

Раманов анализ на новосинтезирани ароилхидразони – връзка между структурата и антиоксидантната активност

**В. Хаджимитова¹, Н. Христова-Авакумова¹, Л. Атанасова¹,
Е. Вълчева²**

¹Катедра медицинска физика и биофизика, Медицински факултет,
Медицински Университет – София

²Физически факултет, СУ “Св. Климент Охридски”

Abstract. The goal of this study is to find a connection between the raman spectra and the antioxidant activity (AOA) of four newly synthesized hydrazones (a class of organic compounds with multifaceted biological properties). The compounds differ only by the kind of substitution in the aldehyde ring of the base compound - salicylaldehydearoylhydrazones. The result was two methoxy derivatives and one bromine derivatives.

These compounds together with the base were tested for AOA in three different ways, showing aspects of its behavior systems with stable radicals: ABTS and DPPH and iron-induced lipid peroxidation in egg yolk homogenate. Furthermore readings of the raman spectra were taken of the four compounds in solid phase.

After a comparison of the raman spectra of the four compounds it was determined that the addition of a methoxy group leads to a displacement of the peak at 1160 cm^{-1} , where the expected vibrations are $\nu(\text{O-H})$ and $\delta(\text{O-H})$. A linear dependency was established between the spectrum region and the size of the AOA methoxy derivatives.

1 Увод

Разработването на нови лекарствени вещества е непрекъснат процес, като основните научни подходи са синтезиране на нови съединения, притежаващи желаните фармакологични свойства, или подобряване на структурата на вещества с доказан лечебни ефект с цел да се оптимизира тяхната биологична активност и/или намалят страничните нежелани ефекти.

При изследване на връзката структура-биологични ефекти информацията за вибрационните трептения на молекулите е елемент от цялостното проучване на структурата на веществата. Информацията, която може да се получи от ИЧ и Рамановите спектри на ве-

В. Хаджимитова, Н. Христова-Авакумова, Л. Атанасова, Е. Вълчева

ществата, позволява да се оптимизира структурата на лекарствени-те субстанции. Един от възможните подходи при търсене на връзка-та структура-активност е да се изследват по отделно вибрационните спектри на веществата и тяхното поведение в биологично релевантни системи, след което да се изследва възможността за наличие на зависимост между промени в вибрационните енергии на молекулите и техните биологични активности [1].

Хидразоните са група органични съединения, известни с изключителната си широкоспектърност по отношение на проявената биологична активност. В своите различни модификации те проявяват: антимикобна, аналгетична, противовъзпалителна, антиоксидантна и др. активности [2, 3].

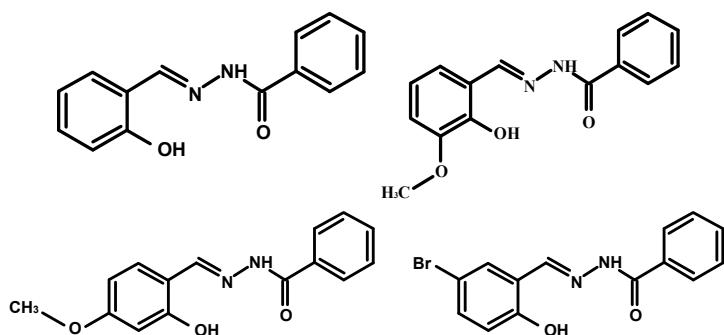
Установено е, че изявата на едни или други биологично значими свойства се свързва с присъствието на различни по структура и местоположение заместители в молекулите на новосинтезираните хидразони [3].

Изследваните от нас хидразони са производни на SBH, който е базисно съединение при търсене на вещества хелатори на желязото. Съществуват редица болестни състояния, свързани с нарушения или отклонения в обмена на желязото в човешкия организъм [4], напр. болестта на Паркинсон [5]. Известните към момента медикаменти, използвани за хелиращата терапия при пациенти с желязно свръхнатоварване, са малко. Основните проблеми при одобрението на новите лекарствени вещества са свързани с нежеланите им странични ефекти.

Ключов етап от предклиничните изследвания на новосинтезирани субстанции е проучването на способността им да повлияват свободнорадикалните процеси в човешкото тяло чрез използването на моделни, биологично релевантни *in vitro* и *in vivo* системи и определяне на база получените данни на възможността за приложението им при повлияване на антиоксидантния статус на пациентите, които биха ги употребявали.

Целта на настоящото проучване е да се потърси връзка между рамановите спектри на новосинтезирани производни на SBH и техните антиоксидантни свойства.

Настоящото проучване включва освен базисното съединение салицилалдехидбензоилхидразон (SBH), две негови метокси-производни и една бромна модификация. Така бяха получени: 3-метоксисалицил алдехидбензоилхидразон (3mSBH), 4-метоксисалицилалдехидбензоилхидразон (4mSBH) и 5-бромсалицилалдехидбензоилхидразон (5BrSBH) (Фиг. 1).



Фиг. 1: Химическа структура на изследваните хидразони.

Те са синтезирани и физико-химично охарактеризирани от група от Фармацевтичния факултет на МУ-София [6–9]. Техните антиоксидантни свойства бяха изследвани в системи със стабилните радикали: ABTS и DPPH; и желязо-индуцирана липидна пероксидация в желтъчен хомогенат (TBARS). Паралелно бяха снети рамановите спектри на четирите вещества в твърда фаза.

2 Методи

Получаване на раманови спектри

Рамановата спектроскопия е много ефикасен безразрушителен метод за изследване на вибрационните честоти, специфични за химичните връзки и симетрията на молекулите. Чрез него могат да бъдат идентифицирани химичните връзки, както и промяна в тях. Възможно е да се проведе структурно характеризирание, тъй като вибрационните свойства корелират с конформационните характеристики.

Спектри на Раманово разсейване от изследваните вещества бяха измерени с микро-Раманов спектрометър LabRAM HR800 при възбуждане с лазерно лъчение с дължина на вълната 632 nm при стайна температура. Лазерният лъч беше фокусиран върху веществото в твърда фаза през микроскоп с обектив с увеличение $\times 50$. Разделителната способност по честота е 1 cm^{-1} .

Антиоксидантна активност (АОА)

ABTS метод — изследванията бяха проведени съгласно Re et al. [10]. Към 2 ml от ABTS⁺• радикала бяха добавени различни концентрации от изследваните структурни аналози. Пробите бяха инкубирани в продължение на 60 min при стайна температура, след което екстинкцията им беше измерена при 734 nm.

За оценка на АОА беше използвана величината С-50. С-50 е концентрацията на веществото, което намалява количеството радикали наполовина спрямо изходното. За изчисляването на тази стойност беше използван аналитичният вид на зависимостта на екстинкцията при 734 nm от концентрацията.

DPPH метод – методът беше проведен съгласно Group et al. [11]. Към 2 ml от изходен разтвор на DPPH• радикала бяха добавени изследваните хидразони в концентрации 0.09 mmol/L. Пробите бяха инкубирани в продължение на 60 min при стайна температура, след което екстинкцията им беше измерена при 517 nm. Получените резултати са представени като процент от контрола (пробата, в която няма хидразонни).

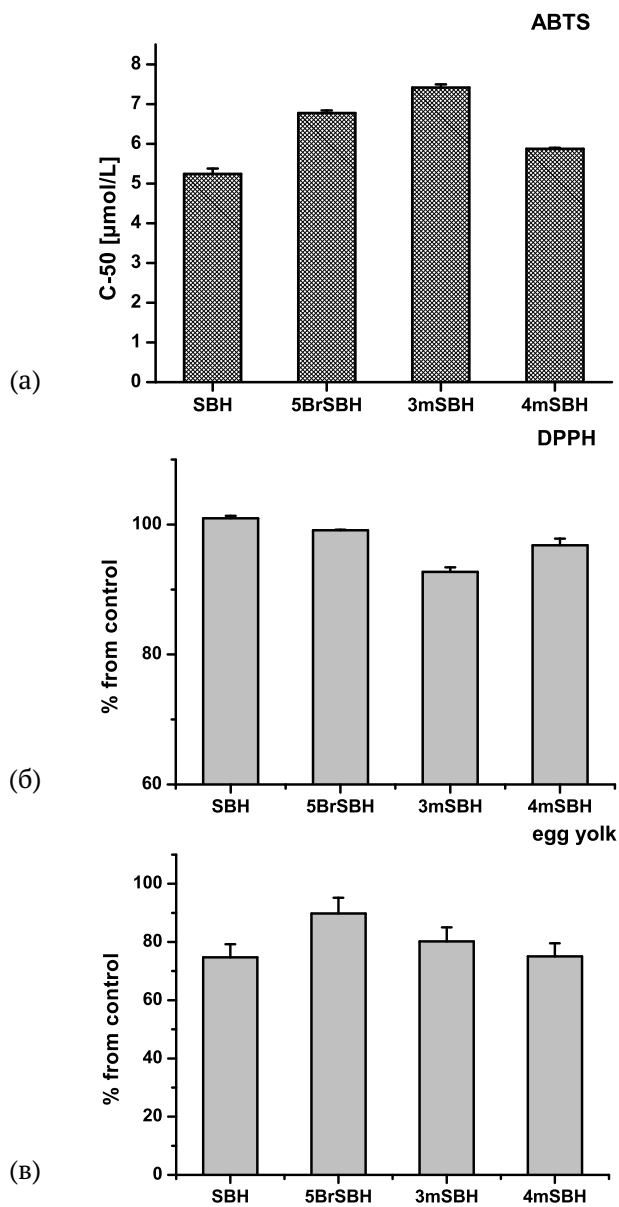
Желязо-индуцирано окисление на жълтъчен хомогенат [12] – Определянето на нивото на Fe-индуцирана ЛП е осъществено със система, съдържаща жълтъчен хомогенат. В 1 ml хомогенат (разреден v/v 1:100) бяха добавени хидразоните в концентрациите, показани на съответната фигура. Реакцията беше стартирана с 50 μ L FeCl₂ с крайна концентрация 0.1 mmol/L. Пробите бяха инкубирани в продължение на 30 min при температура 37°C. След това към всяка проба бяха добавени 0.5 ml 2.8% разтвор на трихлороцетна киселина и 0.5 ml 1% разтвор на тиобарбитурова киселина (ТБК). След повторна инкубация при 100°C в продължение на 20 min пробите бяха центрофугирани и екстинкцията на супернатантата беше измерена при 532 nm. Получените резултати са представени като процент от контрола.

3 Резултати и дискусия

Резултатите, получени за АОА, са показани на Фиг. 2. На Фиг. 2а и 2б са показани данните, получени чрез методите, основаващи се на стабилни свободни радикали, чрез които се измерва тоталната антиоксидантна активност (ТАОА). Двата метода са взаимнодопълващи се, тъй като оценяват различни страни на антиоксидантните свойства на веществата. В системата с ABTS радикали веществата показаха голяма активност, затова резултатите са представени чрез стойностите на С-50 (Фиг. 2а).

Като сравнихме антиоксидантните свойства на четирите хидразони в системата с ABTS, установихме, че те са най-добре изразени за SBH и АОА на съединенията намалява в реда SBH > 4mSBH > 5BrSBH > 3mSBH.

В системата с DPPH радикали тестваните хидразони показаха относително слаба активност и затова резултатите са представени само



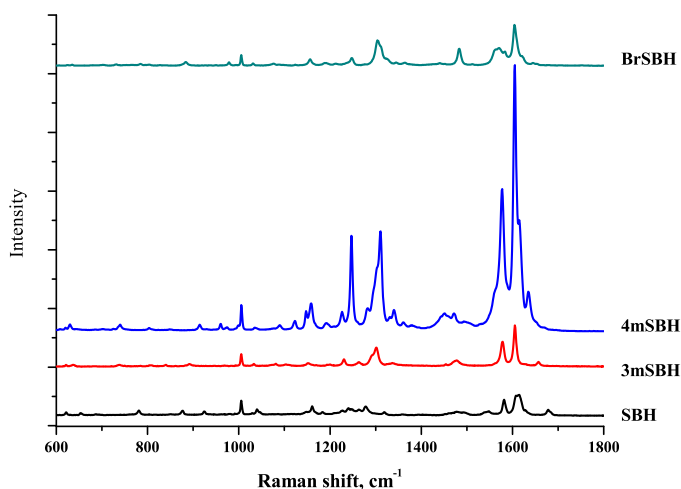
Фиг. 2: Антиоксидантна активност на тестваните хидразони в различни моделни системи: (а) ABTS; (б) DPPH; и (в) жълтъчен хомогенат.

за най-високата концентрация – 0.09 mmol/L (Фиг. 2б). Ефектът е най-слаб за SBH < 5BrSBH < 4mSBH < 3mSBH. На Фиг. 2в са показани резултати, получени от антиоксидантното действие на хидразоните в системата на желязо-индуцирано окисление на жълтъчен хомогенат, определени на база получените ТБК-продукти. От тях се вижда, че хидразоните проявяват значителна АОА в тази моделна система, която е близка по състав до биологичните системи. Най-добри антиоксидантни свойства проявява SBH > 4mSBH > 3mSBH > 5BrSBH.

Сравнявайки АОА на метокси-производните, беше установена еднородност в промяната на ABTS радикалите и ТБК-продуктите – SBH > 4mSBH > 3mSBH, а редът в DPPH системата е обратен. Поведението на 5BrSBH е различно с различните системи. От направените експерименти по-добри антиоксидантни свойства има модификацията, в която метокси-заместителят в алдехидното ядро на SBH е на четвърта позиция – 4mSBH.

Рамановите спектри на веществата, снети в твърда фаза и стайна температура, са показани на Фиг. 3. При направения анализ спектърът условно беше разделен на няколко области от честоти. Най-интензивните ивици се наблюдават около 1600 cm^{-1} , следващите по интензивност са ивиците около 1300 cm^{-1} и типична за всички спектри е тясната ивица около 1000 cm^{-1} .

Ивиците, наблюдавани около 1600 cm^{-1} , се дължат на трептенията на двете ядра модове ν_{8a} и ν_{8b} [13]. Първият ν_{8a} се намира близо до 1600 cm^{-1} , вторият мод ν_{8b} е при по-ниската честота и е с по-слаб интензитет [13].



Фиг. 3: Раманови спектри на тестваните хидразони.

При по-високите честоти в дясно от двата пика се наблюдава много по-слаба по интензитет ивица, която е свързана с $\nu(\text{C}=\text{O})$. Нейната позиция се променя в спектрите на различните хидразони [14].

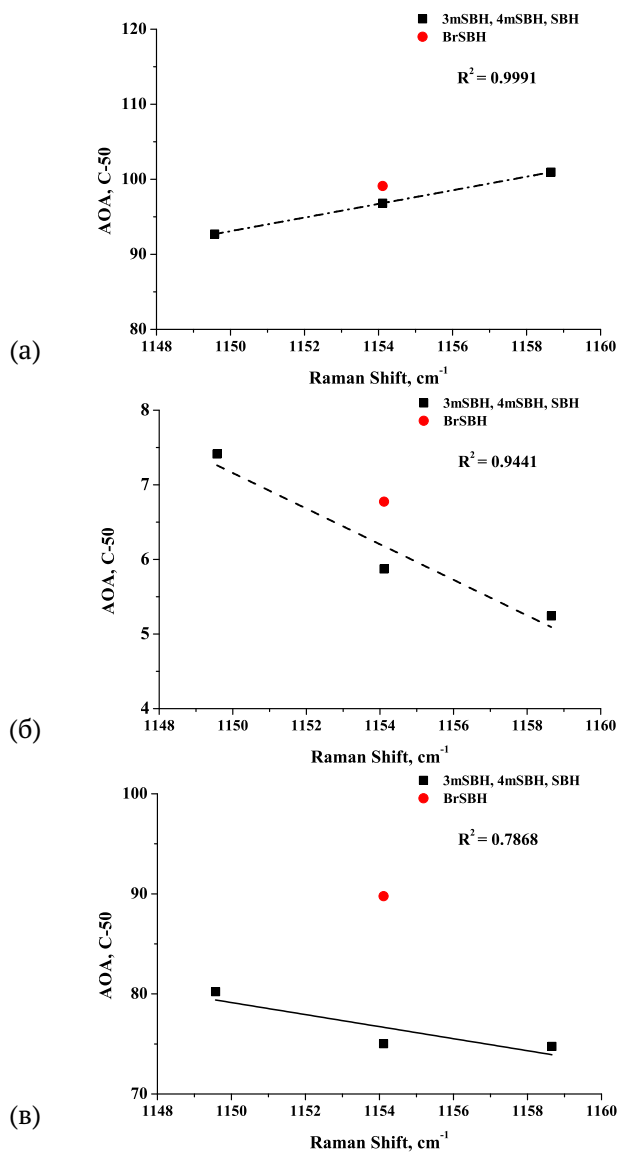
При всички хидразони се появява тясна ивица около 1000 cm^{-1} , която се свързва с $\nu(12)$ деформации на въглеродните атоми в равнината на пръстена. Тези трептения са активни в рамановия спектър само ако има замествания в бензеновото ядро [13]. Те се наблюдават при всички тествани вещества, като позицията на пика не се влияе нито от типа на заместване, нито от позицията на групата.

Според литературните данни трептенията, които касаят хидроксилната група и връзката ѝ с ядрото са разположени около 1300 cm^{-1} [14], като варират между отделните източници от 1025 cm^{-1} [15]; 1170 cm^{-1} [16]; $\nu(\text{C}-\text{O}) - 1290\text{ cm}^{-1}$ [17]. Трептенията, свързани с деформации на огъване в областта $1100-1400\text{ cm}^{-1}$ [16]; Фенол-О разтягане около 1200 cm^{-1} [18].

Тъй като АОА на вещества с циклични структури се определя от наличието на хидроксилни групи и техния брой, нашето внимание бе насочено в областта, където се появяват трептенията, свързани с ОН групата.

След сравняване на рамановите спектри на четирите вещества бяха потърсени области от честоти, които да корелират с АОА. Установихме, че добавянето на метокси група води до отместване на пика около 1160 cm^{-1} (SBH), където се очакват трептенията $\nu(\text{Ф}-\text{ОН})$ и $\delta(\text{O}-\text{H})$. В рамановия спектър трептенето, свързано с ОН групата, е с по-слаб интензитет, отколкото в ИЧ спектър [13], затова и използваните ивици не са много интензивни.

Отместването е към по-ниските честоти последователно при смяна на позицията с постоянна стъпка от 5 cm^{-1} (Фиг. 4). Бе установена линейна зависимост между позицията на пика и големината на АОА на хидразоните с метокси заместване. Най-добра е корелацията при DPPH ($R^2 = 0.99$) метода, а най-слаба за ТБК метода ($R^2 = 0.79$). Максимумът на ивицата на 5BrSBH е близка до тази на 4mSBH, въпреки че бромът води до по-силно преразпределение на електронната плътност в ядрото, към което е присъединен. Позицията на пика за 5BrSBH донякъде корелира с демонстрираната от веществото АОА в системите с DPPH и ABTS, която е по-малка от тази на 4mSBH, но близка по стойност. В системата с жълтъчен хомогенат такава корелация не се наблюдава – там показаната АОА е много по-малка за бром съдържащото съединение, отколкото за останалите хидразони. Тази система е много по-сложна, тъй като процесът на окисление преминава през множество етапи, в които веществото може да прояви антиоксидантните си свойства. Така по-слабата способност



Фиг. 4: Връзка структура–антиоксидантна активност.

за намаляване на радикалите води до по-силно изразена разлика в отчетената АОА в по-сложната система.

В заключение може да се предположи, че от предложените модификации наличието на метокси групата на 4-та позиция е съпроводено

Раманов анализ на новосинтезирани ароилхидразони ...

с по-добри АОС в тестваните системи и това съответства на преместване към по-високите честоти на ивицата, която се свързва с трептене на С-О във фенолното ядро. При метокси производните миграцията на максимума на тази ивица корелира с антиоксидантната активност на тези производни, като по-висока честота е свързана с по-висока АОА. Заместването в същото ядро с бром корелира слабо при прости системи, но няма връзка между тази модификация на SBH молекулата и енергията, с която се свързва тази ивица.

Литература

- [1] D.E. Pivonka, I. Noda (2007) in: *Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development*. Edited by Don E. Pivonka, John M. Chalmers and Peter R. Griffiths. John Wiley & Sons, Ltd, p. 4082.
- [2] B.Y. Suman Bala *et al.* (2013) *Int J Pharm Sci Rev Res* **18** 65.
- [3] G. Verma *et al.* (2014) *J. Pharm. Bioallied Sci.* **6** 69.
- [4] P.V. Bernhardt *et al.* (2007) *Dalton Trans* **30** 3232.
- [5] C.A. Perez, Y. Tong, M. Guo (2008) *Curr Bioact Comp* **4** 150.
- [6] B. Nikolova-Mladenova, *et al.* (2011) *Arzneimittel-forsch/Drug res* **61** 714
- [7] B. Nikolova-Mladenova, G. Momekov, D. Ivanov (2011) *Pharmacia* **LVIII** 41.
- [8] N. Halachev *et al.* (2007) *Annual Assen Zlatarov University* **XXXVI** 44.
- [9] N. Halachev *et al.* (2007) *Annual Assen Zlatarov University* **XXXVI** 52.
- [10] R. Re *et al.* (1999) *Free Rad. Biol, Med.* 1231.
- [11] P. Goupy *et al.* (2003) *J. Agric. Food Chem.* 615.
- [12] P. Bird, H. Draper (1984) *Methods Enzymol.* 299.
- [13] D.W. Mayo, F.A. Miller, R.W. Hannah (2004) ISBN: 978-0-471-24823-1 600
- [14] C. Colonna, J.P. Doucet, A. Cossé-Barbi (1995) *Trans. Met Chem.* **20** 338.
- [15] X. Lu *et al.* (2011) *Food Chem.* **129** 637.
- [16] R. Calheiros *et al.* (2008) *J. Raman Spec.* **39** 95.
- [17] A. Ertani *et al.* (2016) *Molecules* **8** 21.
- [18] J. Coates (2011) in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* eds R.A. Meyers Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 2188.