu tirpalus sumaišius kambario temperatūroje (žr. 2.2.6 schema). Susidarymą parodo naujai atsiradę penkianario žiedo anglies atomai, matomi ^{13}C BMR spektro 102.06 (C-12) m. d. ir 127.46, 132.53 (C-11) m. d. Taip pat ^1H BMR spektre ties 6.39 m. d. matomi žiedo protonai.

Junginys **9** gautas neužsiklinus norimam junginiui, vykdžius analogišką junginiui **8** reakciją, bet su malono r. anhidridu (žr. 2.2.6 schema). Gautas neužciklintas junginys patvirtinamas matant ^1H BMR spektre 9.07, 9.15 m. d. srityje protoną ties trečio NH bei karboksigrupės anglies atomą ^{13}C BMR spektro 173,56 m. d. poslinkyje.

2.3 DPPH radikalo slopinimas

Paruošti reagentai:

1 mmol DPPH tirpalas su etanoliu;

1 mg/ml DMSO ištirpinti bandomieji junginiai;

Palyginamasis tirpalas iš 3 ml DPPH tirpalo ir 3 ml DMSO.

Darbo eiga

3 ml DPPH tirpalo įpilta į 3 ml bandomųjų junginių tirpalus. Mišiniai sumaišyti ir palikti stovėti 20 min. Po 20 min tirpalai skiesti santykiu 1:15, palyginamasis su etanoliu ir bandomieji su DMSO. [26] Absorbicija matuota prie 517 nm bangos ilgio ir radikalo slopinimas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$Slopinimas_{\%} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \cdot 100\%$$

čia: A_A – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis; A_B – tiriamojo tirpalo šviesos sugertiems dydis.

2.4 Antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

Paruošti reagentai:

1 mg/ml DMSO ištirpinti bandomieji junginiai;

300 mmol, pH=3,6 acetatinis buferis;

10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l druskos rūgštyje;

20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tirpalas;

FRAP reagentas ruoštas sumaišant paruoštus 25 ml acetatinio buferį, 2,5 ml TPTZ ir 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tirpalus;

Kalibravimo kreivei sudaryti paruošti 5, 10, 15, 20 ir 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentracijos $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tirpalai, turintys 3 ml FRAP reagento.

Darbo eiga

100 μl tiriamųjų tirpalų sumaišyta su 3 ml FRAP reagentu. Mišiniai matuoti spektrofotometru esant 593 nm bangos ilgiui, tuoj pat sumaišius ir 6 min po sumaišymo. Aktyvumo reikšmės apskaičiuotos pagal kalibravimo kreivę [27].

2.5 Redukcinės savybės

Paruošti reagentai:

1 mg/ml DMSO ištirpinti bandomieji junginiai

0,2 M, pH=6,6 natrio fosfatinis buferis

1% $K_3[Fe(CN)_6]$ tirpalas

10% trichloracto rūgštis

0,1% $FeCl_3$ tirpalas

Darbo eiga

Į 1 ml tiriamųjų tirpalų mėginius supilta paruoštų 2,5 ml fosfatinio buferio ir 2,5 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ tirpalai. Sumaišius mišiniai inkubuoti 50°C temperatūroje 20 min. Po 20 min pridėta 2,5 ml paruošto trichloracto rūgšties tirpalo ir mišiniai centrifuguoti 10 min. Po centrifugavimo viršutiniai tirpalų 2,5 ml sumaišyti su 2,5 ml distiliuotu vandeniu bei 0,5 ml paruošto $FeCl_3$ tirpalu. Mišiniai matuoti prie 700 nm bangos ilgio, kur didesnė šviesos sugertiems reikšmė parodo didesnes redukcines savybes [29].

2.6 Vandenilio peroksido suardymas

Paruošti reagentai:

5 µg/ml 1-butanolyje ištirpinti bandomieji junginiai

pH=7,4 fosfatinis buferis

40 mmol vandenilio peroksido tirpalas, ruoštas pagamintame fosfatiname buferyje

Darbo eiga

1 ml tiriamųjų tirpalų sumaišyta su 0,6 ml paruošto vandenilio peroksido tirpalu. Mišinys palaikytas 30 min. Suardymas nustatytas naudojant 230 nm bangos ilgį, palyginimui naudojant vandenilio peroksido buferyje tirpalą, kaip nulį – fosfato buferį [29].

Vandenilio peroksido suardymas apskaičiuotas pagal formulę:

$$Suardymas_{\%} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \cdot 100\%$$

čia: A_0 – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis; A_1 – tiriamojo tirpalo šviesos sugertiems dydis.

2.7 Deoksiribozės apsauga nuo hidroksi-radikalų

Paruošti reagentai:

5 µg/ml DMSO ištirpinti bandomieji junginiai

24 mmol/l pH=7,4 natrio fosfato buferis

10 mmol/l FeCl₃

1 mmol/l H₂O₂

10 mmol/l EDTA

15 mmol/l NaCl

1% tiobarbitūrinė rūgštis (tirpinama 0,05 mol/l NaOH)

28% trichloracto rūgštis

Darbo eiga

Ruoštas 100 mmol/l deoksiribozės tirpalas: deoksiribozė ištirpinta mišinyje iš paruoštų natrio fosfato buferio, 10 µl FeCl₃, 10µl H₂O₂, 10 µl EDTA (ištirpinta paruoštame natrio fosfato buferyje, turinčiame 15 mmol/l NaCl).

200 µl tiriamųjų 5 µg/ml tirpalų įpalta į 10 µl paruoštus 100 mmol/l deoksiribozės tirpalus ir inkubuota 37°C temperatūroje 60 min. Po 60 min į mišinius atitinkamai įpilta 1 ml ir 1,5 ml paruoštų tiobarbitūrinės ir trichloracto rūgščių. Šie mišiniai laikyti 100°C 15 min. Po 15 min mišiniai matuoti prie 532 nm bangos ilgio. Kaip kontrolė buvo naudotas deoksiribozės ir DMSO mišinys, vienodai reaguotas kaip ir tiriamieji tirpalai, kaip nulis – fosfato buferis [29].

Hidroksi radikalų slopinimas apskaičiuotas pagal formulę:

$$Slopinimas_{\%} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \cdot 100\%$$

čia: A_0 – kontrolinio tirpalo šviesos sugerties dydis; A_1 – tiriamojo tirpalo šviesos sugertiems dydis.

2.8 ABTS radikalo slopinimas

Paruošti reagentai:

1 mg/ml DMSO ištirpinti bandomieji junginiai

20 mmol, pH=7,4 fosfatinis buferis

0,17 mmol/ kalio persulfato tirpalas

0,1 mmol ABTS tirpalas: sumaišyta 2 mmol ABTS su paruoštu kalio persulfato tirpalu, ištirpinta paruoštame fosfato buferyje ir laikyta per naktį

Darbo eiga

0,5 ml tiriamųjų tirpalų sumaišyta su paruoštais 1,7 ml fosfatinio buferiu bei 0,3 ml ABTS tirpalu. Spektrofotometru matuoti šviesos sugerties dydžiai. [28]

2.9 Susintetintų junginių poveikis miežių augimui

Paruošti reagentai:

Atrinktų trijų junginių 0,5 mg/L, 2 mg/L ir 5 mg/L tirpalai distiliuotame vandenyje

0,1% HgCl₂

6% H₂O₂

Darbo eiga

Miežių sėklos brinkintos 24 valandas steriliame distiliuotame vandenyje. Po 24 valandų atliktas sėklų sterilinimas – miežių sėklos palaikytos 10 min 0,1% HgCl₂ tirpale ir 5 minutes 6% H₂O₂ tirpale. Po to sėklos perplautos steriliu vandeniu 3 kartus.

Baigus sterilinti sėklas, sėklos perneštos į lėkštutes, kuriose įdėta filtrinis popierius, suvilgytas 200 µl tiriamojo bandinio. Kiekvienam bandiniui paruošiama po 2 lėkštutes. Kaip kontrolė naudotas distiliuotas vanduo.

Po 8 dienų daigai išimti ir matuota kiekvienos lėkštutės ilgiausias daigas ir ilgiausia šaknis, bei suskaičiuotas sėklų daigumas.

2.10 Pigmentų kiekio augaluose nustatymas

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru esant bangos ilgiams:

- Chlorofilui *a* (662 nm);
- Chlorofilui *b* (644 nm);
- Karotinoidams (441 nm).

Pigmentų kiekio nustatymui 0,1 g augalų daigų susmulkinta grūstuvėlyje. Įpilta 10 ml 96% etanolio, sumaišyta iki vientisos masės ir filtruotas. Nufiltruoto ekstrakto tūris išmatuotas cilindru. Vėliau ekstraktai praskiesti, jei reikėjo, tol, kol šviesos sugertiems parodymai buvo nuo 0,1 iki 0,8. Filtratas supiltas į matavimo kiuvetę ir matavimai atlikti spektrofotometru esant 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidams) bangų ilgiams [30].

Pigmentų koncentracija (mg/l) apskaičiuojama pagal formules:

Chlorofilo *a* koncentracija (mg/l): $C_a = 9,784D_{662} - 0,99D_{644}$;

Chlorofilo *b* koncentracija (mg/l): $C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662}$;

Karotinoidų koncentracija (mg/l): $C_{\text{karotinoidai}} = 4,695D_{441} - 0,268(C_a + C_b)$

$C_a + C_b = 5,134D_{662} + 20,436D_{644}$

Pigmentų kiekis mg/100mg apskaičiuojamas:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000}$$

čia: *C* – pigmentų koncentracija mg/l; *V* – pradinis ekstrakto tūris, ml; *V*₁ – pradinis ekstrakto tūris, paimtas praskiedimui, ml; *V*₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml; *n* – augalinė masė, g.

2.11 Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH

Paruošti reagentai:

Miežių ekstraktai: 0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 1 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Homogenatas centrifuguotas 9000 aps./min 10 min. ir supernatantas surinktas;

Etaloninis DPPH tirpalas: 0,0012 g DPPH tirpinta 50 ml metanolio.

Darbo eiga

Į mėgintuvėlį įpilta 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml etaloninio DPPH tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišytas ir po 15 minučių laikymo tamsoje pamatuotas tirpalo optinis tankis prie 515 nm bangos ilgio [26].

$$Slopinimas_{\%} = \left(\frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \cdot 100\%$$

čia: A_A – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis; A_B – tiriamojo tirpalo šviesos sugertiems dydis.

2.12 Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą

Paruošti reagentai:

Miežių ekstraktai: 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos 30 min. ekstrahuota 5 ml metanolio 45 °C temperatūroje. Ekstraktas centrifuguotas 9000 aps./min 10 min.;

300 mmol, pH=3,6 acetatinis buferis;

10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l druskos rūgštyje;

20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tirpalas;

FRAP reagentas ruoštas sumaišant paruoštus 25 ml acetatinio buferį, 2,5 ml TPTZ ir 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tirpalus;

Darbo eiga

100 μl paruoštų ekstraktų sumaišyta su 3 ml FRAP reagentu. Mišiniai matuoti spektrofotometru esant 593 nm bangos ilgiui, tuoj pat sumaišius ir 6 min po sumaišymo [27].

2.13 Redukcinių savybių nustatymas augaluose

Paruošti reagentai:

Miežių ekstraktai: 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos 30 min. ekstrahuota 5 ml metanolio 45 °C temperatūroje. Ekstraktas centrifuguotas 9000 aps./min 10 min.;

0,2 M, pH=6,6 natrio fosfatinis buferis

1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tirpalas

10% trichloracto rūgštis

0,1% FeCl_3 tirpalas

Darbo eiga

Į 1 ml miežių ekstraktų mėginius supilta paruoštų 2,5 ml fosfatinio buferio ir 2,5 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ tirpalai. Sumaišius mišiniai inkubuoti 50°C temperatūroje 20 min. Po 20 min pridėta 2,5 ml paruošto trichloracto rūgšties tirpalo ir mišiniai centrifuguoti 10 min. Po centrifugavimo viršutiniai tirpalų 2,5 ml sumaišyti su 2,5 ml distiliuotu vandeniu bei 0,5 ml paruošto $FeCl_3$ tirpalu. Mišiniai matuoti prie 700 nm bangos ilgio, kur didesnė šviesos sugertiems reikšmė parodo didesnes redukcines savybes [29].

2.14 Antibakterinio aktyvumo nustatymas agaru difuziniu metodu

Luria-Bertani (LB) terpės paruošimui naudoti reagentai:

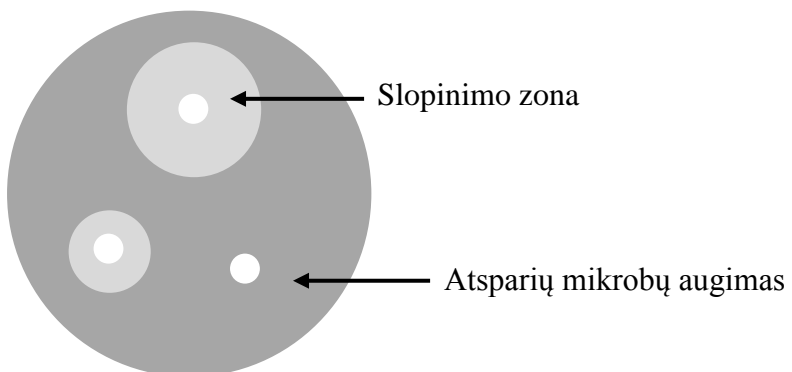
- 10 g/L natrio chloridas;
- 10 g/L triptonas;
- 5 g/L mielių ekstraktas;
- 10 g/L mikro agaras;

PM terpės paruošimui naudoti reagentai:

- 5 g/L peptonas;
- 3 g/L mėsos ekstraktas;
- 15 g/L mikro agaras;

Darbo eiga

LB terpėje *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris* bakterijos, o ant PM terpės auginta *E. coli*. Ant atitinkamos terpės Petri lėkštelėse užpilta 50 μ l *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ir *E.coli* bakterijų suspensijos, jos paskleistos po paviršių, po to ant paviršiaus uždėta šeši popieriniai diskai ir ant kiekvieno jų užpilta 25 μ l 1 mg/ml sintetinto

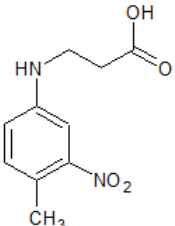
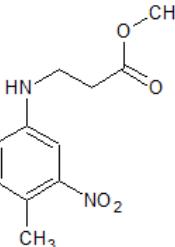
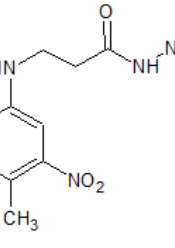
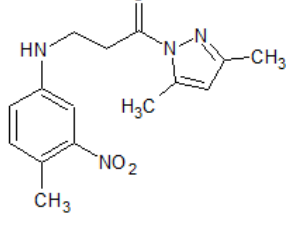
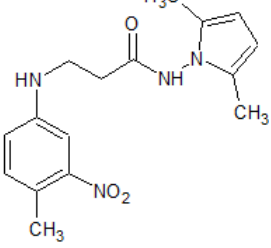
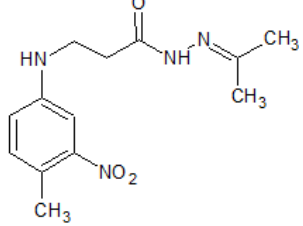


junginio tirpalo. Petri lėkštelės sudėtos į 37°C termostatą ir inkubuotos 24 h. Po 24 h stebėtas bakterijų augimas ir sintetinių junginių antibakterinis aktyvumas [31].

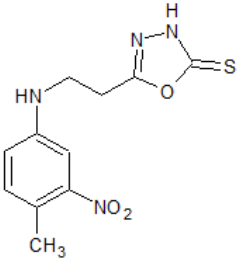
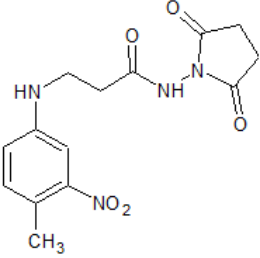
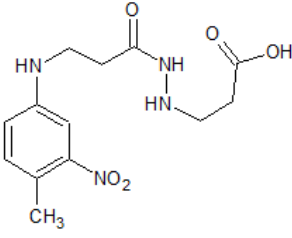
2.14.1 pav. Antibakterinis aktyvumas agaru difuziniu metodu Petri lėkštelėje

3. REZULTATAI

3.1 Biologiškai aktyvių junginių sintezės rezultatai

Junginys	Struktūra	Gauta masė, g	Išeiğa	Lydimosi temperatūra, °C
3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propano rūgštis 1		19,2	86%	173-174
Metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanoatas 2		16,03	79%	75-76
3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas 3		12,48	91%	176-177
1-(3,5-Dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propan-1-onas 4		0,12	13%	91-92
<i>N</i> -(2,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas 5		0,16	18%	133-134
<i>N,N'</i> -dimetil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas 6		0,68	85%	183-184

3.1.1 lent. Susintetintų junginių išeięos ir lydymosi temperatūros

5-{2-[(4-Metil-3-nitrofenil) amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3 <i>H</i>)-tionas		0,5	45%	241-242
7				
<i>N</i> -(2,5-diokso-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil) amino]propanamidas		0,21	66%	135-136
8				
3-(2-{3-[(4-Metil-3-nitrofenil) amino]propanoil} hidrazinil) propano rūgštis		0,2	65%	167-168
9				

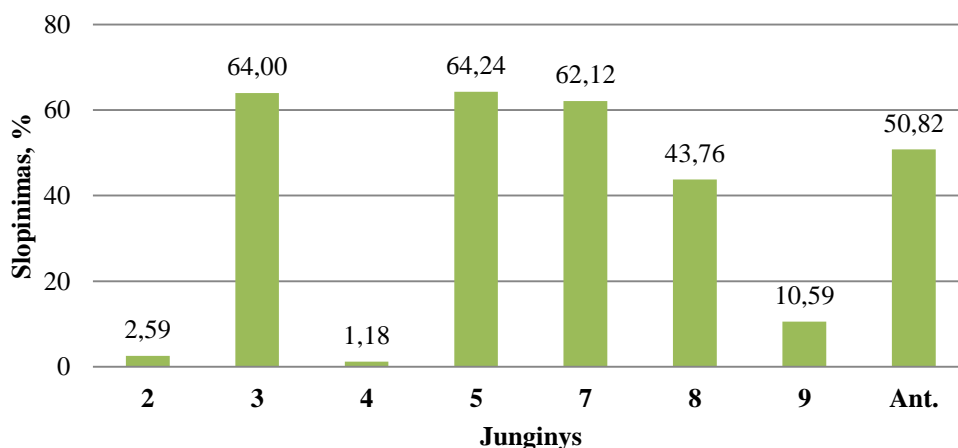
3.1.1 lent. Tęsinys

Dauguma reakcijų įvykdytos gaunant geras išeigas. Tačiau 3-[(4-metil-3-nitrofenil) amino]propanhidrazido kondensacijos su ketonais pasižymėjo nedidelėmis išeigomis. Tai parodo arba metodikos neefektyvumą arba didelį reakcijų jautrumą aplinkos sąlygoms.

5-{2-[(4-Metil-3-nitrofenil) amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tionas pasižymėjo aukštu terminiu atsparumu, tikėtina dėl junginyje esančios sieros.

3.2 Sintetintų junginių DPPH radikalo slopinimo įvertinimas

Stipriomis slopinančiomis savybėmis pasižymintys junginiai keitė įprastai tamsiai violetinę DPPH tirpalo spalvą. Junginiai buvo lyginti su antipirinu, žymėtu Ant. Tai į susintetintus biologiškai aktyvius junginius panašią struktūrą bei panašias savybes turintis komerciškai gaminamas junginys.



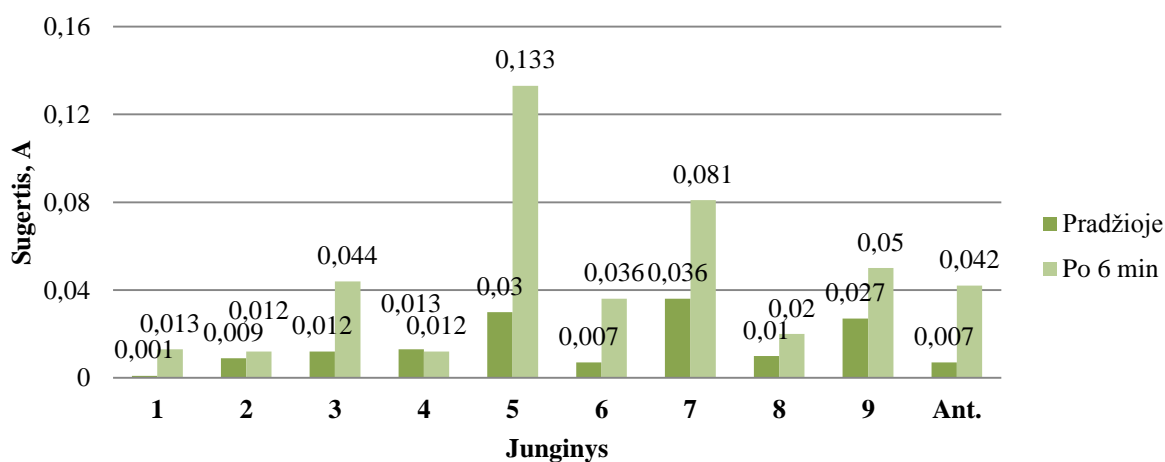
3.2.1 pav. Tirtų junginių DPPH radikalo slopinimo efektyvumas.

Iš grafike atvaizduotų tyrimo rezultatų (žr 3.2.1 pav) galima atrinkti tris junginius, turinčius aukštą DPPH slopinimo efektyvumą – junginius **3** (64 %), **5** (64,24 %) ir **7** (62,12 %), kurie parodė geresnę efektyvumą nei komercinės kontrolės antipirinas. Junginys **8** slopino silpniau, o junginiai **2**, **4** ir **9** DPPH radikalą slopino tik labai nežymiai.

Atlikus tyrimą nustatyta, kad kai kurie junginiai DPPH radikalo neslopino visiškai. Šie junginiai nebuvo atvaizduoti rezultatų grafike.

3.3 Sintetintų junginių antioksidacinio aktyvumo pagal FRAP metodą įvertinimas

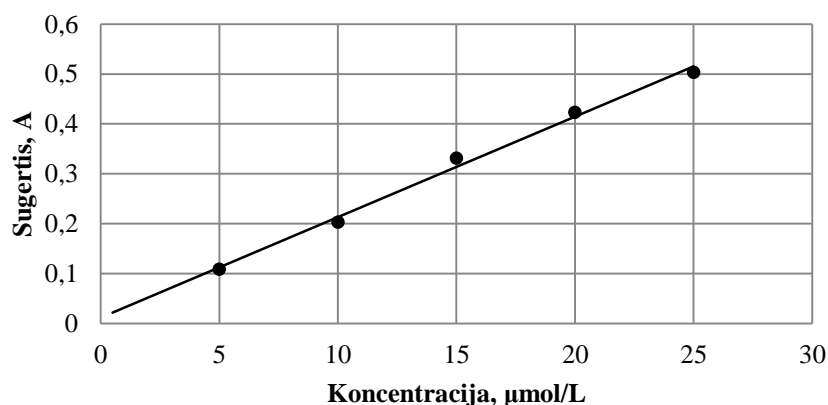
Tyrimo reakcijų metu biologiškai aktyvūs junginiai redukavo Fe^{3+} jonus iki Fe^{2+} , tuo pačiu sudarydami melsvą tirpalo spalvą. Reakcija gali vykti labai skirtingu tempu, priklausomai nuo tiriamo junginio, taigi matavimai buvo atlikti dukart – kuo greičiau po reakcijos pradžios ir reakcijai vykus po 6 min.



3.3.1 pav. Tirtų junginių šviesos sugertis naudojant FRAP metodą

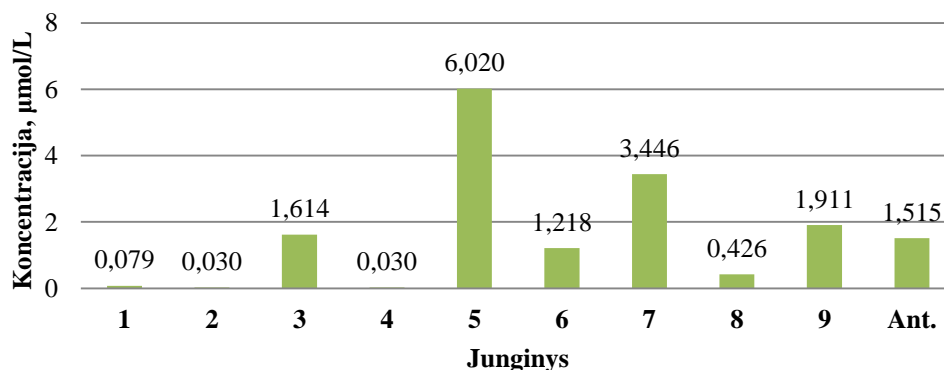
Tyrimo rezultatai parodė (žr. 3.3.1 pav.) didelius skirtumus tarp tirtų junginių reagavimo greičių. Kai kurios medžiagos parodė gerokai didesnes šviesos sugertis leidus reakcijai vykti 6 min. *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**) pasižymėjo ypač dideliu aktyvumu matavime po 6 min, nors pirminio matavimo metu nerodė didelio efektyvumo – šviesos sugertis padidėjo nuo 0,03 iki 0,133. 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tiono (**7**) parodymai taip pat žymiai padidėjo po 6 min, tačiau nesiekia junginio **5** sugerties vertės. Junginys **4** paklaidos lygyje išliko pastovus, bet kartu su likusiais junginiais gerų rezultatų nerodė.

Toliau, norint apskaičiuoti koncentracijas, prie kurių junginiai pasireiškia antioksidacinėmis savybėmis, buvo sudaryta kalibracinė kreivė pagal $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.



3.3.2 pav. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė

Naudojantis prieš tai gautomis šviesos sugertiems vertėms ir kalibracine kreive (žr. 3.3.2 pav.) buvo apskaičiuotos tirtų biologiškai aktyvių junginių koncentracijų reikšmės $\mu\text{mol/L}$, kurios parodo, kokia koncentracija Fe^{3+} jonų buvo paversta į Fe^{2+} jonus.

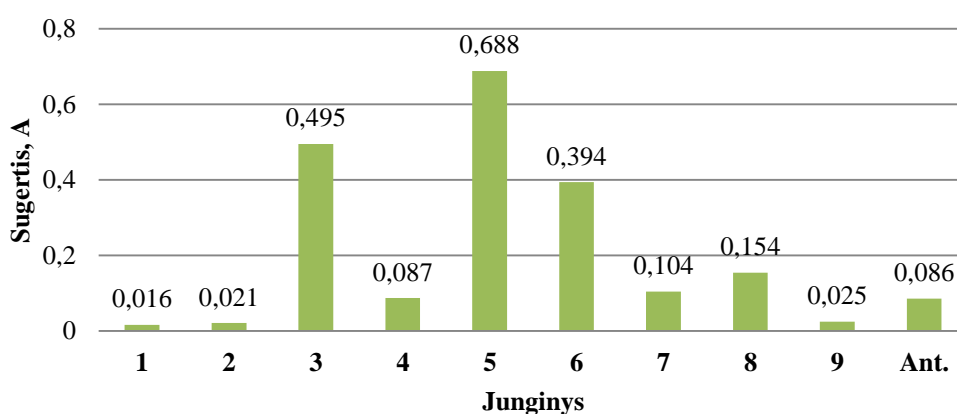


3.3.3 pav. Tirtų junginių redukuotos geležies koncentracijos naudojant FRAP metodą

Iš gautų rezultatų (žr. 3.3.3 pav.) matome, kad mažu antioksidaciniu efektyvumu pasižymėję tirti junginiai visi neredukavo daugiau nei 2 $\mu\text{mol/L}$ trivalentės geležies. Tuo tarpu *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**) rodė 6 $\mu\text{mol/L}$ redukuotos geležies, 1,8 karto daugiau už sekančią aukščiausią koncentraciją.

3.4 Sintetintų junginių redukcinių savybių įvertinimas

Savybių efektyvumas šiuo metodu įvertinamas vadovaujantis principu, kad didesnė šviesos sugertis parodo stipresnes redukcines savybes.

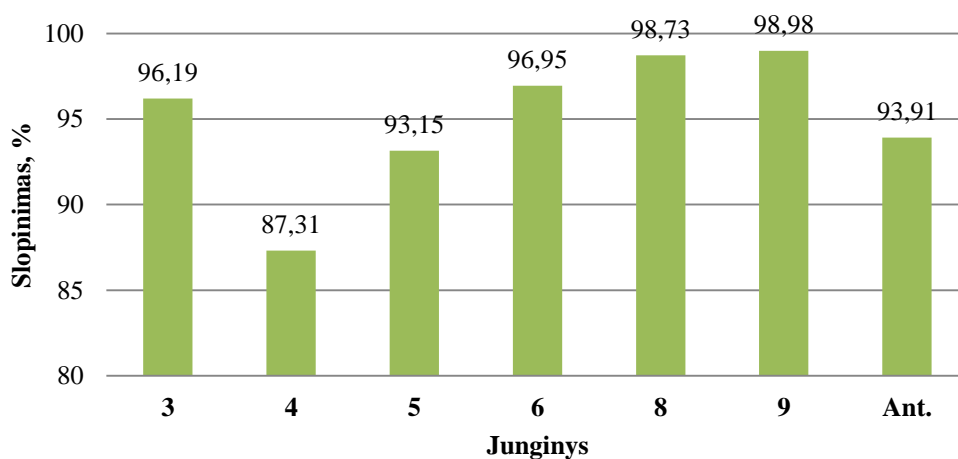


3.4.1 Tirtų junginių šviesos sugertis redukcinių savybių tyrime

Iš grafiko (žr. 3.4.1) matome, kad junginys **5** parodė geriausią rezultatą (0,688). Rezultatas patvirtina anksčiau matytas geras šio junginio antioksidacines savybes. 3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**3**) bei *N,N'*-dimetil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**6**) taip pat parodė aukštesnes sugertis, tačiau likę tirti junginiai stipriomis redukcinėmis savybėmis nepasižymėjo.

3.5 Sintetintų junginių ABTS radikalo slopinimo įvertinimas

Metodas panašus į DPPH radikalo slopinimo tyrimą. ABTS radikalo anijonas pasižymi stipria mėlynai žalia spalva ir kai kurios tirtos medžiagos šią spalvą slopino. Dėl ypač aukštų visų tirtų junginių rezultatų bandymas buvo kartotas su penkis kartus didesne ABTS tirpalo koncentracija, tačiau parodymai išliko panašūs, todėl pirminiai rezultatai buvo priimti.

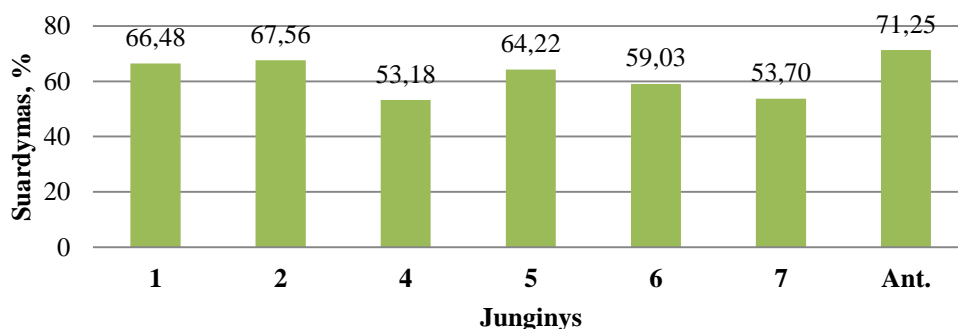


3.5.1 pav. Tirtų junginių ABTS radikalo slopinimo efektyvumas

Kaip minėta, visi junginiai rodė stiprias antioksidacines savybes prieš ABTS radikalą – virš 85% (žr. 3.5.1 pav.). Efektyvumu išsiskyrė *N*-(2,5-diokso-2,5-dihidro-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**8**) (98,73 %) bei 3-(2-{3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanoil}hidrazinil)propano rūgštis (**9**) (98,98 %), tikėtina dėl turimo papildomo dviguba jungtimi prisijungusio deguonies atomo savo struktūroje, lyginant su kitomis tirtomis medžiagomis. Junginys **5** pasireiškė panašiu rezultatu į antipiriną, atitinkamai 93,15 % ir 93,91 %. Junginiai, neparodę antioksidacinio aktyvumo prieš ABTS radikalą nebuvo atvaizduoti grafike.

3.6 Sintetintų junginių vandenilio peroksido suardymo įvertinimas

Tyrimas paremtas tiriamų biologiškai aktyvių junginių gebėjimu nukenksminti hidroksiradikalus. Nustatyta, kad prieš tai visuose tyrimuose naudotas tirpiklis DMSO dalyvauja šalutinėse reakcijose su tyrime naudojamais reagentais, todėl buvo ieškota tyrimui tinkančio tirpiklio. 1-butanolis, atlikus bandymus, buvo nustatytas, kaip optimalus tirpiklis.



3.6.1 pav. Tirtų junginių vandenilio peroksido suardymo efektyvumas

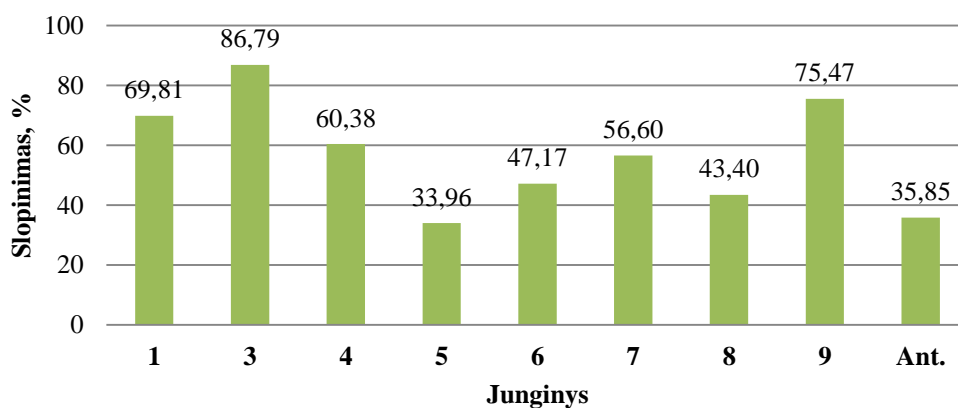
Šiame tyrime visi tirti junginiai pasireiškė aukštu efektyvumu – virš 50 % suardymu (žr. 3.6.1 pav.). Šikart komercinė kontrolė antipirinas parodė geriausią rezultatą (71,25 %). Taip pat šiame tyrime anksčiau tik mažesnius rezultatus rodydavę 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propano rūgštis (**1**) ir metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanoatas (**2**) pasireiškė vienais aukščiausių suardymo efektyvumų – atitinkamai 66,48 % bei 67,56 %.

Junginiai, netirpę 1-butanolyje, nebuvo atvaizduoti rezultatų grafike.

3.7 Sintetintų junginių deoksiribozės apsaugos nuo hidroksi-radikalų įvertinimas

Šiuo metodu tirta biologiškai aktyvių junginių gebėjimas apsaugoti deoksiribozę nuo ją ardančių hidroksi-radikalų. Suardymas ir apsauga vykdomi žmogaus kūno 37°C temperatūroje ir, naudojant tiobarbitūrinę bei trichloracto rūgštis, fragmentai sudaro chromoforą (malonaldehidą), kuris gali būti išmatuojamas.

Taip pat preliminariai tirta, ar tirpiklis turi įtakos rezultatui ir nustatyta, jog anksčiau naudotas DMSO neigiamos įtakos nedaro, o 1-butanolis sukelia šalutines reakcijas ir fazių atsiskyrimus, taigi vėl naudotas DMSO kaip tiriamų junginių tirpiklis.



3.7.1 pav. Tirtų junginių hidroksi-radikalo slopinimas naudojant deoksiribozės apsaugos metodą

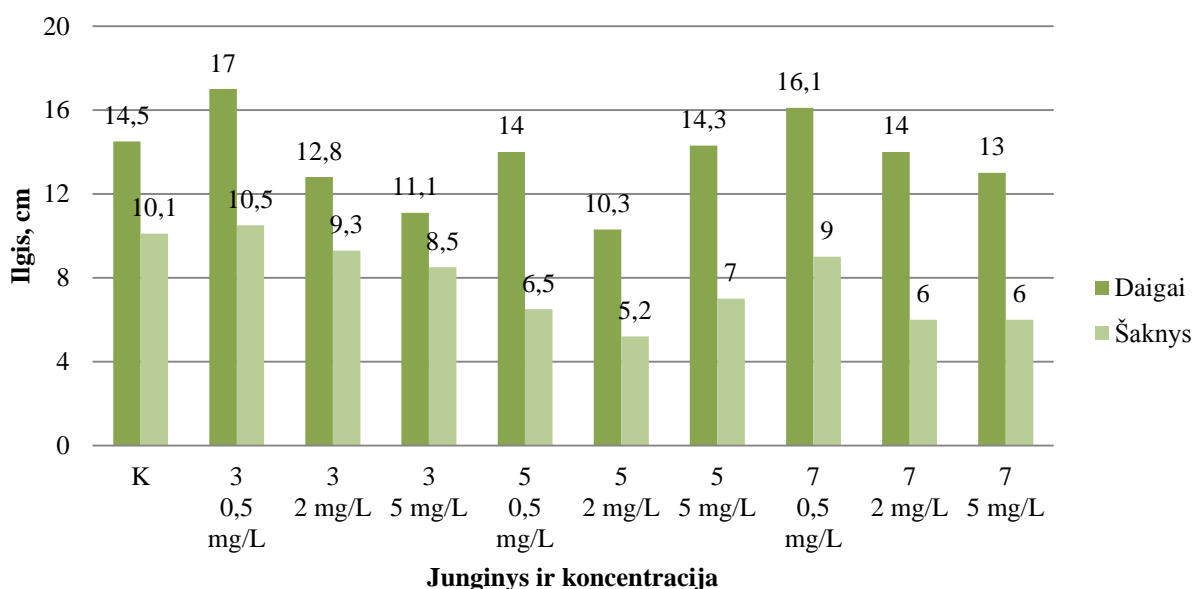
Rezultatai panašūs į prieš tai atliktus vandenilio peroksido suardymo tyrimo rezultatus (žr. 3.7.1 pav.). Tik šikart vietoj stipriausio efektyvumo antipirinas parodė mažiausią slopinimą (35,85 %). Geriausią rezultatą parodė 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**3**) – 86,79 %. Matyti, kad junginio **5** slopinimas (33,96 %) vėl sutapo su antipirinu. Junginys **2**, nepriklausomai nuo tirpiklio, dalyvaudavo šalutinėse reakcijose su reagentais.

Aptariant antioksidacinių tyrimų rezultatus, galima įvardinti *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidą (**5**) kaip geriausias antioksidacines savybes parodžiusį junginį. Taip pat 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**3**) ir 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tionas (**7**) daugumoje bandymų pasižymėjo gerais rezultatais, todėl junginiai **3**, **5**, **7** buvo parinkti augalų augimo skatinimo tyrimui.

3.8 Sintetintų junginių poveikio miežių augimui įvertinimas

Kadangi atrinktos medžiagos netirpios vandenyje, skirtingų koncentracijų bandinių tirpalams paruošti buvo praskiesti turimi 1 mg/ml DMSO tirpalai.

Miežiai buvo auginti esant 24 valandų fotoperiodui bei kambario temperatūrai.

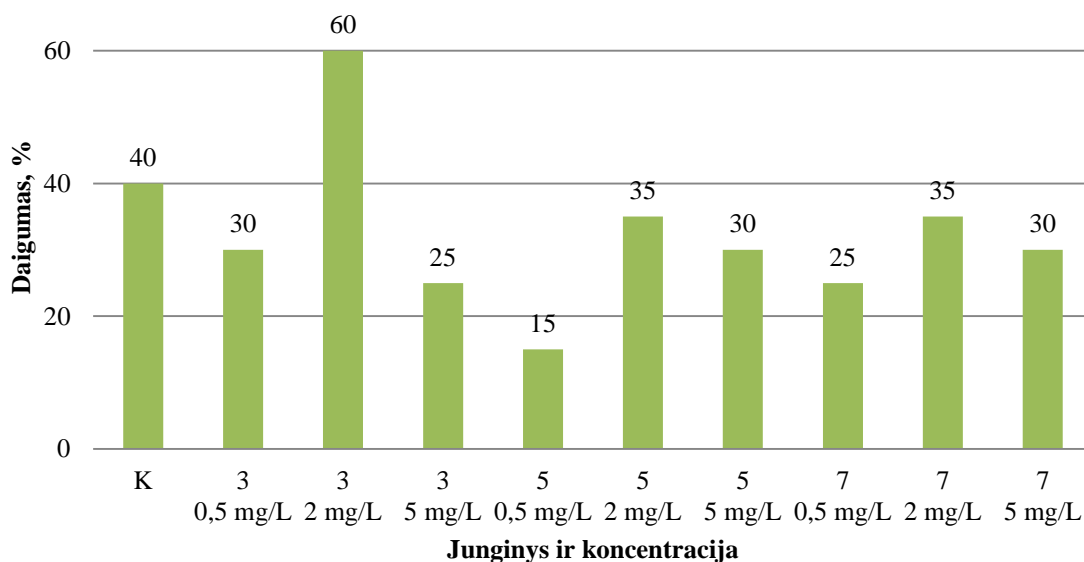


3.8.1 pav. Skirtingų koncentracijų tirtų junginių tirpalų įtaka miežių daigų bei šaknų ilgiui

Pagal grafiką (žr. 3.8.1 pav.) matyti, kad už kontrolę (14,5 cm) ilgesnių daigų augimą skatino tik du bandiniai - 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**3**), jam esant 0,5 mg/L, (17 cm) ir 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tionas (**7**), jam taip pat esant 0,5 mg/L (16,1 cm). Tik junginio **3** 0,5 mg/L bandinys parodė panašų į kontrolės šaknų ilgį (atitinkamai 10,5 cm ir 10,1 cm). Likusieji bandiniai turėjo arba panašius į kontrolės arba trumpesnius daigus ir visi likusieji parodė trumpesnes šaknis. Prieš tai antioksidaciniuose tyrimuose pasižymėjęs junginys **5** sukėlė mažiausią augimą.

Junginių **3** ir **7** rezultatai parodė, kad didinant šių junginių koncentracijas, daigai bei šaknys užaugdavo vis trumpesni, o junginio **5** parodymai padidėjo nuo 2 mg/L iki 5 mg/L koncentracijų.

Šiame bandyme taip pat buvo įvertinta junginių įtaka sėklų daigumui t.y. kokia dalis bandinių sėklų sudygo.



3.8.2 pav. Skirtingų koncentracijų tirtų junginių tirpalų įtaka miežių sėklų daigumui

Duomenys (žr. 3.8.2 pav.) parodė, kad šių miežių sėklų daigumas nebuvo aukštas. Geru daigumu pasižymėjo junginio **3** 2 mg/L bandinys, sudaiginęs daugiau sėklų nei kontrolė (vienoje iš dviejų šio bandinio lėkštelių išdygo visos sėklos). Tačiau kiti bandiniai rodė blogesnius rezultatus - nei vienas jų neparodė didesnio daigumo negu kontrolė.

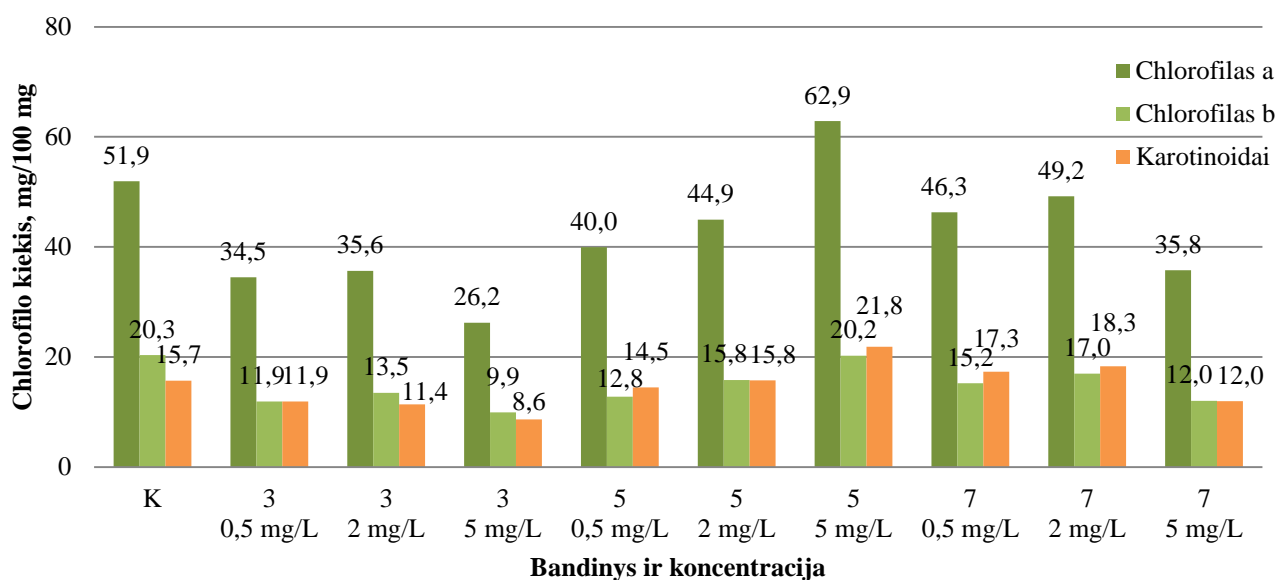
3.9 Sintetintų junginių įtakos miežių pigmentų kiekiui įvertinimas

Iš kiekvienos koncentracijos bandinio buvo paimta 0,1g daigų. Nufiltruoto ekstrakto tūriai pateikiami lentelėje.

Bandinys	Kontrolė	3 0,5 mg/L	3 2 mg/L	3 5 mg/L	5 0,5 mg/L	5 2 mg/L	5 5 mg/L	7 0,5 mg/L	7 2 mg/L	7 5 mg/L
Tūris, ml	6,5	7,5	6,5	6	7	7	7,5	8	6	6

3.9.1 lent. Nufiltruoto ekstrakto tūris skirtingiems tirtų junginių bandiniams

Pagal šiuos duomenis toliau apskaičiuojami pigmentų kiekiai visiems bandiniams.



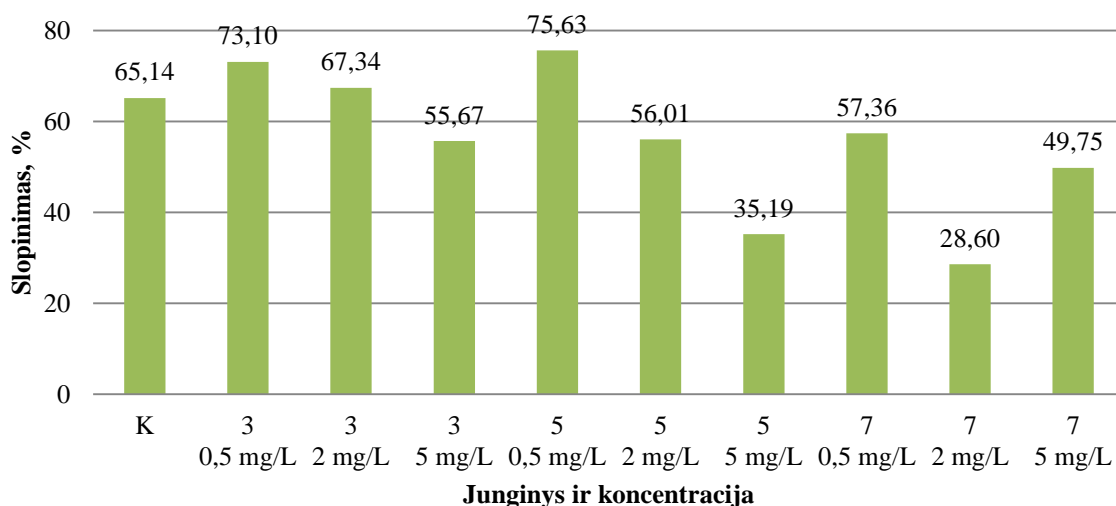
3.9.1 pav. Pigmentų kiekiai esant skirtingoms tirtų junginių koncentracijoms

Iš tyrimų rezultatų grafiko (žr. 3.9.1 pav.) matyti, kad junginys *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**), prieš tai rodęs nežymius rezultatus, parodė aukštus chlorofilo *a* bei karotinoidų kiekius visuose bandiniuose, tačiau neskatino chlorofilo *b* susidarymo. Geriausių rezultatų parodė junginio **5** 0,5 mg/L bandinys – lyginant su kontrole, 1,2 karto daugiau chlorofilo *a* ir 1,4 karto daugiau karotinoidų. Junginys **7** chlorofilo *a* ir *b* kiekių nedidino, tačiau jo 0,5 mg/L ir 2 mg/L bandiniai atitinkamai 1,1 ir 1,17 karto padidino karotinoidų kiekį. Junginys **3** pigmentų kiekių susidarymo neskatino.

Tyrimų rezultatai, kad geriausiai miežių augimą iš tirtųjų junginių stimuliuavęs 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**3**) labiausiai sumažino juose esančių pigmentų kiekį. Ir atvirkščiai, *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**), nerodęs augimą skatinančių savybių, žymiai paskatino pigmentų gamybą.

3.10 Sintetintų junginių įtakos miežių DPPH radikalo slopinimo savybėms įvertinimas

Tyrimas analogiškas prieš tai atliktam sintetinių junginių DPPH slopinimo tyrimui, tik šiame tyrime įvertintas paruoštų miežių ekstraktų metanolyje DPPH radikalo slopinimo efektyvumas.

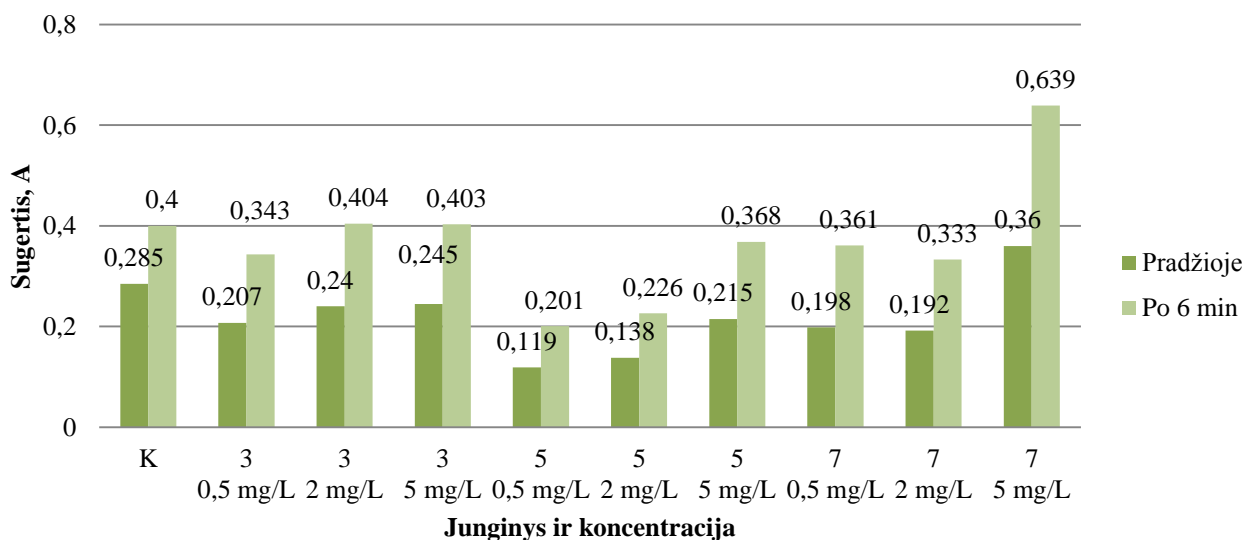


3.10.1 pav. Skirtingų tirtų junginių koncentracijų įtaka miežių DPPH slopinimo efektyvumui

Iš tyrimų rezultatų matyti (žr. 3.10.1 pav.), kad didžiausią įtaką miežių DPPH slopinimo efektyvumui parodė *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**), jam esant 0,5 mg/L (75,63 %). Tačiau šio junginio efektyvumas žymiai mažėja didėjant jo koncentracijai – 56,01 % esant 2 mg/L ir 35,19 %, esant 5 mg/L. 3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas (**3**) taip parodė silpnėjančias savybes didėjant jo koncentracijai, tačiau ne taip žymiai ir jo 0,5 mg/L (73,10 %) ir 2 mg/L (67,34 %) bandiniai pranoko kontrolės efektyvumą (65,14 %). Junginys **7** neparodė geresnio už kontrolę slopinimo.

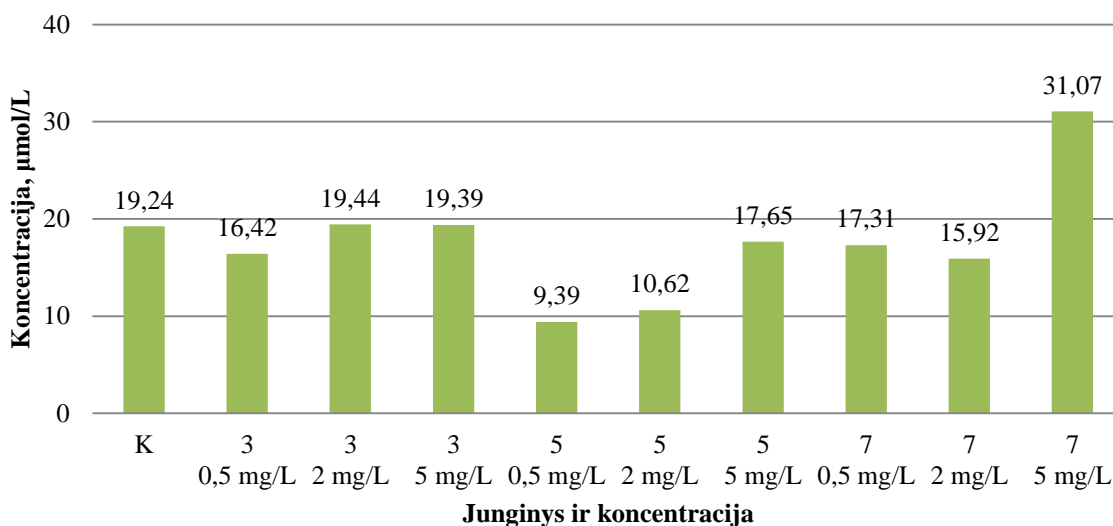
3.11 Sintetintų junginių įtakos miežių antioksidaciniam aktyvumui pagal FRAP metodą įvertinimas

Tyrimo nustatyta bandinių ekstraktų metanolyje gebėjimas redukuoti trivalentę geležį iki divalentės. Įvertinta kiekvieno ekstrakto šviesos sugertis ir paskaičiuota jų redukuotos geležies koncentracija.



3.11.1 pav. Skirtingų tirtų junginių koncentracijų įtaka miežių ekstraktų šviesos sugertims naudojant FRAP metodą

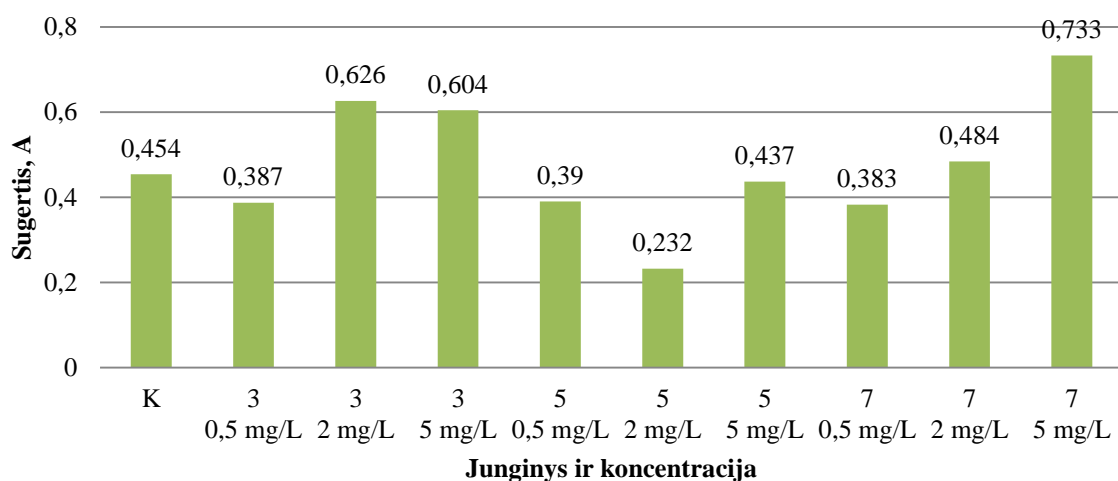
Rezultatai parodė (žr. 3.11.1 pav.), kad geriausią antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu turėjo 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tiono (**7**) 5 mg/L bandinys. Jis, reakcijai vykus 6 min, parodė 1,6 karto didesnę sugertį (0,639) nei kontrolė (0,4). Visi kiti bandiniai arba parodė panašius į kontrolės arba mažesnius rezultatus.



3.11.2 pav. Skirtingų tirtų junginių koncentracijų įtaka miežių ekstraktų redukuotos geležies koncentracijoms naudojant FRAP metodą

Iš gautų parodymų (žr. 3.11.2 pav.), matyti, kad **7** junginio 5 mg/L bandinys redukuoja 31,07 µmol/L geležies, o likusieji bandiniai neredukavo daugiau nei 20 µmol/L trivalentės geležies.

3.12 Sintetintų junginių įtakos miežių redukciniams savybėms įvertinimas



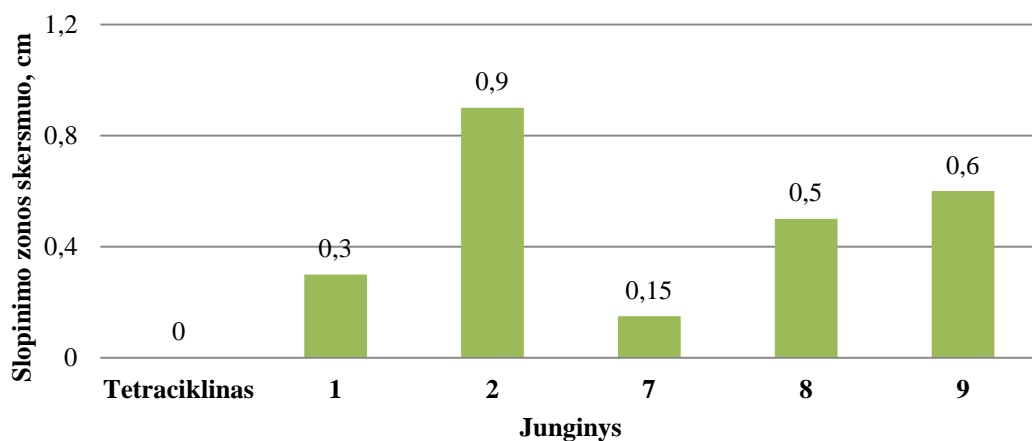
3.12.1 pav. Skirtingų tirtų junginių koncentracijų įtaka miežių redukcinių savybių efektyvumui

Atlikus tyrimą, rezultatai rodė (žr. 3.12.1 pav.), kad 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3*H*)-tiono (**7**) 5 mg/L bandinys parodė geriausią rezultatą (0,733). *N*-(2,5-dimetil-1*H*-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**), jam esant 2 mg/L bei 5 mg/L, taip pat parodė aukštas sugertis – atitinkamai 0,626 ir 0,604, lyginant su kontrolės 0,454. Matyti, kad šio tyrimo rezultatai panašūs į prieš tai atlikto antioksidacinių savybių tyrimo pagal FRAP metodą.

3.13 Sintetintų junginių antibakterinio aktyvumo agaru difuziniu metodu įvertinimas

Kaip kontrolė šiame tyrime buvo naudojamas tetraciklino 12,5 µg/ml tirpalas. Visi bandymai atlikti su 1 mg/ml koncentracijų biologiškai aktyvių junginių tirpalais.

Bandymai su *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris* neparodė nei vieno tirto junginio antibakterinio aktyvumo, o kontrolė rezultatus parodė – slopinimo zonų skersmenys siekė 2,7 cm ir 1,7 cm.



3.13.1 pav. Sintetinių junginių antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli*

E. coli tyrime matyti kelių sintetinių junginių antibakterinis aktyvumas. Geriausiai ją slopino metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino] propanoatas (**2**), iki šiol rodęs nežymius rezultatus ankstesniuose tyrimuose. Junginiai **8** ir **9** taip pat turėjo žymesnes antibakterines savybes prieš *E. coli*, o **1** ir **7** nors ir rodė aktyvumą, tačiau labai nežymų. Tetraciklinas prieš šį *E. coli* kamieną slopinimo neparodė.

4. REKOMENDACIJOS

Atlikus tyrimus, tolimesnei gamybai atrinktas N-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas (**5**), kaip geriausias antioksidacines bei augimo reguliavimo savybes parodęs junginys. Jis gali būti panaudotas kaip vaistinių preparatų sudedamoji dalis ar kaip žaliava tolimesnei biologiškai aktyvių junginių sintezei. Vadovaujantis laboratorijoje sinteze ir šiuolaikinėmis biologiškai aktyvių medžiagų pramoninės sintezės tendencijomis [32,33], sudaryta rekomendacinė junginio **5** gamybinė schema.

Žymėjimai:

R – periodinio veikimo reaktorius;

D – distiliacijos kolona;

KR – kristalizatorius;

T – talpykla;

S – išcentrinis siurblys;

Kn – kondensatorius;

A – aušintuvas;

N – nusodinimo kolona;

F – centrifuginis filtras;

Dž – mentinė džiovykla;

G – kūginis granulatorius;

St – sietas;

P – pakavimo mašina.

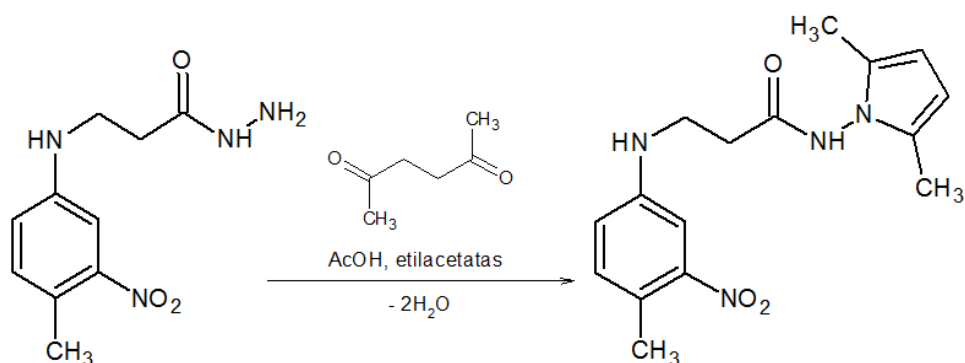
Į reaktorių R paduodamas kietas 3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas, skystas 2,5-heksandionas, ledinė acto rūgštis ir tirpiklis etilacetatas. Reaktorius šildomas prisotintu garu. Reakcija vykdoma 90°C temperatūroje atmosferiniame slėgyje 2 h. Reakcijai pasibaigus, į reaktorių įleidžiama 10% reakcijos mišinio masės vandens, laikomo talpoje T1. Tai daroma su tikslu praplauti reakcijos mišinį ir pašalinti acto rūgštį. Praplovimo vanduo nusiurbiamas siurbliu S1 į distiliacijos koloną D, kur jis nudistiliuojamas, kondensuojamas kondensatoriuje Kn ir sugrąžinamas į talpyklą T1. Acto rūgštis nusiurbiamas siurbliu S9 į talpyklą T2, iš kurios bus grąžinta į reaktorių sekančiame jo pakrovime.

Praplautas reakcijos mišinys siurbliu S3 paduodamas į dviejų kristalizatorių KR1 ir KR2 sistemą. Kristalizacija vyksta dvejomis stadijomis, kur iš pirminio kristalizatoriaus KR1 kristalai su tirpikliu pervedami į antrinį kristalizatorių KR2. Iš jo kristalų ir etilacetato masė siurbliu S8 nuvedama į nusodinimo koloną N.

Iš reaktoriaus R surenkamas šildomųjų garų kondensatas ir naudojamas kristalizatoriui KR1 aušinti. Iš pirmojo kristalizatoriaus ištekėjęs pašilęs kondensatas aušinamas aušintuvu A ir paduodamas į antrąjį kristalizatorių KR2 jam aušinti. Iš jo kondensatas nuvedamas iš sistemos. Po nusodinimo, kolonoje N likęs etilacetatas nusiurbiamas ir nuvedamas į talpyklą T3, iš kurios bus grąžinamas į reakcijos mišinį. Nusėdę kristalai yra dalinami į dvi dalis. Dalis nusėdusių kristalų konvejeriu grąžinami į kristalizatorius, kur jie panaudojami naujiems kristalizacijos centrams sudaryti, taip gerinant kristalų susidarymo išeią.

Kita dalis paduodama į centrifuginį filtrą F, kuriame kristalai atskiriami nuo etilacetato, kuris taip pat surenkamas talpoje T3 pakartotiniam panaudojimui. Nufiltruoti kristalai nuvedami džiuoti į mentinę džiovyklą Dž. Iš jos sausas produktas rankiniu būdu pernešamas į kūginį granuliatorių G. Gautos granulės paduodamos į sietą St, kur jos atskiriamos pagal dydžius. Granulės, didesnės už norimą dydį, yra paduodamos atgal į granuliatorių G jų dydžiui mažinti. Per mažos granulės surenkamos į talpą T4. Jos panaudojamos, kaip papildomi kristalizacijos centrai kristalizatoriuose KR1 ir KR2. Tinkamo dydžio granulės paduodamos į pakavimo mašiną P, kur yra supakuojamos ir gaunamas produktas.

Remiantis laboratorinės sintezės rezultatais, paskaičiuota reakcijos entalpija bei reikalingas reagentų santykis reakcijai:



4.1 schema

Suskaičiuojama vykstančios reakcijos entalpija pagal ryšių energiją:

$$\Delta H = \sum \Delta H_{\text{suardytų ryšių}} - \sum \Delta H_{\text{sudarytų ryšių}} \quad (1)$$

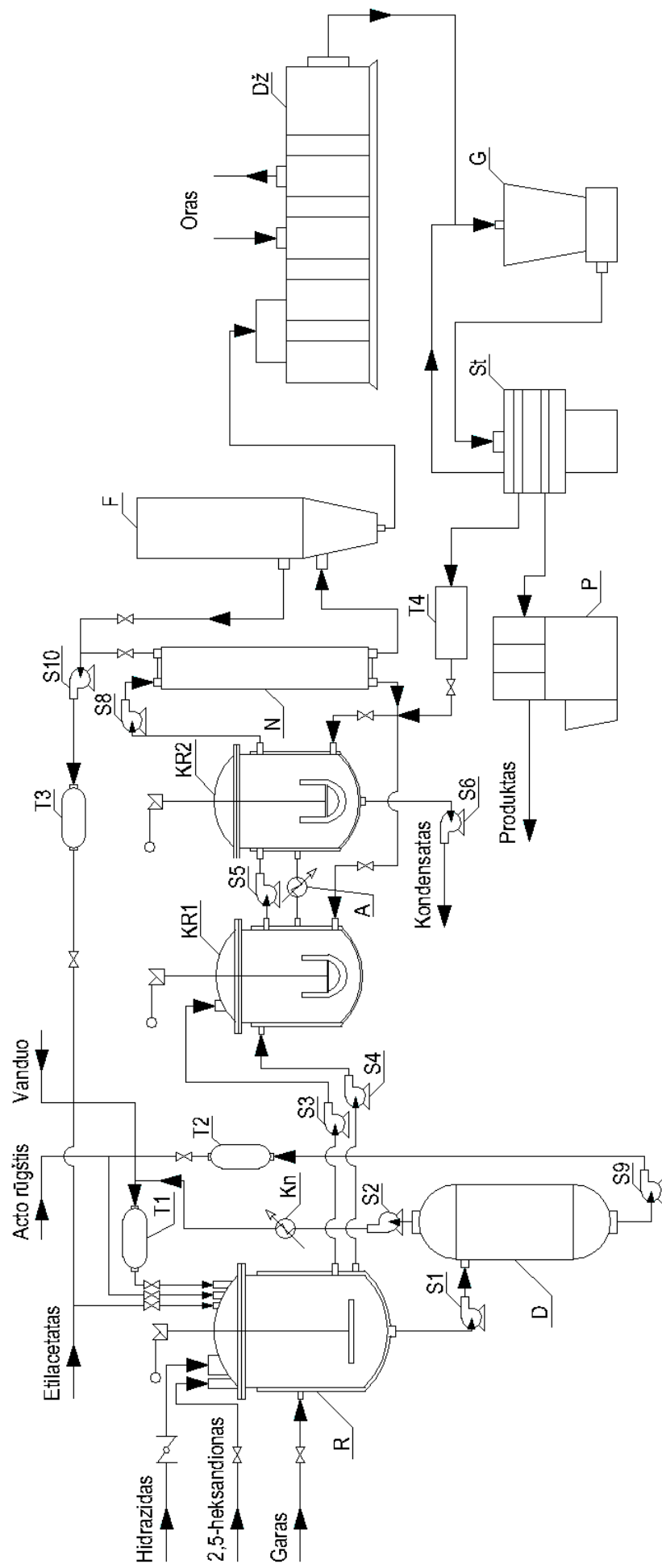
$$\Delta H = (2 \cdot 388 + 2 \cdot 412 + 2 \cdot 743) - (4 \cdot 463 + 2 \cdot 305 + 2 \cdot 264) = 3086 - 2990 = 96 \text{ kJ/mol}$$

Apskaičiuota reakcijos entalpija teigiamia, taigi reakcija yra endoterminė.

Atsižvelgiant į laboratorijoje atliktos junginio **5** sintezės metu naudotus reagentų kiekius, rekomenduojama gamybinę reakciją atlikti pateiktais santykiais.

Reagentas	Santykinis kiekis, %
3-[(4-Metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas	11,7
2,5-hexadionas	5,7
Acto rūgštis	8,6
Etilacetatas	74

4.1 lentelė. Atrinkto junginio gamybos reagentų santykiniai kiekiai



IŠVADOS

1. Darbo eigoje buvo susintetintas 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas ir jo dariniai. Hidrazidui gauti buvo susintetinta du tarpiniai junginiai ir iš jo buvo gauti šeši skirtingų cheminių grupių dariniai.
2. Ištirtas sintetintų junginių antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta, kad geriausiomis savybėmis pasižymėjo N-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas, 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas ir 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3H)-tionas, kurie buvo atrinkti miežių augimo reguliavimo tyrimui.
3. Ištirta atrinktų junginių skirtingų koncentracijų įtaka miežių augimui *in vitro*. Nustatyta, kad 3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanhidrazidas, jo esant 0,5 mg/L, turėjo geriausią poveikį miežių šaknų bei daigų ilgiui.
4. Ištyrus atrinktų junginių įtaką miežių pigmentų kiekiui, rezultatai parodė, kad N-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas, jo esant 5 mg/L, labiausiai didino chlorofilo *a* (1,2 karto) bei karotinoidų (1,4 karto) kiekius.
5. Nustatytas atrinktų junginių poveikis miežių antioksidaciniam aktyvumui. Gauta, kad 5-{2-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]etil}-1,3,4-oksadiazol-2(3H)-tionas, jo esant 5 mg/L, parodė didžiausią įtaką miežių redukciniams savybėms ir antioksidaciniam aktyvumui pagal FRAP metodą.
6. Įvertintas visų susintetintų junginių antibakterinis aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ir *E. coli*. Gauta, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *E. coli* pasižymėjo metil-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanoatas.
7. Remiantis tyrimų rezultatais atrinktas N-(2,5-dimetil-1H-pirol-1-il)-3-[(4-metil-3-nitrofenil)amino]propanamidas, kaip universaliausias teigiamas biologines savybes parodęs junginys ir buvo nubraižyta jo principinė technologinė schema.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Rutkauskas, K., Tumosiene, I., Mikulskiene, G., Kantminiene, K., & Beresnevičius, Z. J. (2011). Synthesis and characterization of 3-[(2-[(2-(hydrazino-carbonyl)ethyl] sulfanyl) phenyl)amino]propanehydrazide derivatives. *Chemija*, 22(4), 238–247
2. Aitken, K. M., Bellus, D., & Meijere, A. D. (2009). *Science of synthesis: Houben-Weyl methods of molecular transformations*. New York: Georg Thieme.
3. Anusevičius K. Synthesis and transformations of n-(4-halogenophenyl)-β-amino acids derivatives. (Daktaro disertacija). Kaunas, 2014.
4. *U.S. Patent No. US 20080200731 A1*. (2001). Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
5. Rutkauskas, K., Jakienė, E., ir Beresnevičius, Z.J. (2003). P-Fenilendiamino ir nesočiųjų karboksirūgščių sąveikos produktai ir jų biologinis aktyvumas. *Cheminė Technologija*, (2), 68-73.
6. Wang, Z., & Qin, H. (2004). Solventless syntheses of pyrazole derivatives. *Green Chemistry Green Chem.*, 6(2), 90. doi:10.1039/b312833d
7. Rutkauskas, K., Zubrienė, A., Tumosienė, I., Kantminienė, K., Kažemėkaitė, M., Smirnov, A., . . . Matulis, D. (2014). 4-Amino-substituted Benzenesulfonamides as Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases. *Molecules*, 19(11), 17356-17380. doi:10.3390/molecules191117356
8. Saad, H. A., Osman, N. A., & Moustafa, A. H. (2011). Synthesis and Analgesic Activity of Some New Pyrazoles and Triazoles Bearing a 6,8-Dibromo-2-methylquinazoline Moiety. *Molecules*, 16(12), 10187-10201. doi:10.3390/molecules161210187
9. Bayrak, H., Demirbas, A., Demirbas, N., & Karaoglu, S. A. (2009). Synthesis of some new 1,2,4-triazoles starting from isonicotinic acid hydrazide and evaluation of their antimicrobial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(11), 4362-4366. doi:10.1016/j.ejmech.2009.05.022
10. Ainsworth, C. (1956). The Condensation of Carboxylic Acid Hydrazides with Carbon Disulfide. *J. Am. Chem. Soc. Journal of the American Chemical Society*, 78(17), 4475-4478. doi:10.1021/ja01598a077
11. Feuer, H., & Rubinstein, H. (1958). Maleic Hydrazide. I. Reactions with Selected Electrophilic Reagents 1. *J. Am. Chem. Soc. Journal of the American Chemical Society*, 80(21), 5873-5877. doi:10.1021/ja01554a074

12. Squella, J., Bollo, S., & Nunez-Vergara, L. (2005). Recent Developments in the Electrochemistry of Some Nitro Compounds of Biological Significance. *Current Organic Chemistry COC*, 9(6), 565-581. doi:10.2174/1385272053544380
13. Wardman, P. (1985). Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine. *Environ Health Perspect Environmental Health Perspectives*, 64, 309-320. doi:10.1289/ehp.8564309
14. Kumar, V., Kaur, K., Gupta, G. K., & Sharma, A. K. (2013). Pyrazole containing natural products: Synthetic preview and biological significance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 735-753. doi:10.1016/j.ejmech.2013.08.053
15. Bekhit, A. A., & Abdel-Aziem, T. (2004). Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(8), 1935-1945. doi:10.1016/j.bmc.2004.01.037
16. Keter, F. K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S. S., Darkwa, J., Rees, D. J., & Meyer, M. (2008). In vitro evaluation of dichloro-bis(pyrazole)palladium(II) and dichloro-bis(pyrazole)platinum(II) complexes as anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology Cancer Chemother Pharmacol*, 63(1), 127-138. doi:10.1007/s00280-008-0721-y
17. Idhayadhulla, A., Kumar, R. S., Nasser, A. A., & Manilal, A. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of some new pyrrole derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia Bull. Chem. Soc. Eth.*, 26(3). doi:10.4314/bcse.v26i3.12
18. Aljamali, N.M., Jwad, S.M., *Survey in Pyrrole Compounds and Biological Activity*. International Technology and Innovation Research Journal. [žiūrėta 2016-05-30]. Prieiga per internetą <http://itirj.org/paper/items/show/20>.
19. Bandyopadhyay, D., Mukherjee, S., Granados, J. C., Short, J. D., & Banik, B. K. (2012). Ultrasound-assisted bismuth nitrate-induced green synthesis of novel pyrrole derivatives and their biological evaluation as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 209-215. doi:10.1016/j.ejmech.2012.01.055
20. Narasimhan, B., Kumar, P., Sharma, D. (2010). Biological activities of hydrazide derivatives in the new millennium. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 52, 169-180.
21. Rollas, S., & Küçükgülzel, S. G. (2007). Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules*, 12(8), 1910-1939. doi:10.3390/12081910

22. Kamiński, K., Rapacz, A., Łuszczki, J. J., Latacz, G., Obniska, J., Kieć-Kononowicz, K., & Filipek, B. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of new hybrid anticonvulsants derived from *N*-benzyl-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(10), 2548-2561. doi:10.1016/j.bmc.2015.03.038
23. Omar, F., Mahfouz, N., & Rahman, M. (1996). Design, synthesis and antiinflammatory activity of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 31(10), 819-825. doi:10.1016/0223-5234(96)83976-6
24. Santos, P. M., Antunes, A. M., Noronha, J., Fernandes, E., & Vieira, A. J. (2010). Scavenging activity of aminoantipyrines against hydroxyl radical. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(6), 2258-2264. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.071
25. Bondock, S., Rabie, R., Etman, H. A., & Fadda, A. A. (2008). Synthesis and antimicrobial activity of some new heterocycles incorporating antipyrine moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 2122-2129. doi:10.1016/j.ejmech.2007.12.009
26. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:10.1016/s0023-6438(95)80008-5
27. Benzie, I. F., & Strain, J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Oxidants and Antioxidants Part A Methods in Enzymology*, 15-27. doi:10.1016/s0076-6879(99)99005-5
28. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3
29. Yen, G., Duh, P., & Tsai, H. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79(3), 307-313. doi:10.1016/s0308-8146(02)00145-0
30. Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochim. Soc. Trans. Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591-592. doi:10.1042/bst0110591

31. Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (1998). Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases CLIN INFECT DIS*, 26(4), 973-980. doi:10.1086/513938
32. Li, J., Trout, B. L., & Myerson, A. S. (2016). Multistage Continuous Mixed-Suspension, Mixed-Product Removal (MSMPR) Crystallization with Solids Recycle. *Organic Process Research & Development Org. Process Res. Dev.*, 20(2), 510-516. doi:10.1021/acs.oprd.5b00306
33. Bennett, B., & Cole, G. (2003). *Pharmaceutical production: An engineering guide*.