



**УНИВЕРЗИТЕТ
У НИШУ**

**Универзитетска
Библиотека
"Никола Тесла"**

**UNIVERSITY
OF NIŠ**

**University
Library
"Nikola Tesla"**



**ДИГИТАЛНИ
РЕПОЗИТОРИЈУМ
УНИВЕРЗИТЕТА
У НИШУ**

**Библиотека
Дисертације**

**DIGITAL
REPOSITORY
OF THE UNIVERSITY
OF NIŠ**

Ph.D. Theses



UNIVERZITET U NIŠU
Tehnološki fakultet u Leskovcu



Vesna D. Nikolić

**SINTEZA I KARAKTERIZACIJA ALICINA, NJегоVIH
DERIVATA I INKLuzionIH KOMPleKSA**

- doktorska disertacija -

Leskovac, 2003.

Mentor: Prof. dr Mihajlo Stanković
Tehnološki Fakultet, Leskovac

Članovi komisije: Prof. dr Dragan Cvetković
Tehnološki Fakultet, Leskovac

Prof. dr Radosav Palić
Prirodno matematički fakultet, Niš

Prof. dr Agneš Kapor
Prirodno matematički fakultet, Novi Sad

Prof. dr Milorad Cakić
Tehnološki Fakultet, Leskovac

Eksperimentalni deo doktorskog rada je urađen u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Instituta za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Instituta za fiziku Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Instituta Textilcolor AG, Schildstrasse 2, CH-9475 Sevelen u Švajcarskoj, instituta u Bremenu FRGermany Universitat Bremen, FB Geowissenschaften (Kristallographie) u Nemačkoj, Instituta za istraživanje i razvoj u fabrici boja i lakova "Duga" u Beogradu, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Sektora za istraživanje i razvoj i Sektora kontrole kvaliteta PJ medicina DD "Zdravlja" u Leskovcu.

Iskrenu i posebnu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Mihajlu Stankoviću koji je predložio temu rada, rukovodio i aktivno učestvovao u njenoj realizaciji.

Dugujem veliku zahvalnost prof. dr Draganu Cvetkoviću (Tehnološki fakultet, Leskovac), prof. dr Miloradu Cakiću (Tehnološki fakultet, Leskovac) i prof. dr Radosavu Paliću (Filozofski fakultet, Niš) koji su svojim interesovanjem i korisnim savetima učinili da rad bude kvalitetniji.

Izuzetno mi je bila draga i korisna pomoć prof. dr Agneš Kapor (Instituta za fiziku Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad) u izradi eksperimentalnog dela i diskusiji rezultata difrakcije X-zraka i koristim priliku da joj se od srca zahvalim za uloženi trud i utrošeno vreme. Takođe iskrenu i veliku zahvalnost dugujem prof. dr Miri Popsavin (Instituta za hemiju Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad) za nesebičnu pomoć u izradi eksperimentalnog dela koji se odnosi na NMR-analizu.

Dragocenu pomoć su mi pružili dr Jakov Stamenković i dr Vesna Ignjatović (Tehnološki fakultet, Leskovac), Sonja Roglić i Zoran Miladinović ("Duga", Beograd), Prof. dr Sonja Đilas i dr Jasna Čanadanović - Brunet (Tehnološki fakultet, Novi Sad).

Za punu podršku i razumevanje prilikom izrade ovog rada dugujem neizmernu zahvalnost svom suprugu i porodici.

Disertacija je rezultat istraživanja u okviru projekta koji finansira Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije: "Razvoj procesa, opreme i tehnologija za proizvodnju i standardizaciju bioaktivnih supstanci za farmaceutsku i kozmetičku industriju", Ev. br. MHT. 2.11.0029.B.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Alicin	3
2.2. Ajoeni i vinilditiini	6
2.3. Inkluzioni kompleksi	9
2.3.1. Ciklodekstrini	12
2.3.2. Urea	15
3. EKSPERIMENTALNI DEO	19
3.1. Materijali	19
3.2. Reagensi	19
3.3. Metode sinteze	20
3.3.1. Sinteza i prečišćavanje alicina	20
3.3.2. Sinteza inkluzionih kompleksa alicina	20
3.3.3. Sinteza ajoena	21
3.3.4. Sinteza vinilditiina	21
3.4. Fizičko-hemijske metode analize sintetisanih jedinjenja	22
3.4.1. Vidljiva spektroskopija (VIS)	22
3.4.2. Tankoslojna hromatografija (TLC)	23
3.4.3. Tečna hromatografija visokog pritiska (HPLC)	23
3.4.4. Termogravimetrijska analiza (TG)	25
3.4.5. Elektron spin rezonancija (ESR)	25
3.4.6. Gasna hromatografija - masena spektrometrija (GH-MS)	25
3.4.7. Ultraljubičasta spektroskopija (UV)	26
3.4.8. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija	26
3.4.9. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FT-IC)	27
3.4.10. Difrakcija X-zraka	27
3.4.11. Mikrobiološka ispitivanja	28
4. REZULTATI I DISKUSIJA	29
4.1. Alicin	29
4.1.1. Ispitivanje mehanizma sinteze i antioksidativne aktivnosti alicina	29
4.1.2. Ispitivanje kinetike sinteze alicina pomoću HPLC	35

4.1.3.	Fizičko-hemijska karakterizacija alicina	38
4.2.	Ajoeni	49
4.2.1.	Ispitivanje kinetike sinteze ajoena pomoću HPLC	49
4.2.2.	Razdvajanje strukturnih izomera ajoena i strukturna karakterizacija	52
4.2.2.1.	Tankoslojna hromatografija (TLC)	52
4.2.2.2.	Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GH-MS)	54
4.2.2.3.	Ultraljubičasta spektroskopija	58
4.2.2.4.	Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom	60
4.3.	Vinilditiini	61
4.3.1.	Ispitivanje kinetike sinteze vinilditiina pomoću HPLC ..	61
4.3.2.	Razdvajanje strukturnih izomera vinilditiina i strukturna karakterizacija	64
4.3.2.1.	Tankoslojna hromatografija (TLC)	64
4.3.2.2.	Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GH-MS)	66
4.3.2.3.	Ultraljubičasta spektroskopija	70
4.3.2.4.	Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom	72
4.4.	Inkluzioni kompleksi alicina	73
4.4.1.	Termogravimetrijska analiza	73
4.4.2.	Strukturna karakterizacija inkluzionih kompleksa alicina	80
4.4.2.1.	Ultraljubičasta spektroskopska analiza (UV)	80
4.4.2.2.	Infracrvena spektroskopija (IC) inkluzionih kompleksa	84
4.4.2.3.	Nuklearna magnetna rezonanca(NMR) inkluzionih kompleksa	89
4.4.2.4.	Difrakcija X-zraka (X-R difrakciona analiza)	97
4.5.	Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti alicina, inkluzionih kompleksa i njegovih derivata	107
5.	ZAKLJUČAK	114
6.	LITERATURA	117
7.	PRILOG	121
8.	PUBLIKOVANI NAUČNI RADOVI IZ OBLASTI DOKTORSKE DISERTACIJE	137
	BIOGRAFIJA	141

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA ALICINA, NJEGOVIH DERIVATA I INKLuzionIH KOMPLEKSA

IZVOD

Glavni nosioci farmakološkog dejstva belog luka (*Allium sativum* L.) su organsko-sumporna jedinjenja, od kojih je najvažniji alicin (dialil-tiosulfinat). Alicin ima širok spektar antibakterijskog i antifungalnog dejstva. Pokazuje značajan antioksidativni i antitumorni efekat. Nestabilan je organski molekul i u zavisnosti od spoljašnjih faktora transformiše se do derivata, koji su farmakološki aktivni. Najvažnija farmakološki aktivni derivati alicina su ajoeni i vinilditiini. Učestvuju u inhibiciji agregacije trombocita, u regulaciji sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, snižavaju nivo triglicerida i fosfolipida u krvi, imaju diuretska, antimikrobna, fibrinolitička i vazodilatatorna svojstva. Zbog toga su od izuzetnog značaja za farmaceutsku industriju.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je kinetika sinteze, određeni su optimalni kinetički parametri i definisan je mehanizam sinteze alicina i njegovih derivata. Sintetisani su kompleksi alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom, po tipu inkluzionih jedinjenja, radi njegove stabilizacije. Primenom savremenih metoda analize urađena je fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih jedinjenja. Na osnovu rezultata mikrobioloških ispitivanja utvrđen je niz mikrobiološke aktivnosti za sintetisana jedinjenja.

Rezultati do kojih se došlo u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju naučni doprinos u proučavanju novih farmakološko aktivnih jedinjenja, a koja mogu u skorije vreme imati i pun aplikativni značaj u farmaceutskoj industriji.

Ključne reči:

Alicin, ajoen, vinilditiin, molekulski inkluzioni kompleksi, β -ciklodekstrin, urea, mikrobiološka ispitivanja, kinetika, kinetički parametri, mehanizam sinteze.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ALLICIN, ITS DERIVATIVES AND INCLUSION COMPLEXES

ABSTRACT

The main carriers of the pharmacological activity of garlic (*Allium sativum* L.) are organosulfur compounds, the most important being allicin (diallyl thiosulfinate). Allicin has a wide range of antibacterial and antifungal effects. It shows significant antioxidative and antitumor effect. The organic molecule is very unstable and depending on the external factors it is transformed to pharmacologically active derivatives. The most important pharmacologically active allicin derivatives are ajoenes and vinylthiins. They take part in the inhibition of the thrombocyte aggregation, in the regulation of systolic and diastolic blood pressure, reduce the triglyceride and phospholipid levels, show diuretic, antimicrobial, fibrinolytic and vasodilative effect. Therefore, they are of great importance for the pharmaceutical industry.

In this dissertation the kinetics of synthesis were studied, the optimal kinetic parameters determined, and defined the mechanism of synthesis of allicin and its derivatives. For their stabilization, allicin complexes were synthesized with β -cyclodextrin and urea as inclusion complexes. The physical and chemical characterization of the synthesized compounds was done by up to date analysis methods. The microbiological studies results were used to determine the microbiological activities of the synthesized compounds.

The results obtained in this dissertation present a scientific contribution to the research of new pharmacologically active compounds that might, in the near future, find significant application in the pharmaceutical industry.

Keywords:

allicin, ajoene, vinylthiin, molecule inclusion complexes, β -cyclodextrin, urea, microbiological studies, kinetics, kinetic parameters, mechanism of synthesis.

U V O D

Beli luk (*Allium sativum* L.) je stara medicinska biljka. Glavni nosioci farmakološkog dejstva belog luka su organsko-šumporna jedinjenja od kojih je najvažniji alicin. Nastaje postmortalno, kao sekundarni metabolit, pod dejstvom aliinaze na genuini aliin u lukovici. U svežem belom luku različitog porekla sadržaj aliina je 0,09 do 1,15 %. Iako je farmakološki neaktivan, predstavlja polaznu supstancu za veliki broj sekundarnih reakcija u kojima se dobijaju farmakološki značajni proizvodi sa sadržajem šumpora. Primarni produkt ovih reakcija je alicin, koji zavisno od hemijske okoline i temperature spontano prelazi u sekundarne farmakološki aktivne proizvode [1- 5].

Alicin, tioestar sulfinske kiseline ili alil-tiosulfinat, ima širok spektar antibakterijskog, antifungalnog i antiviralnog dejstva [6 - 13]. Ispitivanja pokazuju da aliltiosulfinat ima antioksidativni i antitumorni efekat kao i hipoglikemičko dejstvo [10-12]. Ajoeni i vinilditiini su degradacioni proizvodi alicina u nepolarnom medijumu i farmakološki su aktivne supstance [6, 13]. Učestvuju u inhibiciji agregacije trombocita, ciklooksigenaze i inhibiciji 5-lipoksigenaze, u regulaciji sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, snižavaju nivo triglicerida i fosfolipida u krvi, imaju osobine diuretika, fibrinolitičku i vazodilatatornu aktivnost [13 - 18].

Različit sadržaj i velika nestabilnost bioaktivnih supstanci u fitopreparatima na bazi praha, ekstrakata i destilata lukovice sa različitih lokaliteta, različiti uslovi lagerovanja i obrade lukovice, onemogućuju precizno podešavanje sadržaja ovih supstanci u proizvodnji fitopreparata i njihovoj primeni u medicini [19].

Na osnovu navedenih prednosti i nedostataka farmakološki aktivnih principa belog luka od posebnog interesa je njihova sinteza. Ciljevi ovog rada su:

- ispitivanje kinetike sinteze (alicina, ajoena i vinilditiina) i određivanje optimalnih kinetičkih parametara ;
- izučavanje i definisanje mehanizama sinteze alicina, ajoena i vinilditiina;
- preparativna sinteza, prečišćavanje i karakterizacija alicina, ajoena i vinilditiina;
- sinteza i karakterizacija kanalskih inkluzionih kompleksa alicina sa ureom i β -ciklodekstrinom značajnih za primenu u farmaciji;
- ispitivanje mikrobiološke aktivnosti alicina, ajoena, vinilditiina i kanalskih inkluzionih kompleksa alicina;
- primena dobijenih jedinjenja i kompleksa za izradu farmaceutskih preparata

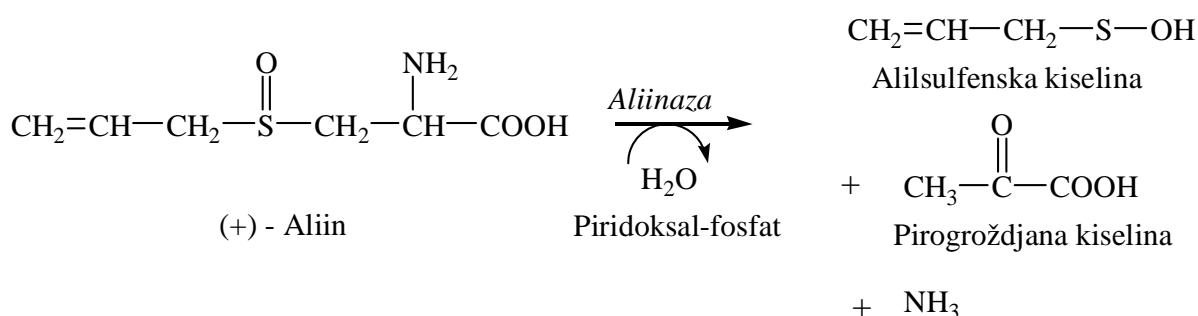
Za ispitivanja su korišćene različite metode i to: sinteze organskih molekula; razdvajanja i identifikacije; za karakterizaciju, određivanje strukture i mehanizma sinteze; termogravimetrijska i mikrobiološka difuziona disk metoda.

O P Š T I D E O

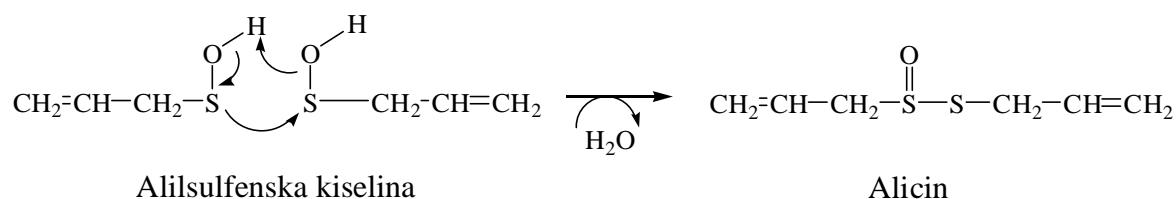
2.1. ALICIN

Alicin je tioestar sulfenske kiseline ili alil-tiosulfinat. U čistom obliku je bezbojna do prozračno slabo žuta uljasta tečnost sa tipičnim mirisom svežeg belog luka (*Allium sativum* L.) [6]. Alil-tiosulfinat je farmakološki najvažnija i najaktivnija supstanca u svežem vodenom ekstraktu belog luka [3, 15, 20].

Biosinteza *in vitro*. Alicin nastaje enzimskom transformacijom, farmakološki neaktivne aminokiseline, aliina, [(+)-S-alil-L-cistein-sulfoksid], pod dejstvom aliinaze. Zbog prisustva aliina i aliinaze u odvojenim kompartmentima (delovima) [21] u češnjevima belog luka, lančana reakcija počinje, posle razaranja ćelija, stvaranjem kompleksa aliina sa enzimom aliinazom u prisustvu vode. Kompleks aliin-aliinaza je nestabilan i uz učešće piridoksalfosfata podleže dehidraciji i transformaciji do alilsulfenske kiseline, pirogroždane kiseline i amonijaka [6]:



Alilsulfenska kiselina je na sobnoj temperaturi nepostojana i veoma reaktivna. Dva molekula alilsulfenske kiseline se spontano kondenzuju uz eliminaciju vode do alicina:



Ove enzimске transformacije se na sobnoj temperaturi završavaju za 10-15 minuta. Aliinaza, pored aliina, katalizuje i transformacije S-etil-cisteinsulfoksida i S-propil-L-cisteinsulfoksida, ali je njena aktivnost u ovim transformacijama 16,5 % odnosno 9,8 % od aktivnosti pri katalizi transformacije aliina. Optimalna pH-vrednost katalitičke aktivnosti aliinaze je 6,5 a optimalna temperatura je 33 °C. Energija aktivacije razgradnje aliina iznosi 14,7 kJ/mol [19]. Transformacija aliina do alicina pomoću ovog enzima može se inhibirati i do 90 % rastvorom hidroksilamin-sulfata (50 μmol/dm³) i dodatkom rotenona (10 μmol/dm³). Rotenon pri tome blokira flavinske komponente enzimskog proteina. Pored flavina aliinaza sadrži i piridoksal-5-fosfat kao koenzim. Izuzetno je osetljiva na dejstvo kiselina, sastoji se iz dve identične polipeptidne jedinice i ima molekulsku masu 108000 daltona [19].

Sinteza. Zbog visoke nestabilnosti alicina, otežana je njegova izolacija i determinacija. Teško se može dobiti komercijalni standard, zbog čega je, poslednjih decenija, u literaturi dato više postupaka o njegovoj sintezi. Najveći broj postupaka sinteze alicina odnosi se na oksidaciju alil-disulfida vodonikperoksidom u kiseloj sredini [4, 22 - 25], oksidaciju alil-disulfida m-hlor-perbenzoevom kiselinom u hloroformu [26] i obradu dihlormetanskog rastvora alil-disulfida magnezijum-monoperoksi-hidratom u prisustvu amonijum-butil-sulfata [27]. Za sve postupke karakteristično je da se izvode na niskim temperaturama (0 °C do sobne temperature) i da se u zavisnosti od primenjenog postupka prečišćavanja dobija alicin različitog stepena čistoće.

Farmakologija. Farmakološka svojstva bioaktivnih sastojaka belog luka i njegovh aktivnih principa nisu jednoznačno određena i mogu se klasifikovati u više grupa [28]:

- antibiotska i antiseptička svojstva;
- regulacija intestinalne flore;
- sredstvo protiv svih vrsta crevnih parazita, posebno pantljičare i *Trichophyton verricosum*;
- stimulacija i regulacija svih životnih funkcija, posebno jetre i endokrinih žlezdi (tiroidna i nadbubrežna);
- antidijabetsko dejstvo;

- antimaligno dejstvo, posebno u digestivnom traktu, uključujući tu i preventivno dejstvo od autointoksikacije i stimulaciju sekrecije želučanog soka kao dezinficijenta celog organizma;
- stimulatívno dejstvo na cirkulacioni sistem krvi odnosno antihipertenzívno, antiarteriosklerotično i antiholesterično dejstvo.

Alicin ima širok spektar antimikrobne aktivnosti na većinu bakterija, virusa, gljivica i nekih parazita [8 - 10]. Rezultai ispitivanja iz 1944 godine pokazuju da alicin inhibira rast bakterija *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus brucella* i *Vibrio* vrsta u malim koncentracijama [22, 29]. Sa kliničkog aspekta je najvažnija inhibicija *Candida albicans* koja je dokazana ispitivanjima *in vitro* i ispitivanjima na životinjama. Pokazalo se da alicin ima veći potencijal od nistatina i drugih antimikotika [8, 30 - 34]. Virucidni efekat *in vitro*, svežeg belog luka, alicina i drugih jedinjenja belog luka koja sadrže sumpor je utvrđena prema *Herpes simplex* tip 1 i 2, *Parainfluenza virus* tip 3, *Vaccinia virus*, *Vesicular stomatitis virus* i *Human rhinovirus* tip 2. Niz virucidne aktivnosti je [35]:

alicin > alil-metil-tiosulfinat > metil-alil-tiosulfinat

Sem širokog opsega dokazanih antimikrobnih dejstava alicin ima važnu kliničku primenu u prevenciji kancera i kardiovaskularnih bolesti, kao i dobru antioksidativnu aktivnost ("hvatač" slobodnih radikala) [10 - 12].

Brojni istraživački nalazi nedvosmisleno pokazuju da nema sumnje o kliničkom dejstvu belog luka i njegovih fitopreparata ukoliko su propisno pripremljeni. Kada su u pitanju sintetički aktivni principi belog luka, kao formulacije humanog leka, postavlja se novo pitanje, važno za terapeutsku primenu svakog leka: dejstvo i sigurnost primene? Naime, postoji stara izreka "Kada se tvrdi da jedna supstanca nema sporednih dejstava, onda postoji sumnja da nema ni glavnog dejstva". Ispitivanja akutne toksičnosti alicina pokazala su da je LD₅₀-vrednost 60 mg/kg i.v., odnosno od 120 mg/kg s. k. kod pacova [36]. Uzimanje visokih doza alicina može dovesti do niza poremećaja u organizmu. Ispitivanja pokazuju da može doći do povećane aktivnosti lipaze jetre i α -glukan-fosforilaze ili smanjenja aktivnosti glukozo-6-fosfataze odnosno do hepatotoksičnosti. Velike doze alicina mogu dovesti do potpunog zaustavljanja rasta, poremećaja rada štitne žlezde, hiperplarije (gušavosti), alergijskih reakcija na koži i sluzokoži i gušenja. Kod pacijenata sa jakim krvarenjima pojačava krvarenje [36]. Dokumentovane su u literaturi i interakcije alicina sa drugim lekovima. Posebno je opasna primena alicina kao leka kod pacijenata koji su pod stalnom terapijom za održavanje života i

vitalnih funkcija (dijabetičari, pacijenti sa nesređenim krvnim pritiskom i povišenim holesterolom u krvi, pacijenti oboleli od malignih oboljenja i sa organskim poremećajem digestivnog trakta). Prema tome odgovor na postavljeno pitanje je: alicin se može koristiti u humanoj medicini kao lek sa naznačenim kontraindikacijama [36]:

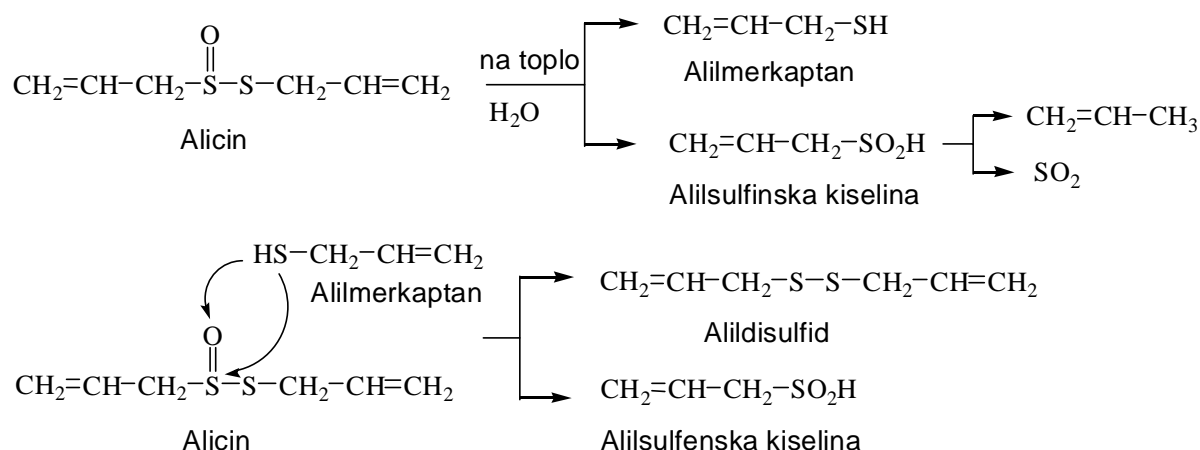
- alergije od *allium* vrsta
- poremećaj vitalnih funkcija
- oboljenja želuca i creva
- nekontrolisana krvarenja
- odbojnost prema mirisu

2.2. AJOENI I VINILDITIINI

Alicin je nestabilan i u zavisnosti od spoljašnjih faktora može da se transformiše u degradacione proizvode koji mogu i ne moraju biti farmakološki aktivni [37]. Biološki najaktivniji degradacioni proizvodi alicina su ajoeni i vinilditiini.

Degradacioni proizvodi alicina. Destilacijom vodenom parom vodenog homogenata belog luka, u kome je glavno biološki aktivno jedinjenje alicin, dobija se etarsko ulje belog luka, koje je kompleksna smeša alkil (alkenil) mono-, di- i polisulfida sa najvećim sadržajem di-, tri- i tetrasulfida. Njihov udeo u ukupnim sulfidima je 92 %. Ulje ne sadrži ajoene i vinilditiine [15, 38, 39].

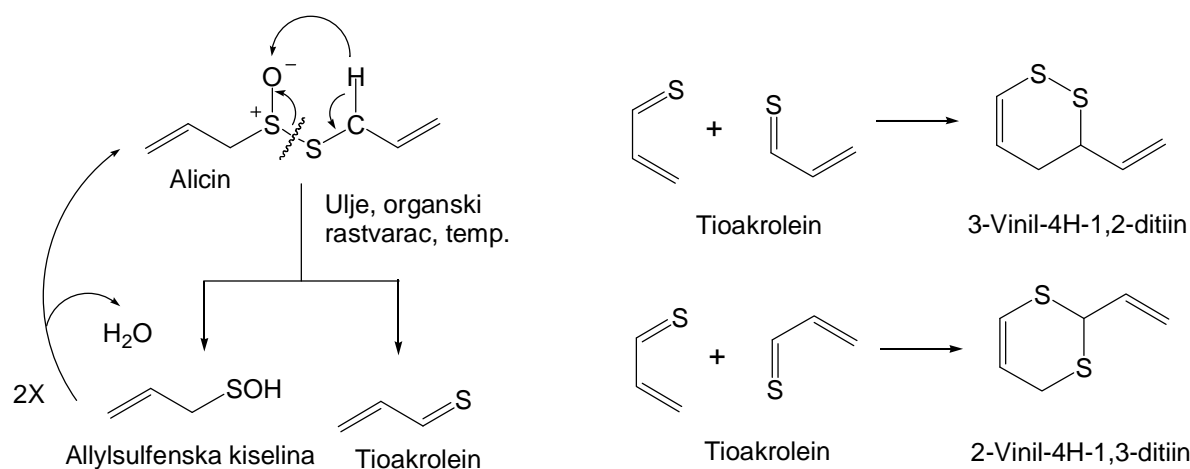
U toku destilacije vodenom parom alicin se prevodi najpre u alilmerkaptan i alilsulfinsku kiselinu, dva vrlo reaktivna proizvoda. Alilsulfinska kiselina se dalje raspada do 1-propena i sumpordioksida, a neizreagovali molekuli alicina se tioalilizacijom sa nastalim aliltiolom (alilmerkaptanom) prevode u alildisulfide i alilsulfensku kiselinu. Faze tioalilizacije, eliminacije i redukcije mogu se ponoviti više puta pri čemu nastaju sulfidi sa dužim lancima (trisulfidi, tetrasulfidi i polisulfidi) koji daju neprijatan miris etarskom ulju belog luka. Mehanizam ovih transformacija [6] je:



Transformacije alicina i drugih tiosulfinata u ulju ili organskim rastvaračima su dosta izučavane u literaturi [6]. Produkti koji nastaju iz alicina u uljanim maceratima na blago povišenim temperaturama su uglavnom vinilditiini (70 %), neki dialk(en)il-sulfidi (18 %) i ređe ajoeni (12 %) [15]. Stvaraju se u većim količinama inkubacijom alicina nekoliko časova u organskim rastvaračima na 37 °C ili na sobnoj temperaturi. Ova transformacija je najbrža u nepolarnim rastvaračima kao što je heksan ili sojino ulje. Pod tim uslovima ajoeni se vrlo malo proizvode.

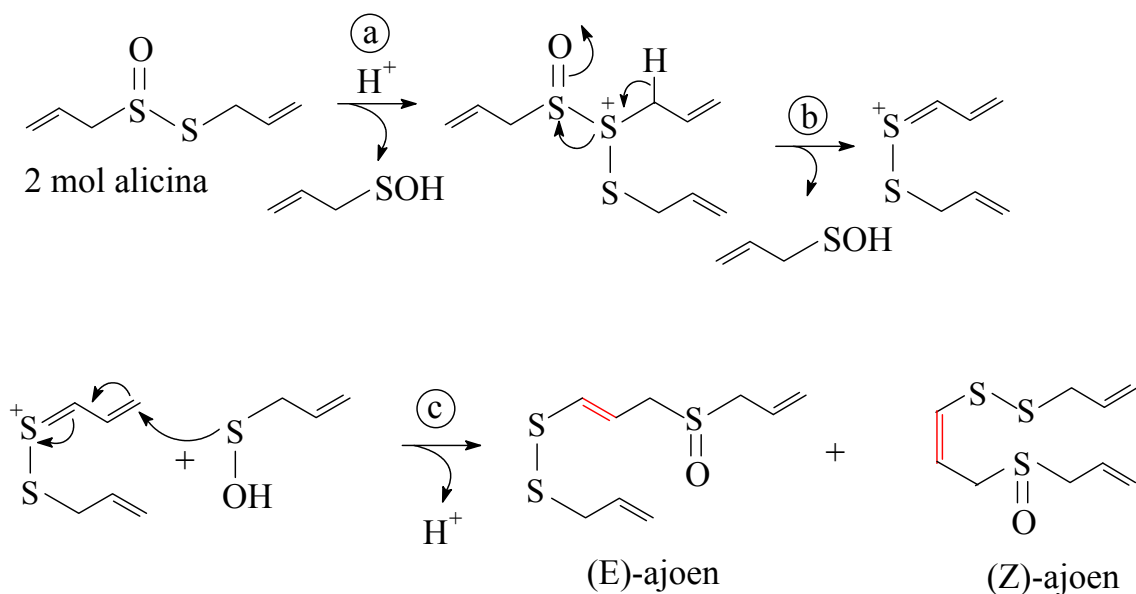
Prema Block-u i saradnicima [40] vinilditiini (2-vinil-4H-1,3-ditiin i 3-vinil-4H-1,2-ditiin) nastaju iz tioakroleina, koji nastaje u nepolarnoj sredini iz tiosulfinata sa sadržajem aliltio-grupe. Poznato je da alicin, alil-metil-tiosulfinat i alil-1-propenil-tiosulfinat koji sadrže aliltio-grupu, daju derivate vinilditiina inkubacijom u heksanu na 45 °C u toku 1 časa [15].

Mehanizam razgradnje alicina u ulju ili slabo polarnim organskim rastvaračima na blago povišenoj temperaturi je [6, 41]:



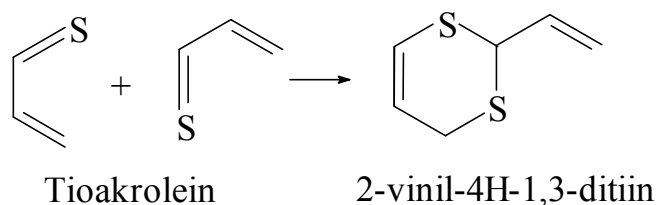
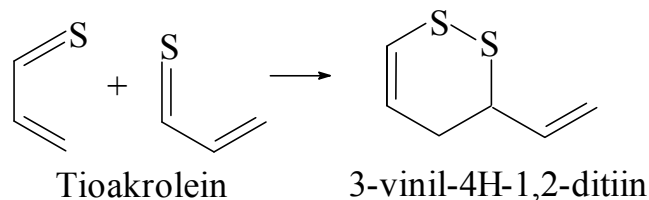
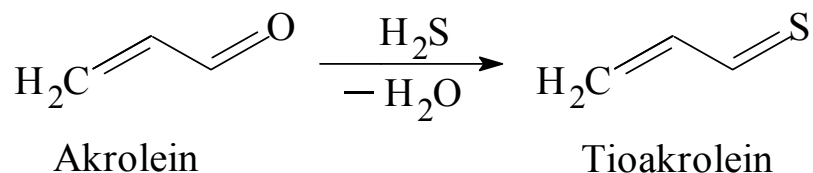
Alicin se u ulju ili slabo polarnom organskom rastvaraču pri blagom zagrevanju najpre transformiše u alilsulfensku kiselinu i tioakrolein. Alilsulfenska kiselina je nestabilna i samokondenzacijom se prevodi ponovo u alicin uz izdvajanje molekula vode. Samokondenzacija dva molekula tioakroleina daje 2-vinil-4H-1,3-ditiin, kao glavni proizvod i 3-vinil-4H-1,2-ditiin, kao sporedni proizvod. Pored toga nastaju i razni drugi sulfidi [6].

Ajoeni su takođe degradacioni produkti alicina i najviše su prisutni u hloroformskim i uljnim ekstraktima belog luka ili prahu belog luka koji je pomešan sa vodom. Javljaju se u obliku izomera (E) i (Z), pri čemu je (E)-ajoen zastupljen obično oko dva puta više. U svežim uljnim maceratima belog luka najpre nastaje (Z)-izomer koji postepeno izomerizuje do (E)-izomera. Prisutni su i metil-derivati ajoena [20]. Mehanizam razgradnje alicina do ajoena dao je Block sa saradnicima [6, 40]. Iz tri molekula alicina mogu nastati dva molekula ajoena, pri čemu se celokupni proces odvija u tri faze: tioalilizacija alicina u kiseljoj sredini (a), eliminacija (b) i ponovno kondenzovanje (c) alilsulfenske kiseline pri čemu dolazi do stvaranja po jednog molekula *cis*- i *trans*-ajoen [6, 40]:



Proizvodi transformacije alicina u vodenim sistemima su znatno manje istraženi. Poznato je, da je alicin u vodenom rastvoru pri niskoj pH-vrednosti i niskoj temperturi stabilan više sati. Stabilnost alicina u vodenim rastvorima i u krvi na sobnoj temperaturi je vrlo mala (manje od 10 min). Degradacioni produkti alicina u vodenim rastvorima nisu potpuno ispitani [6].

Sinteza. Vinilditiini se mogu sintetisati i iz akroleina i vodoniksulfida prema reakciji koju je predložio Besllin [42]:



Farmakologija. Ajoeni i vinilditiini imaju visoku biološku aktivnost [6, 13]. Učestvuju u inhibiciji agregacije trombocita, ciklooksigenaze i inhibiciji 5-lipoksigenaze, u regulaciji sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, snižavaju nivo triglicerida i fosfolipida u krvi, imaju osobine diuretika, fibrinolitik i vazodilatatornu aktivnost [13 - 18].

Akutno-toksična dejstva ajoena i vinilditiina nisu potpuno izučena. Citotoksičnost ajoena testirana je *in vitro* na brojnim vrstama ćelija (ljudski fibrioblasti, ćelije bubrega kod hrčka i dr). LD₅₀-vrednost je u granicama od 2-50 mg/kg [36].

2.3. INKLUZIONI KOMPLEKSI

Inkluzioni kompleksi, predstavljaju posebnu grupu tzv. "neklasičnih" kompleksa koji se formiraju pod dejstvom mehaničkih faktora, tj. faktora "prostorne inkluzije" komponenata kompleksa. Komponente inkluzionih kompleksa su molekuli "domaćina" i molekuli "gosta". Molekuli "domaćina" su jedinjenja koja u svojoj kristalnoj rešetki ili svojim agregatima imaju dovoljno velike šupljine u koje se mogu ugraditi molekuli druge komponente (molekuli "gosta"). Nastajanje inkluzionih kompleksa zavisi od veličine i oblika molekula "gosta" i od dimenzija šupljina koje formiraju agregati

molekula "domaćina". Hemijska priroda reaktanata u procesu građenja inkuzionih kompleksa ima sporednu ulogu. Osim slabih Van der Waals-ovih privlačnih sila, vodoničnih veza i polarnih interakcija, ne postoje hemijske veze, bilo interatomskog ili molekulskog tipa. Zavisno od prirode šupljina molekula "domaćina", postoje kavezasta i kanalska inkluziona jedinjenja [43]. Prednosti koje pruža ova vrsta kompleksa u farmaceutskoj industriji u izradi lekovitih formi, sastoje se u sledećem [44]:

- povećanje ili smanjenje rastvorljivosti i brzine rastvaranja kompleksa u odnosu na čistu aktivnu supstancu, zavisno od prirode molekula "domaćina" i "gosta" ;
- bolja biološka raspoloživost leka;
- promena reaktivnosti aktivne supstance zaštitom nekih funkcionalnih grupa;
- produžen vek trajanja leka (poboljšanje fizičko-hemijske stabilnosti);
- smanjenje kontraindikacije leka;
- korekcija neprijatnog mirisa i ukusa;
- uniformisanje sadržaja aktivne supstance u leku;

U formulacijama lekovitih formi tipa inkluzionih kompleksa, najviše su u primeni kompleksi aktivnih supstanci i ciklodekstrina . Aktivne supstance koje se uključuju u šuplinu molekula "domaćina", obično se odlikuju sledećim karakteristikama [44]:

- slabo su rastvorljive a njihova biološka raspoloživost je nekompletna;
- vreme postizanja efektivnog nivoa u krvi je suviše dugo;
- zbog male rastvorljivosti se ne mogu pripremiti vodeni rastvori za injekcije;
- pogodnije su za izradu leka u formi tableta ili formi praha;
- kao čiste u formi leka su hemijski i fizički nestabilne u odnosu na kompleks;
- imaju više polimorfnih kristalnih formi;
- imaju neprijatan miris, gorki ili iritirajući ukus;
- nisu homogene po sadržaju u masi;
- nekompatibilne su sa drugim komponentama leka;
- imaju veći broj kontraindikacija u odnosu na kompleks;
- imaju veću toksičnost u odnosu na kompleks.

U izradi inkluzionih kompleksa primenjuju se različite metode [44].

Dobijanje tečnih kompleksa. Izrada kompleksa u rastvoru se odvija dodavanjem povećane količine komponente gosta u vodeni rastvor komponente domaćina. Formirana suspenzija se uravnotežava (oko sedam dana na određenoj temperaturi) zatim filtrira ili centrifugira da se formira bistar rastvor kompleksa gost-domaćin.

Dobijanje čvrstih kompleksa. Za pripremu čvrstih kompleksa, vodeni rastvori inkluzionih kompleksa se uparavaju, suše sprej-postupkom ili liofilizacijom. Mogu se primeniti i druge metode kao što su: koprecipitacija, neutralizacija, metoda gnječenja i metoda utiskivanja. Po metodi gnječenja, komponenta koja se inkluduje, dodaje se gustoj mešavini vode i teško rastvorne komponente domaćina (kao što je β -ciklodekstrin). Mešavina se homogenizuje, tako da se dobije gusta pasta, koja se potom suši.

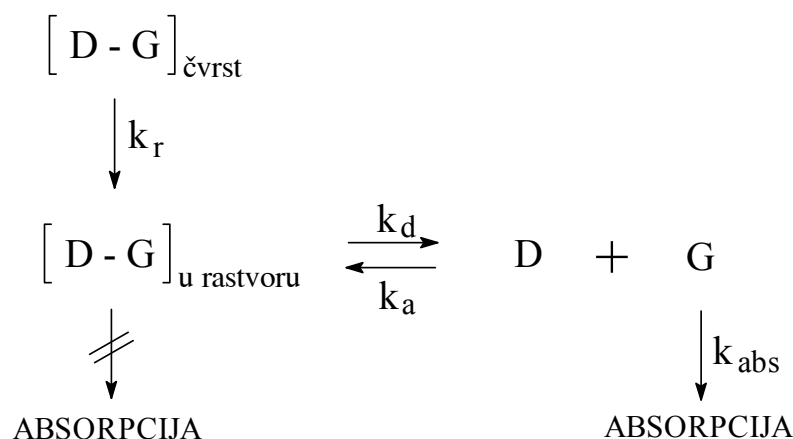
Koprecipitacija je, takođe, jedna od metoda izrade čvrstih inkluzionih kompleksa sa organskim rastvaračima, koji služe kao sredstvo za taloženje. Zbog toga što ponekad organski rastvarač može da učestvuje u kompleksaciji ovaj metod se znatno manje primenjuje.

Metodom neutralizacije pripremaju se čvrsti kompleksi koji jonizuju. Prema ovoj metodi gostujuća komponenta se rastvara u kiselom (ako je bazna) ili u baznom (ako je kisela) vodenom rastvoru komponente domaćina. Rastvorljivost gostujuće komponente se tada smanjuje podešavanjem pH-vrednosti, pri čemu se forsira taloženje kompleksa iz rastvora tj. formira se nejonizovana aktivna supstanca.

Čvrsti inkluzioni kompleksi mogu se pripremati i metodom utiskivanja. Metod se sastoji u pripremi fizičke smeše gostujuće komponente i komponente domaćina, koja se potom zagreva u zatvorenom sudu na povišenoj temperaturi (do 90 °C).

Svi kompleksi uopšte, uključujući i inkluzione komplekse, okarakterisani su konstantom stabilnosti (K_s) ili konstantom disocijacije (K_d), koje su merilo fizičko-hemijskih promena komponente koja je kompleksirana odnosno inkludovana [45]. Kod inkluzionih kompleksa koji se koriste u formulacijama leka posebno je važno odrediti konstantu stabilnosti kompleksa, kao merila njihovog raspadanja posle rastvaranja u želudačnom i crevnom soku, kad se lek uzima oralno. Rastvoreni kompleks $[D-G]_{u\text{ rastvoru}}$ je u ravnoteži sa disociranim kompleksom, molekulom domaćinom, D, i nekompleksiranim gostujućim, G, molekulima. Ako je vrednost konstante stabilnosti kompleksa mala, može se očekivati veoma brza resorpcija leka. Kod veoma stabilnih kompleksa, ravnoteža je pomerena u pravcu formiranja kompleksa, konstanta stabilnosti kompleksa je velika i resorpcija aktivne

komponente je tada veoma mala [44 - 46]. Podešavanjem uslova za smanjenje ili povećanje konstante stabilnosti kompleksa, može se regulisati resorpcija leka. Šema farmakokinetičkog modela ponašanja inkluzionog kompleksa, u formulaciji leka posle oralne primene je:



k_r - konstanta brzine rastvaranja inkluzionog kompleksa,

k_d - konstanta brzine disocijacije inkluzionog kompleksa u rastvoru na sastavne komponente,

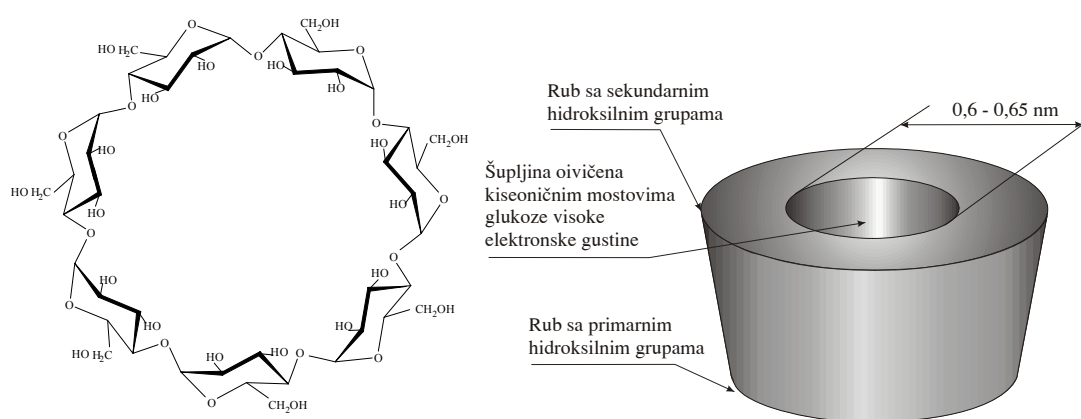
k_a - konstanta brzine asocijacije tj. stvaranja kompleksa u rastvoru,

k_{abs} - konstanta brzine apsorpcije molekula gosta tj. leka.

2.3.1. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su otkriveni pre sto godina, a njihova struktura u prvoj polovini ovoga veka [44]. To su prirodna jedinjenja sa izvanrednim mogućnostima primene u farmaceutskoj industriji. Mogu se primeniti kao novi nosači i punioci leka ili u kompleksiranju lekovitih supstanci (slabo rastvorne, neprijatnog mirisa i lako degradibilne supstance) po tipu inkluzionih kompleksa uključujući sve forme aplikacije leka (lokalno, oralno, parenteralno) [44]. Ciklodekstrini su neredukujući oligosaharidi cilindričnog oblika koji podseća na zarubljenu kupu. U zavisnosti od broja glukopiranoznih jedinica koje su povezane α -(1→4) glukozidnom vezom mogu biti ciklomaltoheksoze (sa šest glukopiranoznih jedinica, α -ciklodekstrin), ciklomaltoheptoze (sa sedam glukopiranoznih jedinica, β -ciklodekstrin) i ciklomaltooktoze (sa osam glukopiranoznih jedinica, γ -ciklodekstrin) [48]. Analizom pomoću X-zraka dokazano je da su kod ciklodekstrina glukozidni ostaci nalaze u termodinamički stabilnijoj konformaciji stolice, zbog toga što

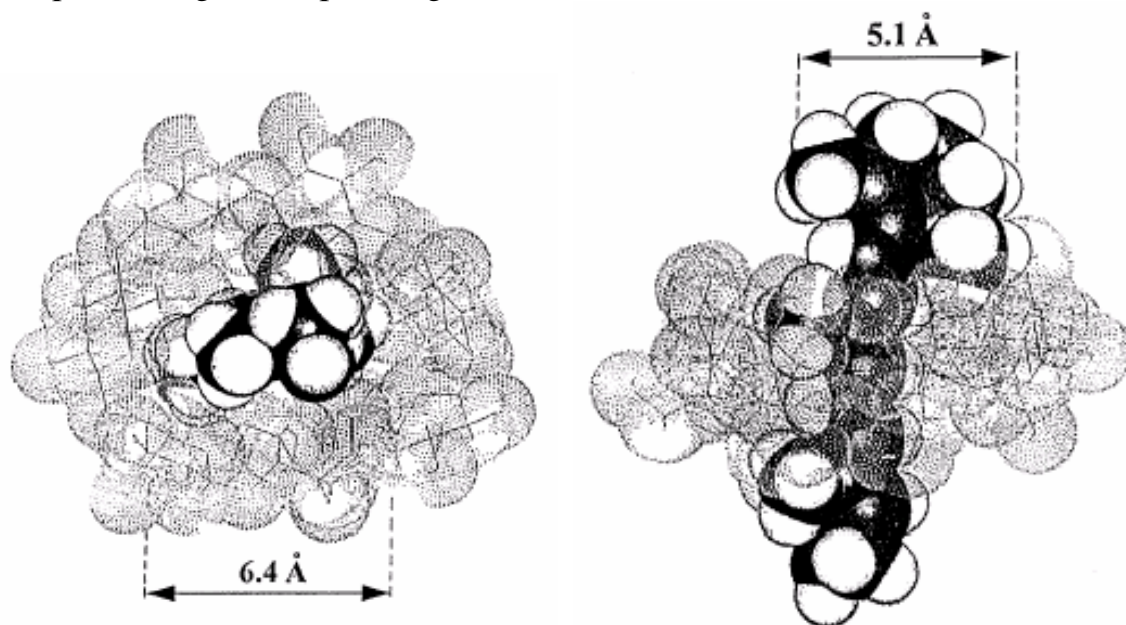
su svi supstituenti u ekvatorijalnom položaju. Kao posledica ovakve konformacije, sve sekundarne hidroksilne grupe (OH-2 i OH-3) su locirane na jednoj strani cilindričnog molekula, dok su sve primarne hidroksilne grupe (OH-6), sa druge strane torusa molekula. Ovakva pozicija hidroksilnih grupa na obe strane šupljine pokazuje da je njegova šira strana okružena sa sekundarnim hidroksilnim grupama tj. da je spoljna strana ciklodekstrina hidrofилna i dozvoljava rastvaranje u vodenoj sredini. S druge strane unutrašnja šupljina ciklodekstrina mnogo je hidrofobnija po karakteru, zbog toga što se slobodni elektronski parovi kiseonika sa glikozidnog kiseoničnog mosta nalaze u unutrašnjosti šupljina. Strukturna formula i šematski prikaz molekula ciklodekstrina dat je na primeru β -ciklodekstrina [44, 49]:



Slika 1 Strukturna formula i šematski prikaz izgleda molekula β -ciklodekstrina

Osim osnovnih ciklodekstrina sve češće se u farmaceutskoj industriji koriste derivati ciklodekstrina. Derivati mogu biti pripremljeni hemijskom ili enzimskom reakcijom i prema prirodi supstituconih grupa mogu se klasifikovati na sledeći način: alkilovani, hidroksialkilovani, esterifikovani, šećerni, jonski i polimerizovani derivati ciklodekstrina. Glavni razlog za modifikacije osnovnih ciklodekstrina je promena njihovih neželjenih fizičko-hemijskih osobina kao i smanjenje njihove parenteralne toksičnosti [44]. Svi ciklodekstrini i njihovi derivati grade kanalska inkluziona jedinjenja tj. takozvana "molekulska inkluziona jedinjenja". Kod ovih jedinjenja, jedan jedini molekul može u unutrašnjosti svog velikog prstena (šupljina kanala prečnika 0,5-0,9 nm) da primi molekul druge komponente. U kristalnom stanju su pojedini spiralno uvijeni molekuli ciklodekstrina raspoređeni jedan iznad drugog i obrazuju duži kanal u koji se mogu smestiti molekuli raznih

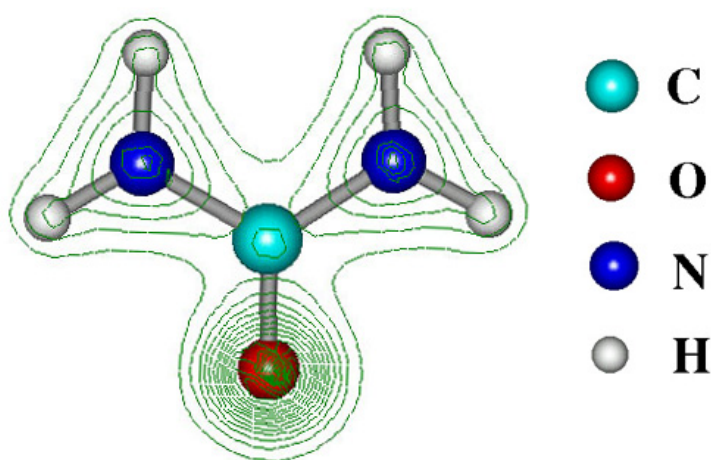
organskih supstanci što predstavlja takozvano molekularno inkapsuliranje [43, 44]. Brojni su primeri molekulskih inkluzionih kompleksa ciklodekstrina i njihovih derivata naročito sa raznim vrstama lekova. U radu [50] data je kompleksacija ampicilina sa β -ciklodekstrinom čime je eliminisan jedan nedostatak ampicilina, da kada se nađe sam u vodenom rastvoru polimerizuje. Kod većine lekova zbog njihove loše rastvorljivosti, bioraspoloživost odnosno resorpcija lekovite supstance je mala i zbog toga je ograničena njihova primena. Takav je slučaj sa nekim antibioticima kao što su polimiksin [46] i tetraciklin-hidrohlorid [51]. Kompleksiranjem naproksena, nesteroidnog antiinflamatornog agensa koji deluje i kao analgetik, sa β -ciklodekstrinom povećava se njegova resorpcija, a samim tim i njegova bioraspoloživost [52]. Heptacijan, lokalni anestetik ima bolju aktivnost kada je kompleksiran sa β -ciklodekstrinom, jer su mu kompleksiranjem poboljšane fizičko-hemijske osobine: rastvorljivost, brzina rastvaranja i membranska propustljivost [53]. Meklozin hidrohidratu [54], nikardipinu [55] i retinolu [56] povećana je hemijska i fotohemijska stabilnost kada se kompleksiraju po tipu inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima. Na slici 2 dat je model inkluzionog kompleksa retinola (vitamina A) sa β -ciklodekstrinom u dva profila: čeon i bočni. Na slici se jasno uočava, da je za formiranje inkluzionog kompleksa neophodno da prečnik molekula gosta odgovara prečniku šupljine molekula domaćina [56], što je u saglasnosti sa teorijom, po kojoj su za formiranje inkluzionih kompleksa odgovorni pre svega mehanički faktori.



Slika 2 Izgled molekulskog kanalskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrina i retinola (vitamina A).

2.3.2. Urea

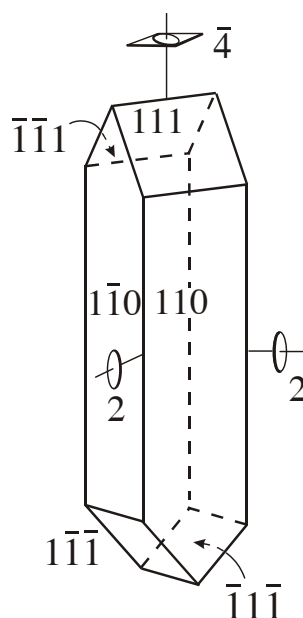
Urea ili karbamid je najvažniji derivat ugljenične kiseline (OHCOOH) i predstavlja njen diamid (H_2NCONH_2). Prvi put je izolovana iz urina 1773. godine ali nije bila okarakterisana niti imenovana. Prvi ju je sintetisao John Davy 1811. godine, ali je nije identifikovao tako da zasluga za sintezu pripada Woehleru. On je 1828. godine amonijum cijanat hidrolizovao uz zagrevanje do karbaminske kiseline pri čemu ona dalje reaguje sa amonijakom gradeći karbamid. Urea je našla primenu u proizvodnji urea-formaldehidnih polimera, u sintezi proteina za stočnu hranu i u poljoprivrednoj industriji kao đubrivo. Male količine karbamida koriste se u sintezi lekova (pogotovo u sintezi depresiva, barbiturata i anestetika, tiobarbiturata) [57]. Zbog svojih karakterističnih osobina (nelinearne optičke osobine, mogućnost građenja H-veza preko karbonilne grupe i lakog kompleksiranja sa drugim jedinjenjima) urea je predmet intenzivnih teorijskih i eksperimentalnih proučavanja u poslednje tri decenije. Raspodela elektronske gustine u molekulu uree određena je primenom visoko precizne metode difrakcije X-zraka (slika 3) [58].



Slika 3 Raspodela elektronske gustine valentnih elektrona u planarnom molekulu uree.

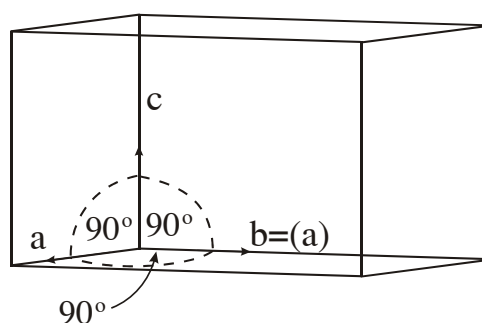
Kristalna struktura karbamida je dobro poznata i dosta izučavana u literaturi [59 - 61]. Kristali uree su prizme sa kvadratnim odsečcima (slika 4). Sva četiri odsečka grade iste uglove sa pljosnima prizme. Ako se premesti ravan sa donje strane ($\bar{1}\bar{1}\bar{1}$) na vrh prizme njenom rotacijom za 90° oko jedne tačke u centru kristala, dobija se položaj (111). Na ovaj način se dobijaju sva

četiri odsečka na oba kraja prizme. Ova osa predstavlja osu četvrtog stepena rotacije inverzije ili inverzionu osu četvrtog stepena [62].



Slika 4 Inverzionna osa simetrije kod kristala karbamida

Kod kristala koji poseduju osu rotacije četvrtog stepena jedinična ćelija je pravouglna sa dvema ivicama (a i b) jednakih dužina i sa trećom ivicom (c), koja je u isto vreme i rotaciona osa četvrtog stepena, nejednake dužine (slika 5) [62].

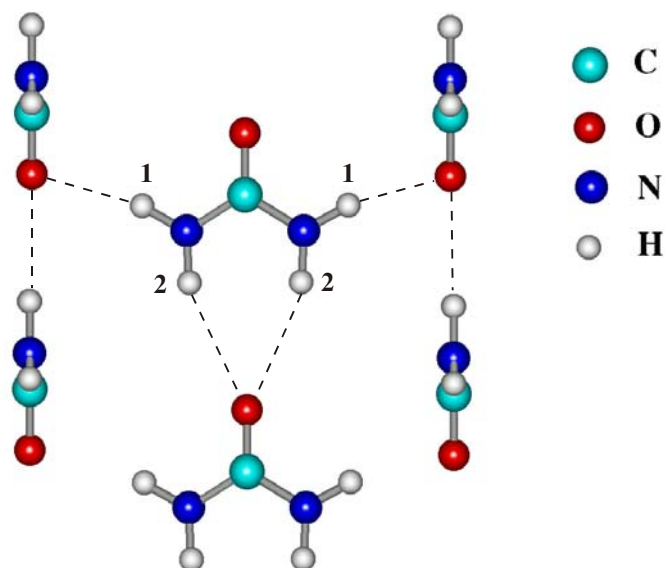


Slika 5 Tetragonalni sistem

Urea stoga kristališe u tetragonalnom sistemu u klasi $P\bar{4}2_1m$ [59 - 61]. Posедуje dva molekula u jediničnoj ćeliji. Dimenzije ćelija na sobnoj temperaturi su:

$$a = 0,5662, c = 0,4716 \pm 0,0002 \text{ nm}$$

Primenom elektronske difrakcije i proton magnetne rezonance određena su rastojanja između atoma kao i uglovi između pojedinih veza u molekulu uree [63]. Na slici 6 data je struktura veza u urei, a u tabelama 1 i 2 date su tačne dužine pojedinih veza i vrednosti uglova između odgovarajućih veza:



Slika 6 Struktura veza i uglova u urei

Tabela 1 Dužina veza između atoma u kristalu uree.

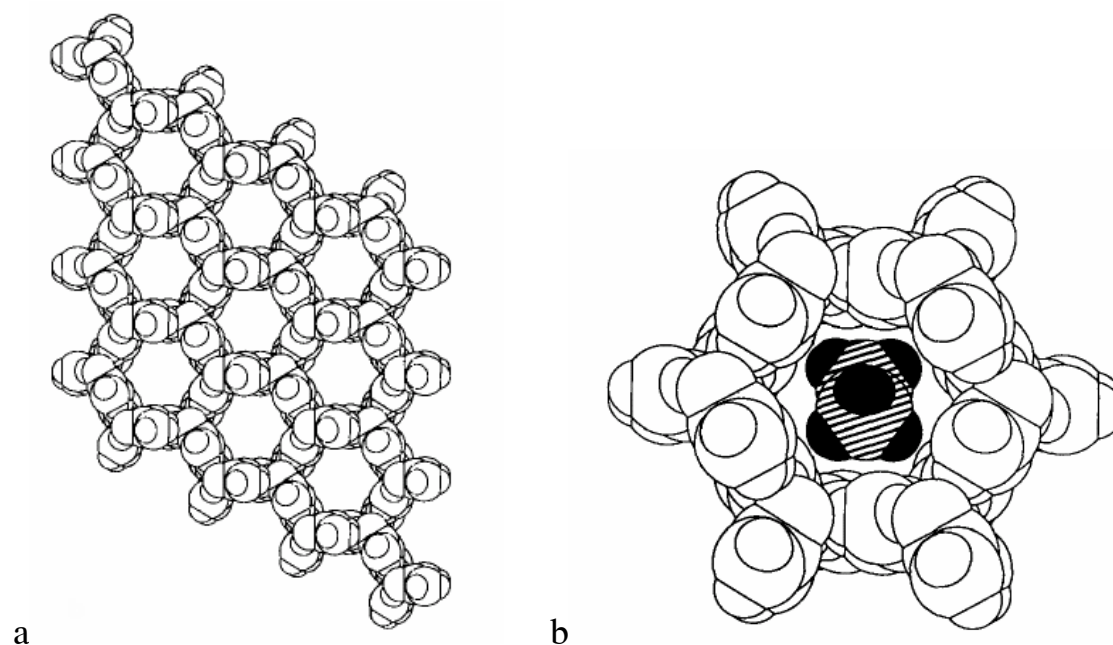
Atomi	Rastojanje, nm	Atomi	Rastojanje, nm
C - O	$0,1243 \pm 0,0006$	N - H (1)	$0,0988 \pm 0,0020$
C - N	$0,1351 \pm 0,0007$	N - H (2)	$0,0995 \pm 0,0007$
N - O	$0,2994 \pm 0,0006$	H(1) - O'	$0,2062 \pm 0,0021$
N - O'	$0,3034 \pm 0,0005$	H(2) - O	$0,2080 \pm 0,0011$

Tabela 2 Vrednosti uglova između atomskih veza u kristalu uree.

Veza	Ugao	Veza	Ugao
N - C - O	$121^{\circ} 30' \pm 15'$	N - H(2) O	$151^{\circ} 43'$
N - C - N	$117^{\circ} 0' \pm 21'$	C - O H(1)	$105^{\circ} 50'$
H(1) - N - C	$119^{\circ} 40' \pm 50'$	C - O H(2)	$148^{\circ} 25'$
H(2) - N - C	$118^{\circ} 5' \pm 55'$	H(1) O H(1)'	$148^{\circ} 20'$
H - N - H	$122^{\circ} 8'$	H(2) O H(2)'	$63^{\circ} 10'$
N - H(1) O'	$167^{\circ} 27'$	H(1) O H(2)'	$76^{\circ} 44'$

Od naročito interesa su kanalska inkluziona jedinjenja karbamida, koja predstavljaju rešetkasta inkluziona jedinjenja. Kanale obrazuje kristalna rešetka domaćina (uree). Karbamid normalno kristališe u obliku gusto sabijene tetragonalne rešetke. U prisustvu odgovarajuće komponente gosta, može da gradi kristale u kojima su molekuli karbamida vezani među sobom intermolekulskim vodoničnim vezama i heksagonalno raspoređeni u obliku spirale, tako da obrazuju zidove cilindričnog kanala prečnika oko 0,5 nm [43]. Ovi kanali mogu da prime molekule jedinjenja sa normalnim nizovima u anti-periplanarnoj konformaciji, kao što su n-parafinski ugljovodonici i njihovi derivati s terminalnim funkcionalnim grupama (alkoholi, aldehidi, karbonske kiseline, amini, olefini i dr.), pri čemu se kompleksi veoma lako stvaraju, kada inkludovana komponenta ima normalne nizove sa šest i više ugljenikovih atoma. Molekulski odnos karbamida i komponente gosta varira u inkluzionom jedinjenju i zavisi od veličine molekula inkludovane supstance pri čemu oko 0,7 molekula karbamida dolazi na jednu CH_2 -grupu molekula gosta [43].

Proučavani su kompleksi uree sa alkanima (heksadekan, nonadekan i dr.) [64 - 67]. Izgled rešetke uree u inkluzionom kompleksu i inkluzionog kanalskog kompleksa uree sa heksadekanom dat je na slici 7 [65].



Slika 7 Kristalna rešetka uree pri formiranju inkluzionog kompleksa (a) i inkluzioni kompleks urea-heksadekan (b)

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

3.1. MATERIJALI

Alildisulfid (80 %, ρ 1,008 g/cm³), Aldrich Company

N-etil-maleimid (98 %), Sigma chemical Company

β -ciklodekstrin (98%), Merck

5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (97 %, ρ = 1,015 g/cm³), Aldrich Company

Urea (99 %, ρ = 1,335 g/cm³), Merck

Ostale korišćene hemikalije su p.a. kvaliteta.

3.2. REAGENSI

N-etil-maleimid (0,05 mol/dm³) [68]. N-etil-maleimid (0,626 g) rastvori se u 2-propanolu (100 cm³).

Kalijum hidroksid (0,25 mol/dm³) [68]. Kalijum hidroksid (14,03 g) rastvori se u 2-propanolu (100 cm³).

Fenton [69]. Rastvori I, II i III pomešaju se neposredno pre upotrebe u jednakim zapreminskim odnosima isključivo ovim redosledom.

I: Gvožđe-(II)-hlorid hidratisan sa 4 molekula vode (0,198 g) dopuniti do 100 cm³ destilovanom vodom.

II: Vodoni peroksid (30 % 0,103 cm³) rastvori se u destilovanoj vodi do 100 cm³.

III: 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (1 g) rastvori se u 100 cm³ fosfatnog pufera.

Fosfatni pufer (pH = 7,2). Kalijum-dihidrogen-fosfat (0,9078 g) i natrijum-hidrogen-fosfat (2,3880 g) rastvore se u destilovanoj vodi i rastvor dopuni do 100 cm³.

3.3. METODE SINTEZE

3.3.1. Sinteza i prečišćavanje alicina

Alildisulfid 80% ($3,5\text{cm}^3$) se rastvori u glacijalnoj sirćetnoj kiselini, dopuni glacijalnom sirćetnom kiselinom do 25 cm^3 i rastvor drži u ledenom kupatilu (0°C). U rastvor alildisulfida, uz intenzivno mešanje, dodaje se kiseli rastvor vodonikperoksida u kapima u toku 25 minuta. Kiseli rastvor vodonikperoksida se priprema rastvaranjem 30 % vodonikperoksida ($3,5\text{ cm}^3$) u glacijalnoj sirćetnoj kiselini i zapremina rastvora podesi na 25 cm^3 . Nakon dodavanja celokupne zapremine kiselog vodonikperoksida reakcija sinteze se nastavlja uz intenzivno mešanje još 4 sata na temperaturi od $+4$ do 26°C . Reakciona smeša se neutrališe dodavanjem rastvora kalijum-hidroksida (43g kalijum-hidroksida rastvori se u destilovanoj vodi i zapremina rastvora podesi na 50 cm^3) u kapima uz intenzivno mešanje i hlađenje. Ukoliko dođe do stvaranja i izdvajanja kalijum-acetata u toku neutralizacije, reakcionoj smeši treba dodati destilovanu vodu ($5-10\text{ cm}^3$) da se rastvori izdvojeni kalijum-acetat. U toku neutralizacije dolazi do izdvajanja uljaste tečnosti sa karakterističnim i jakim mirisom belog luka.

Alicin se iz sirove reakcione smeše izdvaja ekstrakcijom sa dietil-etrom ($4\times 50\text{ cm}^3$). Iz objedinjenih etarskih frakcija etar se uklanja slobodnim otparavanjem u digestoru. Nakon uklanjanja etra dobija se dvoslojna reakciona smeša, dve uljaste frakcije koje se ne mešaju, bezbojna teža frakcija i svetlo žuta prozirna lakša frakcija alicina koje se odvajaju u kvalitativnom levku za odvajanje. Čistoća ovako dobijenog alicina u lakšoj frakciji je 73%.

3.3.2. Sinteza inkluzionih kompleksa alicina

Kompleks β -ciklodekstrin-alicin. Za sintezu molekulskog inkluzionog kompleksa alicina sa β -ciklodekstrinom primenjena je tehnika formiranja čvrstih kompleksa metodom gnječanja. Sintetisani i prečišćeni, alicin (387,6 mg) višefaznom ekstrakcijom sa etrom, dodaje se gustoj mešavini β -ciklodekstrina (443,3 mg) i destilovane vode ($0,65\text{ cm}^3$), meša na sobnoj temperaturi dok se ne dobije gusta pasta koja se, zatim, suši u eksikatoru iznad dehidratacionog sredstva (koncentrovana sumporna kiselina) na oko 10°C u toku 24 časa. Molski odnos β -ciklodekstrina i alicina u kompleksu je 1: 6.

Kompleks urea-alicin. Za sintezu kanalskog inkluzionog kompleksa alicina sa ureom primenjen je metod dobijanja kompleksa u rastvoru. U zasićeni rastvor uree, (434 mg uree u 0,45 cm³ destilovane vode) se doda alicin (330 mg). Formirana smeša se dobro umeša i ostavi da se suši u eksikatoru iznad dehidratacionog sredstva (koncentrovana sumporna kiselina) na oko 10°C dva do tri dana. Odstranjivanjem vlage dolazi do kristalizacije kompleksa u kome je molski odnos uree i alicina 4:1. Kristali kompleksa se vizuelno razlikuju od kristala uree, vunasti su i slabo žuto obojeni.

3.3.3. Sinteza ajoena

Sintetisani i prečišćeni alicin (1,05 g) stavi se u balon sa okruglim dnom (50 cm³) i doda aceton (9 cm³). Reakciona smeša se zagreva uz refluks na 80°C u vodenom kupatilu, pet sati. Dobijena homogena reakciona smeša tamno žute boje, sa jakim mirisom na beli luk, pored sporednih reakcionih proizvoda, pretežno sadrži ajoene (oba izomera: E-ajoen i Z-ajoen).

3.3.4. Sinteza vinilditiina

Sintetisani i prečišćeni alicin (1,05 g) ubaci se u balon sa okruglim dnom (50 cm³) i doda n-heksan (9 cm³). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 90 minuta na 45°C u vodenom kupatilu. Dobijena reakciona smeša svetlo žute boje, karakterističnog mirisa ostavi se na hladno (+4°C) ili na sobnoj temperaturi više dana da se izdvoji uljasti mrki teško rastvoran sloj. Ovako dobijena reakciona smeša sadrži smešu izomera vinilditiina (2-vinil-4H-1,3-ditiin, i 3-vinil-4H-1,2-ditiin), kao glavne proizvode, smešu izomera ajoena (E-ajoen i Z-ajoen) i druge sporedne proizvode.

3.4. FIZIČKO-HEMIJSKE METODE ANALIZE SINTETISANIH JEDINJENJA

3.4.1. Vidljiva spektroskopija (VIS)

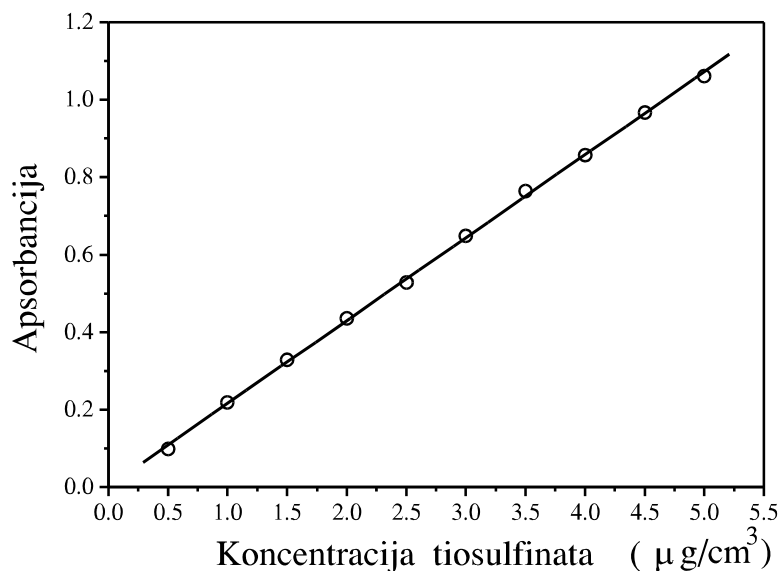
Za spektrofotometrijska merenja u vidljivoj oblasti korišćen je Perkin-Elmer lambda 15 UV/VIS Spektrophotometer i Varian Cary 100.

Slobodni alicin. Odmerenoj zapremini uzorka (1 cm^3) doda se rastvor N-etil-maleimida (1 cm^3) i rastvor kalijum-hidroksida $0,25 \text{ mol/dm}^3$ (1 cm^3). Apsorbancija rastvora meri se na 515 nm odmah nakon razvijanja boje.

Osnovni rastvor alicina za izradu kalibracionog dijagrama, priprema se rastvaranjem sintetisanog i prečišćenog alicina u 2-propanolu. Razblaživanjem osnovnog rastvora priprema se serija rastvora koncentracije od $0,5$ do $5 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$, koji se dalje tretiraju po proceduri za spektrofotometrijsko određivanje tiosulfinata [70].

Zavisnost apsorbancije (A) od koncentracije (c , $\mu\text{g/cm}^3$) je pravolinijska sa stepenom korelacije $0,997$:

$$A = 0,214 \cdot c + 2,4 \cdot 10^{-2} \quad (1)$$



Slika 8 Kalibraciona kriva za određivanje dialil-tiosulfinata (alicina)

Alicin u inkluzionom molekulskom kompleksu β -ciklodekstrina. Kompleksu alicin- β -ciklodekstrin (13,3 mg) dodaje se vodeni rastvor α -amilaze (1mg enzima u 1cm³ destilovane vode) uz mešanje i ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi. Rastvor kompleksa se ekstrahuje dietil-etrom (3×3 cm³). Objedinjene etarske frakcije oslobodjaju se etra slobodnim otparavanjem na atmosferskom pritisku u digestoru na sobnoj temperaturi. Izdvojeni alicin iz kompleksa tretira se po proceduri za odeđivanje slobodnog alicina.

Alicin u inkluzionom kanalskom kompleksu uree. Kompleks alicin-urea (16,2 mg) rastvori se u destilovanoj vodi (1 cm³) i alicin ekstrahuje dietil-etrom (3×3 cm³). Objedinjene etarske frakcije se oslobode etra slobodnim otparavanjem na atmosferskom pritisku u digestoru na sobnoj temperaturi. Dobijeni alicin iz kompleksa tretira se po proceduri za odeđivanje slobodnog alicina.

3.4.2. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Ajoeni. Sirova reakciona smeša ajoena nanese se (50 μ l) na tanki sloj silikagela G 60 (staklene ploče 20×20 cm; debljina sloja 0,25 mm; aktiviranje: zagrevanje 1 sat na 105°C u sušnici) i hromatogram razvija u etilacetatu. Izomeri ajoena se detektuju prskanjem sa baznim rastvorom N-etil-maleimida u 2-propanolu i identifikuju upoređivanjem dobijenih R_f-vrednosti sa literaturnim R_f-vrednostima.

Vinilditiini. Sirova reakciona smeša vinilditiina, nanese se (50 μ l) na tanki sloj silikagela G 60 (staklene ploče 20×20 cm, debljina sloja 0,25 mm, aktiviranje: zagrevanje 1 sat na 105°C u sušnici) i hromatogram razvija u n-heksanu. Izomeri vinilditiina se detektuju prskanjem sa 50% rastvorom sumporne kiseline i identifikuju upoređivanjem dobijenih R_f-vrednosti sa literaturnim R_f-vrednostima.

3.4.3. Tečna hromatografija visokog pritiska (HPLC)

Kinetika sinteze alicina praćena je metodom tećne hromatografije visokog pritiska pri ćemu su uzorci za HPLC-analizu (0,2 cm³) uzimani direktno iz reakcione smeše u razlićitim vremenskim intervalima (poćetak reakcije, 25, 77, 125, 170 i 220 minuta od poćetka reakcije). Svaki uzorak se

dopuni mobilnom fazom za HPLC do 10 cm³ i filtrira na membranskom filtru (d = 0,45 μm). Korišćen je HPLC - uređaj Hewlett Packard 1100 pod uslovima:

Kolona: LiChrosorb[®] RP-18 (5μm)

Protok: 1,2 cm³/min

Mobilna faza: Metanol/voda/mravlja kiselina, 60/40/0,1, v/v/v

Temperatura: 20°C

Pritisak: 277 bar

Detekcija: 205 nm

Injektirana zapremina: 20μl

Vreme snimanja: 45 min.

Kinetika sinteze ajoena i vinilditiina takođe je praćena metodom HPLC. Uzorci su uzimani direktno iz reakcionih smeša (0,1 cm³) u različitim vremenskim intervalima. Za ajoene u početnom trenutku sinteze, posle 20, 40, 70 i 250 minuta od početka sinteze, dopunjeni su mobilnom fazom A do 10 cm³, a zatim filtrirani na membranskom filtru (d = 0,45 μm). Izomeri ajoena razdvojeni tankoslojnom hromatografijom su eluirani acetonitrilom i njihovi supernatanti direktno korišćeni za HPLC analizu (20 μm). Uzorci vinilditiina su uzorkovani u početnom trenutku sinteze, posle 23, 60 i 90 minuta od početka sinteze, dopunjeni acetonitrilom do 10 cm³ i pre hromatografisanja filtrirani na membranskom filtru (d = 0,45 μm). Tečna hromatografija ajoena i vinilditiina urađena je na HPLC Hewlett Packard 1100 pri sledećim uslovima:

Kolona: LiChrosorb[®] RP-18 (5μm), 4,6 mm×250 mm

Protok: 1,2 cm³/min

Mobilna faza A: Voda/acetonitril, 62/38, /v/v

Mobilna faza B: Voda/acetonitril, 80/20, /v/v

Vreme t, min	0	10	20	50	60
B, %	0	0	45	45	0

Temperatura: 20°C

Pritisak: 277 bar

Detekcija: 205 nm

Injektirana zapremina: 20μl

Vreme snimanja: 45 min.

3.4.4. Termogravimetrijska analiza (TG)

Metodom termogravimetrijske analize ispitivana je stabilnost slobodnog alicina i alicina u inkluzionim kompleksima. Praćen je gubitak mase uzorka sa povećanjem temperature na Bomem TG/plus termogravimetru pod uslovima:

Opseg temperature: 30-400°C

Režim snimanja: Linearno uvećanje temperature brzinom 10 K/min.

Merena masa uzorka: Alicin (11,35 mg), kompleks β -ciklodekstrin-alicin (9,85 mg), kompleks urea-alicin (16,86 mg), β -ciklodekstrin (16,9 mg) i urea (10,41 mg).

3.4.5. Elektron spin rezonancija (ESR)

Metodom elektron spin rezonancije (ESR), koja se još naziva i elektron paramagnetna rezonancija (EPR), određen je mehanizam sinteze alicina i potvrđeno njegovo antioksidativno dejstvo. S obzirom da su u sistemu za sintezu alicina prisutni kratko živeći nestabilni slobodni radikali (hidroksi- i tiil-radikali) primenjena je spin-trap metoda. Kao spin-trap reagens korišćen je 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (DMPO) koji reaguje sa reaktivnim radikalima u sistemu dajući relativno stabilne radikale koji mogu da se detektuju pomoću ESR. Elektron spin rezonantna spektralna određivanja slobodnih hidroksi-radikala i antioksidativna aktivnost alicina izvršena su na spektrometru Bruker 300 E, mikrotalasnog zračenja nominalne frekvencije 9,5 GHz (x-zraka), sledećih radnih karakteristika: frekvencija modulacije 100 kHz, amplituda modulacije 0,204 G, vremenska konstanta 327,68 ms, vremenski opseg merenja 1310,72 ms, centar polja 3440 G, ukupan opseg merenja 100 G, frekvencija mikrotalasa 9,64 GHz, snaga mikrotalasnog područja 20,0 mW i temperatura merenja 20°C. Uzorci reakcionih smeša su se prilikom snimanja nalazili u standardnoj Bruker ER-160 FC kvarcnoj kivetu za vodene rastvore.

3.4.6. Gasna hromatografija - masena spektrometrija (GH-MS)

Gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom analizirane su sirove reakcione smeše ajoena i vinilditiina direktnim injektiranjem, sa sledećim uređajima i pod uslovima:

Gasna hromatografija

Uređaj: Voyager GC/MS ThermoQuest.

Detektor: Spectra system UV 6000 LP

Kolona: Supelko PTE-5, 30 m x 0,32 mm x 0,32 μm

Stacionarna faza: POMS +5% phenylsiloxan

Temperatura kolone: početna 60 °C, krajnja 210 °C

Temperaturni režim: 2 °C/min

Temperatura injektora: 250 °C

Temperatura detektora: 260 °C

Protok nosećeg gasa (He): 2,5 cm³/min

Zapremina injektiranja: 0,2 μl

Masena spektrometrija

Razdvojenim komponentama gasnom hromatografijom snimljeni su maseni spektri na Trace GC 2000 series (Thermo Quest) uređaju metodom elektronske jonizacije (EJ) sa energijom elektrona 70 eV, izvorom jonizacije na temperaturi od 200°C i naponom detektora 350 V.

3.4.7. Ultraljubičasta spektroskopija (UV)

Vodenim rastvorima prečišćenog alicina i kompleksima alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom snimljeni su UV spektri u oblasti talasnih dužina od 190-300 nm primenom odgovarajuće slepe probe. TLC razdvojeni izomeri ajoena i vinilditiina, eluirani su u acetonitrilu (5 cm³) uz intenzivno mućkanje (15 min) i centrifugirani (15 min, 4000 min⁻¹). Dobijenim supernatantima su snimljeni UV spektri u oblasti talasnih dužina od 190-300 nm u odnosu na odgovarajuću slepu probu. Sva merenja urađena su na Perkin-Elmer lambda 15 UV/VIS spektrofotometru.

3.4.8. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija

¹H-NMR i ¹³C-NMR snimanja izvršena su na uređaju Bruker AC 250 E sa radnom frekvencijom 250 i 62,5 MHz respektivno u staklenoj kiveti prečnika 5 mm na sobnoj temperaturi pulsnom metodom sa višestrukim

ponavljanjem pulseva za snimanje ^{13}C -NMR spektara. Snimljeni su ^1H -NMR i ^{13}C -NMR-spektri sintetisanom i prečišćenom alicinu, kompleksu alicina sa β -ciklodekstrinom i čistom β -ciklodekstrinu. Za ureu i kompleks urea-alicin snimljeni su ^1H -NMR spektri. Kao rastvarači korišćeni su D_2O i CDCl_3 . Uzorci za ^1H -NMR snimanja su pripremljeni rastvaranjem ispitivanih jedinjenja ili kompleksa (500 μg) u odgovarajućem rastvaraču (200 μl), dok je za ^{13}C -NMR snimanja korišćena nešto veća masa uzorka (50 mg ispitivanog jedinjenja ili kompleksa u 200 μl odgovarajućeg rastvarača).

3.4.9. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FT-IC)

Sintetisanom i prečišćenom alicinu, ajoenima i vinilditiinima snimljeni su FT-IC spektri između KBr pločica sa debljinom sloja 0,1 μm u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} . Inkluzioni kompleksi alicina, β -ciklodekstrina i uree snimljeni su u KBr piluli (2,6 mg uzorka, 140 mg KBr, bez vakuumiranja) u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} . Sva snimanja su urađena na FT IC spektrofotometru Bomem Hartmann & Braun MB-series.

3.4.10. Difrakcija X-zraka

Difrakcijom X-zraka analizirani su čist β -ciklodekstrin i inkluzioni kompleks β -ciklodekstrin-alicin koji su u obliku praha pri sledećim uslovima: uzorci su ozračeni monohromatskim CuK_α zračenjem i analizirani pod uglom 2θ između 5 i 40° . Napon struja, korak i vreme po koraku su 45 kV, 40 mA, 0,02 i 5 s/korak, respektivno. Ova snimanja urađena su na uređaju Philips X'Pert difraktometru za prah. Uzorcima kompleksa urea-alicin koji su izrazito kristalični snimljeni su difraktogrami pri sledećim uslovima: uzorci su ozračeni monohromatskim CuK_α zračenjem i analizirani pod uglom 2θ između 5 i 80° . Napon, struja, korak i vreme po koraku su 45 kV, 40 mA, 10 i 1000 s/korak, respektivno. Difraktogrami monokristalima uree su urađeni na uređaju STOE IPDS (Image Plate Detecting System), ozračivanjem monohromatskim MoK_α zračenjem pri naponu struja 50 kV, 40 mA, veličini kolimatora 0,5 mm, rastojanju pločica - uzorak 80 mm, vremenu eksponiranja 3 min, broj snimaka 180 (φ 0 - 360° , korak = 2) i temperaturi snimanja 173 K (Oxford Cryosystem 600).

3.4.11. Mikrobiološka ispitivanja

Za mikrobiološka ispitivanja vodenih rastvora alicina, inkluzionih kompleksa alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom i derivata alicina, ajoena i vinilditiina (direktno uzeti iz sirove reakcione smeše) primenjena je metoda diska, tj. difuziona metoda. Ovom metodom praćena je mikrobiološka aktivnost navedenih jedinjenja u momentu sinteze i u toku vremena odnosno njihova strukturalna stabilnost i mikrobiološka aktivnost. Sterilni papirni diskovi (prečnik 12,7 mm), koji se predhodno natope odgovarajućim uzorkom unose se u Petrijeve šolje zasejane ispitivanim kulturama mikroorganizama na odgovarajućim podlogama. Uzorci se inkubiraju na 37 °C (bakterije) i 25 °C (gljive) u toku 24 sata.

Korišćeni su sledeći mikroorganizmi:

Bakterije

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Gljive

Candida albicans ATCC 10231 i *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Posuđe i pribor se sterilišu suvom sterilizacijom na 180 °C, dok se podloge sterilišu u autoklavu na 121 °C, 25 min pri P = 110 kPa (za bakterije), i na 120 °C, 15 min pri P = 110 kPa (za gljive). Za bakterije se koristi podloga *Bacto antibiotic medium 1 dehydrated* (Difco laboratories Detroit USA) B-1, a za gljive *Trypton soja-agar* (Torlak Institut za imunologiju i virusologiju - Beograd).

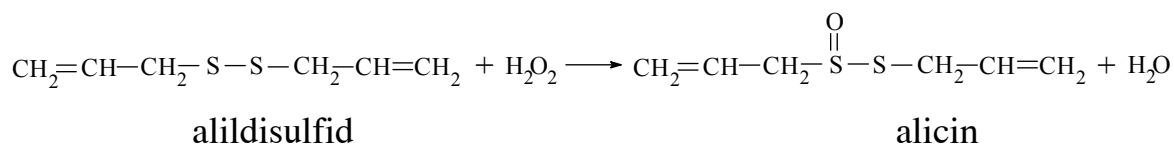
REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. ALICIN

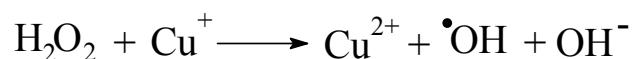
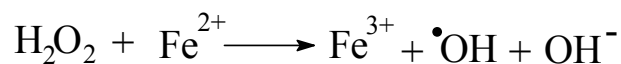
4.1.1. Ispitivanje mehanizma sinteze i antioksidativne aktivnosti alicina

Elektron spin rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda zasnovana na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. Često se ova metoda naziva i elektron paramagnetna rezonancija (EPR), jer se njome mogu ispitivati samo paramagnetne supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima. Ova metoda najveću primenu u početku imala je u fizici, ali je sa razvojem eksperimentalne tehnike usledila njena primena u biologiji (za detekciju radikala nastalih fotohemijским ili radiolitičkim putem i za ispitivanje enzimskih reakcija), u medicini (za ispitivanje kancerogeneze krvi, živih tkiva i dr.) i u nekim oblastima hemije (na primer u hemiji slobodnih radikala, za određivanje mehanizama radikalnih reakcija i dr.) [71 - 73].

U cilju određivanja mehanizma sinteze alicina, oksidacijom vodonik peroksidom alildisulfida u kiseloj sredini, primenjena je ESR spektroskopija kao izuzetno osetljiva metoda i to spin-trap metoda za analiziranje nestabilnih radikala. Dodavanjem određenih organskih jedinjenja tzv. spin-trapova u reakcioni sistem sa prisutnim reaktivnim radikalima grade se relativno stabilni radikali koji mogu da se detektuju ESR spektroskopijom [69]. U slučaju sinteze alicina u reakciji:



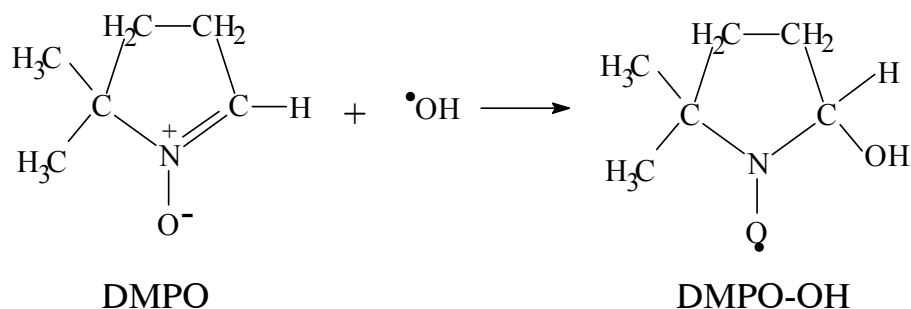
korišćen je 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksida (DMPO) kao spin-trap jedinjenje, a kao referentna proba korišćena je Fentonova reakcija. Prema Fentonovoj reakciji hidroksi radikali nastaju reakcijom vodonikperoksida sa dvovalentnim jonima gvožđa ili bakra prema sledećoj reakciji:



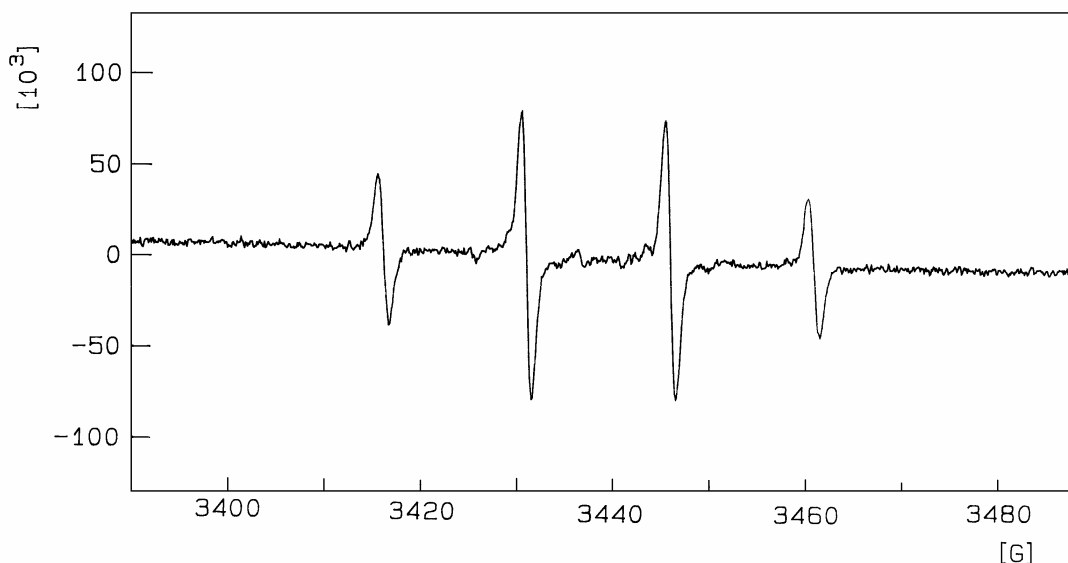
Bielski smatra da se u toku Fentonove reakcije, pre nastajanja hidroksi radikala, stvara međuproizvod feril, u kome gvožđe ima oksidaciono stanje +4 [74]:



Prema literaturnim podacima [75] DMPO reaguje sa hidroksi-radikalima gradeći DMPO-OH spin-adukt. On predstavlja stabilniji radikal kiseonika, koga je moguće detektovati ESR metodom, zbog toga što je duže živeći i stabilniji od hidroksi-radikala. Reakcija nastajanja DMPO-OH spin-adukta data je sledećom hemijskom jednačinom [69]:



U cilju određivanja mehanizma stvaranja reaktivnih slobodnih hidroksi-radikala u reakcionoj smeši sinteze alicina, definisan je sledeći model-sistem: 1 cm³ 0,01 mol/dm³ FeCl₂·4H₂O, 1 cm³ 0,01 mol/dm³ H₂O₂, 0,089 mol/dm³ DMPO i 1 cm³ natrijum-fosfatnog pufera, pH=7,2. U ovom sistemu dolazi do oslobađanja hidroksi-radikala koji u reakciji sa DMPO daje DMPO-OH spin-adukt. Na slici 9 prikazan je elektron spin rezonantni (ESR) spektar hidroksi-radikala nastalih u formiranom model sistemu u prisustvu DMPO kao spin-trapa. Ordinata koordinatnog sistema predstavlja % relativnog intenziteta (% RI) ESR signala DMPO-OH spin-adukta nastalog u model sistemu, a apscisa intenzitet magnetnog polja.



Slika 9 Elektron spin rezonantni spektar nastalog DMPO-OH spin-adukta u formiranom model-sistemu (Fentonova reakcija)

Na spektru se uočava hiperfina struktura (slika 9) predstavljena sa četiri linije relativnog odnosa intenziteta 1:2:2:1, i konstanti cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I=1$) $a_{\text{N}}=14,9$ G i jedan ^1H -atom ($I=1/2$) $a_{\text{H}}=14,9$ G. Spektroskopski faktor cepanja, takozvana g-vrednost, koja određuje položaj apsorpcione linije ESR spektra iznosi 2,0060 za nastali nitroksid-radikal (DMP-OH spin-adukt). Ova vrednost predstavlja prosečnu vrednost pošto se radi o tečnosti, u kojoj su izražene spin-orbitalne interakcije i može se izračunati korišćenjem jednačine 2 za uslov rezonancije [69]:

$$\Delta E = g \times \beta_e \times H \quad (2)$$

pri čemu je:

ΔE - energetska razlika dva nivoa između kojih je dozvoljen prelaz,

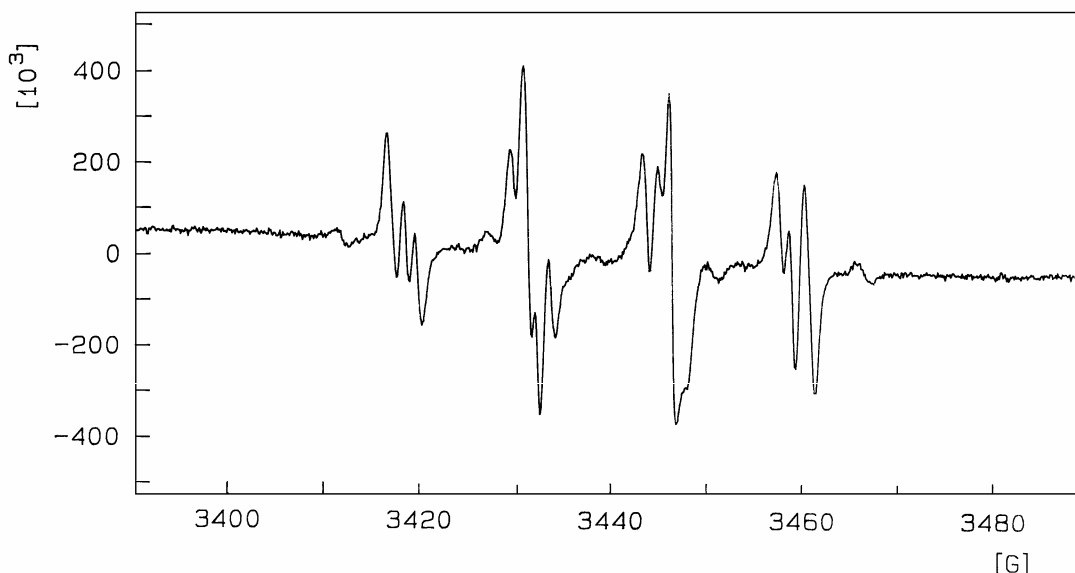
β_e - Bohrov magneton, definisan izrazom $eh/2m_e$, pri čemu su e i m_e naelektrisanje i masa elektrona, a h Planckova konstanta,

H - jačina magnetnog polja.

U ovom radu korišćen je standard peroksil-amindisulfonat (Fremyjeva so) čija je g-vrednost, $g_{\text{sr}}=2,0057 \pm 0,0001$.

S obzirom da je energija disocijacije O - O veze u vodonik peroksidu oko 200 kJ/mol [76], predpostavlja se da se vrlo lako raskida i daje hidroksiradikale u reakcionom sistemu za sintezu alicina. Ovu predpostavku potvrđuju rezultati koji su dobijeni elektron spin rezonantnom analizom reakcione smeše sledećeg sastava: 1,5 cm³ vodonik peroksida, 30% dopunjen do 10 cm³ glacijalnom sirćetnom kiselinom. Nakon 30 minuta od formiranja ove smeše

bez dodatka spin-trap jedinjenja (DMPO) snimljen je ESR spektar prikazan na slici 10.

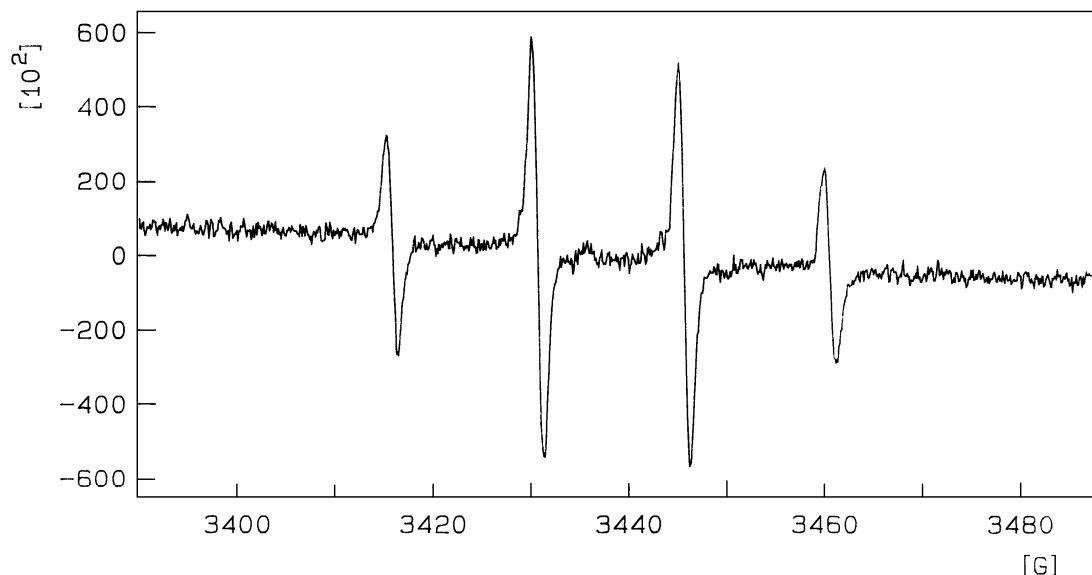


Slika 10 ESR spektar slobodnog hidroksi-radikala nastalog u kiseloj sredini raspadom vodonik peroksida bez dodatka DMPO

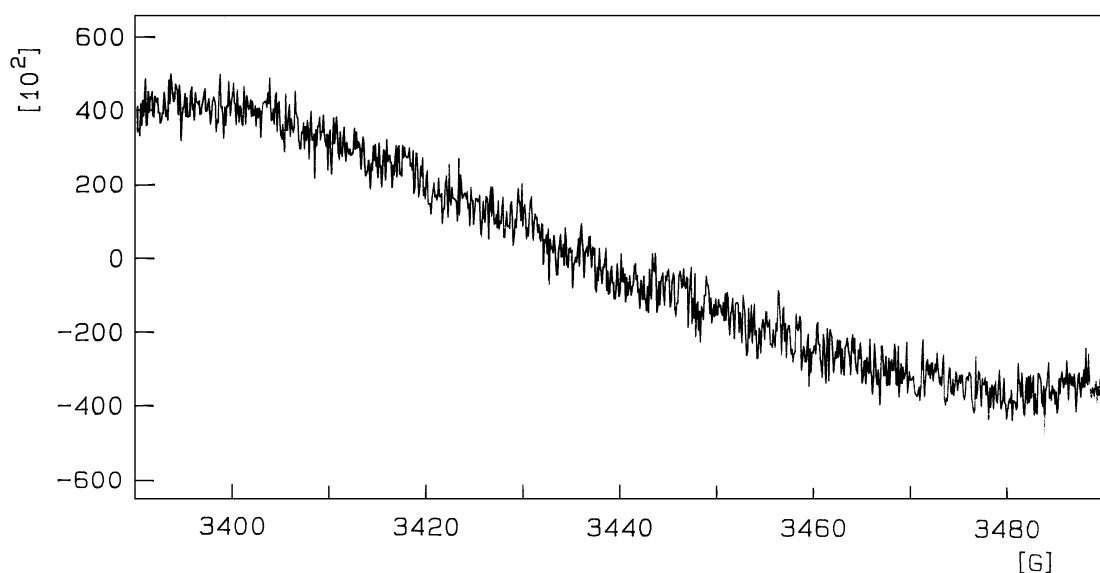
Hiperfina struktura ovog spektra je složena i sastoji se od više spektralnih linija. Do cepanja linija dolazi usled interakcije nesparenog elektrona hidroksi-radikala sa drugim jedinjenima u reakcionoj smeši, pošto u sistem nije dodat spin trap DMPO. Naime, spektar prikazan na slici 10 ukazuje na prisustvo četiri različite vrste radikala, pri čemu spektralna linija na 3433 G odgovara hidroksi-radikalima prema g -vrednosti i konstantama hiperfinog cepanja koje su u saglasnosti sa referentnim model sistemom. Nastajanje hidroksi-radikala u reakcionoj smeši za sintezu alicina potvrđeno je i ESR spektrom koji je dobijen snimanjem kompletirane reakcione smeše uz dodatak spin-trapa DMPO (slika 11).

Naime, nastali hidroksi-radikali reaguju sa DMPO gradeći DMPO-OH spin-adukt kao u referentnom model-sistemu, tj. dobijena je potpuno identična hiperfina struktura spektra sa četiri linije relativnog intenziteta 1:2:2:1 i konstantama hiperfinog cepanja koje odgovaraju DMPO-OH spin-aduktu. Poređenjem intenziteta ESR spektara referentnog model sistema (slika 9) i referentnog model sistema sa dodatkom alicina (slika 11) utvrđeno je da dolazi do sniženja relativnog intenziteta signala na 66,67 % od početne vrednosti. Ovo pokazuje da alicin reguje sa slobodnim hidroksi-radikalima i smanjuje njihovu koncentraciju u reakcionoj smeši. Ukoliko se koncentracija alicina poveća na 10 mg/cm^3 u referentni model-sistem on izreaguje sa celokupnom

količinom prisutnih slobodnih hidroksi-radikala. Ovakav ESR spektar prikazan je na slici 12.



Slika 11 ESR spektar DMPO-OH spin-adukta nastalih mehanizmom Fentonove reakcije (referentni model sistem) uz dodatak 0,5 mg/cm^3 alicina

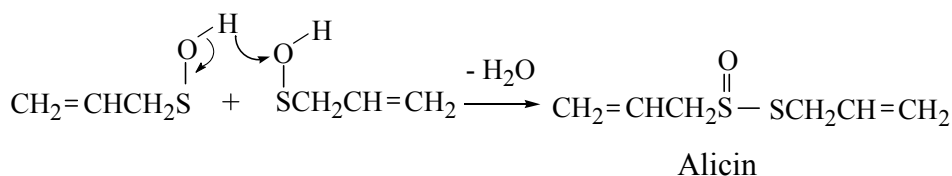
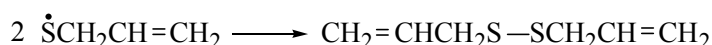
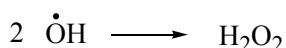
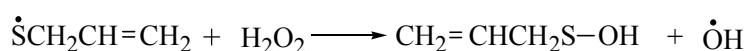
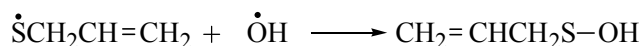
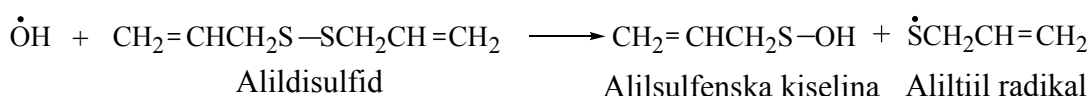
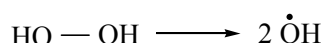


Slika 12 ESR spektar DMPO-OH spin-adukta nastalih mehanizmom Fentonove reakcije (referentni model-sistem) uz dodatak 10 mg/cm^3 alicina

Na spektru nema ni jednog signala na osnovu čega se može zaključiti da alicin poseduje jako izraženu antioksidativnu aktivnost koja je zasnovana na

sposobnosti alicina da reaguje sa slobodnim hidroksi-radikalima nastalim u reakcionoj smeši i da ih stabilizuje. Ovakva sposobnost alicina opravdava njegovo antimutageno i antikancerogeno dejstvo, s obzirom da hidroksi-radikali predstavljaju jednu od najreaktivnijih hemijskih vrsta. Oni mogu da reaguju sa skoro svim molekulima u živim organizmima: šećerima, aminokiselinama, fosfolipidima, nukleotidima i organskim kiselinama, što je jedan od glavnih uzroka patoloških stanja živih organizama. Mnoge važne biohemijske reakcije kao što su redukcija ribonukleozida, fotosinteza, fagocitoza, sinteza prostaglandina, i leukotriena predstavljaju slobodno-radikalske reakcije. Neke hemijske reakcije u kojima učestvuju slobodni radikali menjaju fizičke, biološke i zdravstvene osobine prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda, a u organizmu oštećuju ćelije tkiva, inicirajući mutagene i kancerogene procese u njima [77 - 80].

S obzirom da je ESR analizom nedvosmisleno potvrđeno prisustvo slobodnih hidroksi radikala u reakcionoj smeši nastalih raskidanjem O - O veze u vodonikperoksidu mogući mehanizam sinteze alicina bio bi radikalski prema sledećoj šemi:

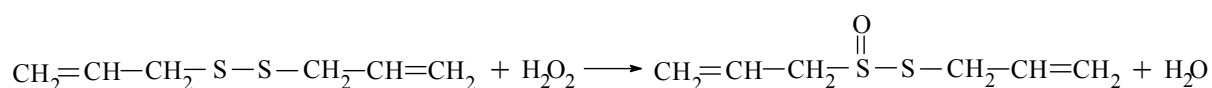


Pošto je energija disocijacije (200,9 kJ/mol) O - O veze u peroksidu manja od energije disocijacije (301,39 kJ/mol) S - S veze [76], lakše nastaje hidroksi-radikal, koji napada molekul alildisulfida i daje alil-tiil-radikal i alilsulfensku kiselinu. Dalje se tiil-radikal može rekombinovati sa hidroksi-radikalom i dati nestabilnu alilsulfensku kiselinu ili reagovati sa neraspadnutim vodonikperoksidom i dati novi hidroksi radikal i alilsulfensku

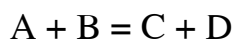
kiselinu. Takođe je moguća i rekombinacija dva tiil-radikala koji daju alil-disulfid, polazni supstrat za sintezu alicina. Dva molekula alilsulfenske kiseline, jako nestabilnog jedinjenja, reaguju i daju alicin uz izdvajanje molekula vode. Najsporiji stadijum u sintezi alicina je raspad jedinjenja na radikale (čija je koncentracija u stacionarnom stanju konstantna) što ukazuje da se sinteza odvija prema nultom redu reakcije, a što je u ovom radu kasnije i potvrđeno praćenjem kinetike sinteze alicina.

4.1.2. Ispitivanje kinetike sinteze alicina pomoću HPLC

Oksidacijom alildisulfida vodonikperoksidom u kiseloj sredini dobija se alicin i voda:



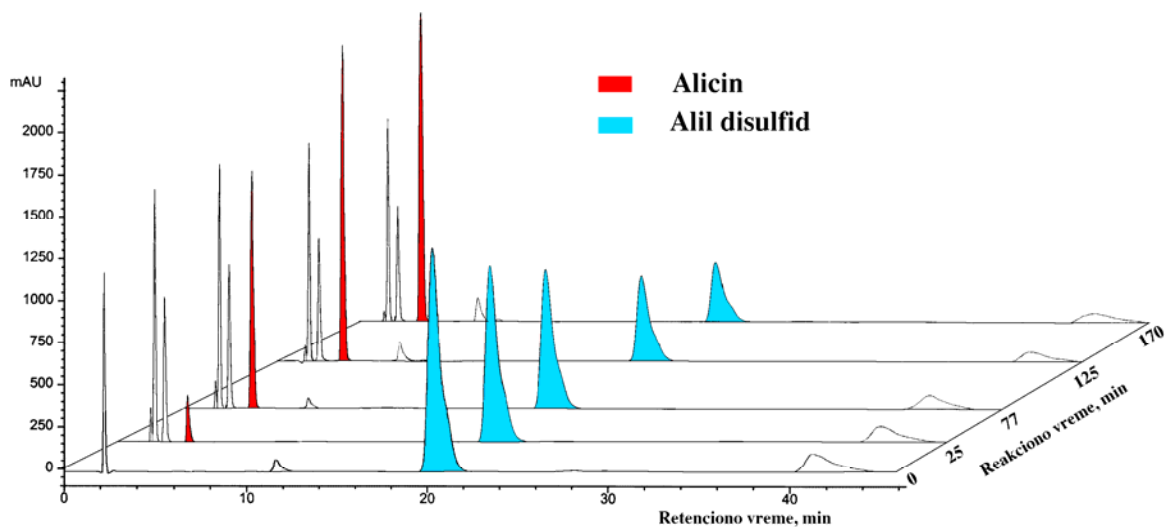
što se šematski može predstaviti:



gde je A oznaka za alil-disulfid, B za vodonikperoksid, C za alicin i D za vodu. Alil-disulfid je limitirajući reaktant jer je vodonikperoksid uzet u malom višku od oko 10% i ako je stehiometrijski odnos u reakciji 1:1.

Kinetika sinteze alicina praćena je metodom tečne hromatografije visokog pritiska (HPLC) od početka (reakciono vreme 0 min, tj. kada su reaktanti pomešani) do kraja reakcije (reakciono vreme 220 min, tj. kada je završena sinteza alicina), pri čemu su u toku sinteze uzimani uzorci reakcione smeše u određenim vremenskim intervalima, i analizirani pomoću HPLC. Rezultati ovih ispitivanja dati su na slici 13.

Sa slike se vidi da pik sa retencionim vremenom $R_t = 2,19$ min odgovara sirćetnoj kiselini, alil-disulfid se pojavljuje na retencionom vremenu $R_t = 20,44$ min i da sa vremenom površina pika opada tj. opada njegova koncentracija. Vodonikperoksid ima retenciono vreme, $R_t = 2,01$ min, njegova koncentracija opada u toku sinteze, a pik od alicina, kao glavnog proizvoda sinteze, kontinualno raste i javlja se na retencionom vremenu $R_t = 4,00$ min. Površine pikova su proporcionalne koncentracijama odgovarajućih jedinjenja i date su u tabeli 3.



Slika 13 HPLC hromatogrami uzoraka uzetih iz reakcione smeše za sintezu alicina u različitim vremenskim intervalima sinteze ($t = 0, 25, 77, 125, 170$ min)

Tabela 3 Koncentracije učesnika u reakciji u zavisnosti od vremena reakcije na temperaturi od 13°C

Jedinjenje	Rt, min	Reakciono vreme, min					
		0	25	77	125	170	220
Koncentracije jedinjenja, mol/dm ³							
H ₂ O ₂	2,01	0,4545	0,4311	0,3596	0,3090	0,1608	0,1126
Alicin	4,00	0,0001	0,0009	0,0048	0,0086	0,0097	0,0103
Alil-disulfid	20,44	0,3859	0,3578	0,2925	0,2047	0,1544	0,1262

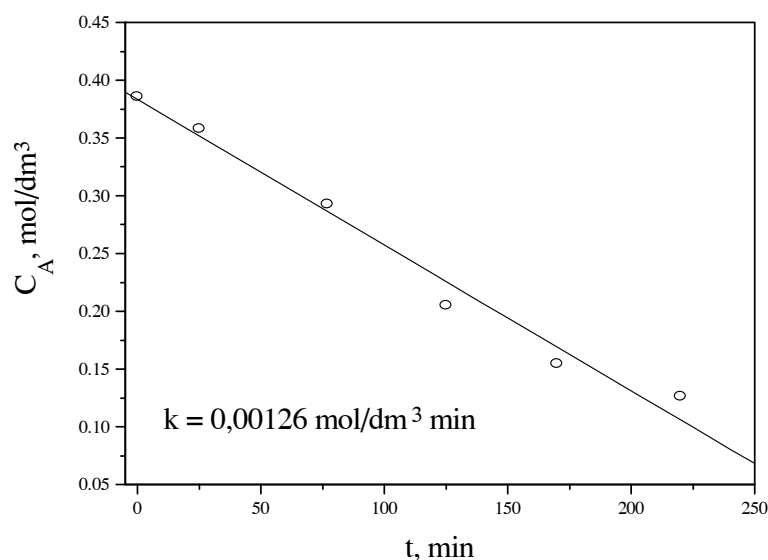
Koncentracije alil-disulfida i vodonikperoksida, dva glavna reaktanta u sintezi, sa vremenom odvijanja reakcije linearno opadaju (slika 14 i 15) što ukazuje da je reakcija sinteze alicina nultog reda. Polazeći od diferencijalne jednačine za brzinu reakcije nultog reda:

$$-\frac{dC_A}{dt} = k \quad (3)$$

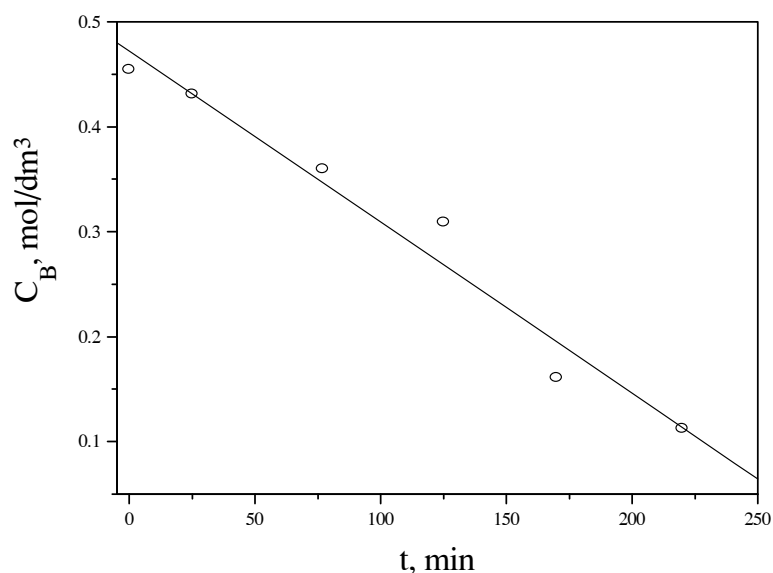
i njenim rešavanjem uz primenu početnih uslova da je $C_A = C_{A0}$ za $t = 0$ dobija se:

$$C_A = C_{A0} - k \cdot t \quad (4)$$

Koristeći jednačinu 4 konstruisan je grafik 14 i određena vrednost za konstantu brzine hemijske reakcije sinteze alicina tj. utroška alil-disulfida na 13 °C, $k = 0,00126 \text{ mol/dm}^3\text{min}$. Na potpuno istovetan način izvedena je sinteza na temperaturi od 26 °C i dobijena vrednost konstante brzine reakcije nestajanja alil-disulfida $k = 0,00236 \text{ mol/dm}^3\text{min}$.



Slika 14 Promena koncentracije alil-disulfida sa vremenom reakcije



Slika 15 Promena koncentracije vodonikperoksida sa vremenom reakcije

Ako se konstanta brzine predstavi Arrhenius-ovim izrazom, k_1 i k_2 za dve različite temperature izvođenja sinteze alicina T_1 i T_2 su:

$$k_1 = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T_1}} \quad \text{i} \quad k_2 = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T_2}} \quad (5)$$

Delenjem ovih jednačina i njihovim logaritmovanjem dobija se izraz za izračunavanje energije aktivacije:

$$E_a = -\frac{R \cdot \ln \frac{k_1}{k_2}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \quad (6)$$

Predeksponencijalni faktor A se može dobiti iz jednačine 5:

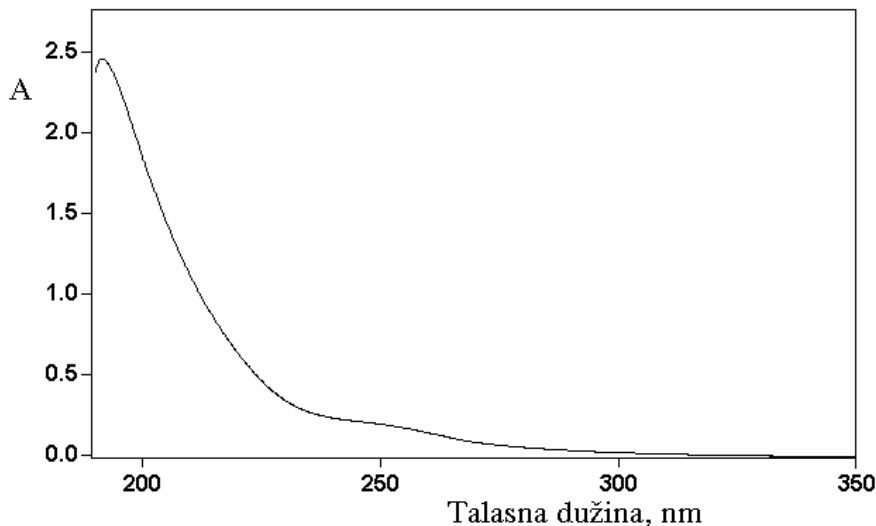
$$A = k_1 \cdot e^{\frac{E_a}{R \cdot T_1}} \quad (7)$$

Koristeći jednačine 6 i 7 dobijene su vrednosti za energiju aktivacije i faktor A 34320 J/mol i $2,338 \cdot 10^3$ mol/dm³min, respektivno.

4.1.3. Fizičko-hemijska karakterizacija alicina

Ultraljubičasta spektroskopija. U ranijim ispitivanjima [15, 70] za izolovane tiosulfinate iz svezeg vodenog ekstrakta, posle razdvajanja tankoslojnom hromatografijom, snimljeni su UV-spektri u različitim rastvaračima. Na spektrima su uočeni maksimumi na 198 nm, a karakteristični pikovi su još na 240 nm u vodi, na 245 nm u metanolu i 254 nm u acetonitrilu. Ovi pikovi su posebno izraženi kod alil-metil- i di-metil-tiosulfinata, dok su kod alicina vrlo malo izraženi. Koristeći zavisnost po kojoj je odnos molarnih apsorptivnosti istog tiosulfinata na dve talasne dužine (240 nm i 254 nm) u istom rastvaraču konstantna veličina [70] određene su apsorbcije i odnos apsorbcija za alicin i druge tiosulfinate u različitim rastvaračima (voda, metanol, heksan/izo-propil alkohol, 95/5, v/v), koje su u saglasnosti sa literaturnim vrednostima molarnih apsorptivnosti. Za alicin, izolovan iz vodenog ekstrakta belog luka, odnos koji odgovara odnosu molarnih apsorptivnosti je 0,655 u vodi, 0,793 u metanolu i 0,773 u heksan/izo-propil

alkohol (95/5, v/v) i slaže se sa vrednostima za sintetisani alicin. Izgled UV-spektra sintetisanog alicina dat je na slici 16.

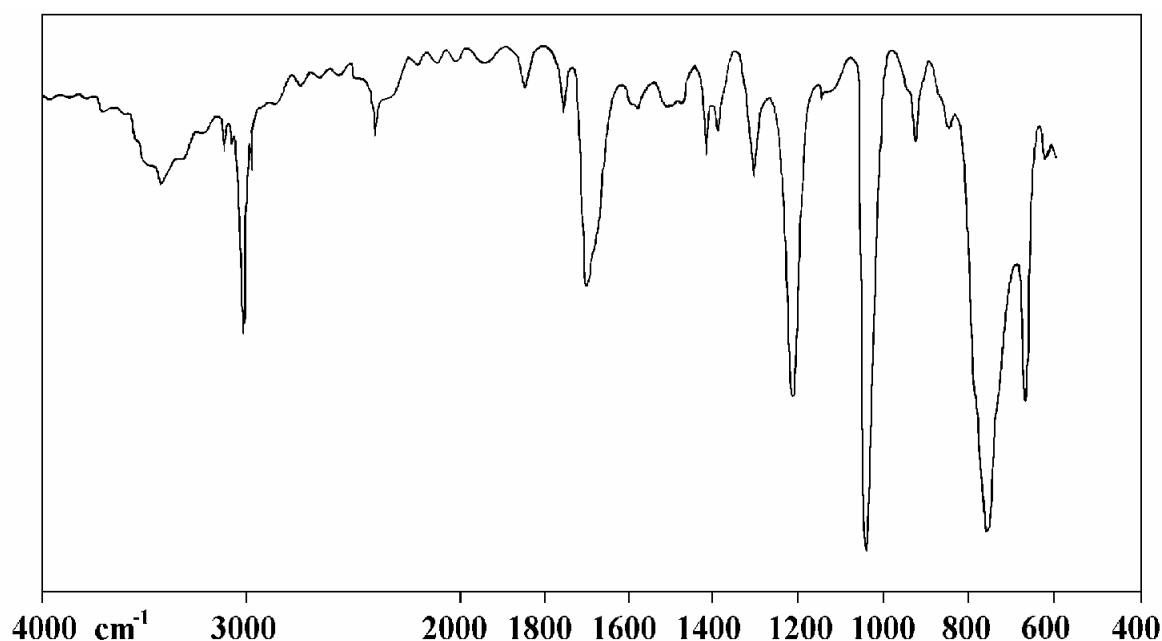


Slika 16 UV-spekatar sintetisanog alicina ($43,08 \mu\text{g}/\text{cm}^3$; voda)

Opšte je poznato da bezbojne supstance, koje poseduju karakteristične funkcionalne grupe (hromofore i auksohrome), apsorbuju fotone nevidljivog, ultraljubičastog dela elektromagnetnog zračenja, i da apsorbovana svetlost ima takvu talasnu dužinu da njen elementarni kvant, $h\nu$, odgovara razlici energije elektronskog sistema molekula u osnovnom i pobuđenom energetskom nivou. Apsorpcione trake koje odgovaraju elektronskim prelazima u ovoj oblasti, postoje kod alicina. Naime u UV-spektru vodenog rastvora alicina (slika 16), mogu se uočiti dve trake čiji su maksimumi na 198 nm i 254 nm. Intenzivna uska traka sa maksimumom apsorpcije na 198 nm potiče od dozvoljenog $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza, izolovane C=C veze kao hromofora. Od ovog hromofora javlja se i zabranjeni, $n(p_y) \rightarrow \pi^*$ prelaz koji se detektuje u bliskoj ultra-ljubičastoj oblasti kao slaba traka na talasnoj dužini od 254 nm. Kao što je već poznato, grupe koje sadrže elektronske parove, takozvane auksohrome, imaju batohromni uticaj na apsorpciju C=C veze za koju su vezane. Ovo je objašnjeno preklapanjem orbitale slobodnog elektronskog para sa π -orbitalom dvogube veze, pri čemu nastaju dve popunjene ψ_1 i ψ_2 i jedna antivezivna ψ_3^* - orbitala. Stabilnija vezivna orbitala ψ_1 ima nižu energiju u poređenju sa energijom prvobitne π -orbitale izolovane dvogube veze, a druga popunjena orbitala ψ_2 ima od nje višu energiju. Istovremeno, ψ_3^* - orbitala ima nešto viši energetski sadržaj u odnosu na π^* -orbitalu izolovane dvogube veze. Međutim, energetska razlika između ψ_3^* - i ψ_2 -orbitale niža je od energetske razlike

između π^* - i π -orbitala kod nekonjugovane dvogube veze, a direktna posledica toga je batohromno pomeranje. S toga u molekulu alicina auksohroma S=O, koja nije direktno vezana za C=C vezu ima manji hipsohromni uticaj nego li obično na $n(p_y) \rightarrow \pi^*$ prelaz i manji batohromni efekat na $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaz. Pored navedena dva prelaza u S=O grupi se javlja i dozvoljeni $n \rightarrow \sigma^*$ prealaz, koji daje relativno intenzivnu traku u oblasti oko 180-190 nm, tj. dovodi do hiperhromnog efekta u oblasti u kojoj se javlja i $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaz, što se vidi na UV-dijagramu alicina (slika 16).

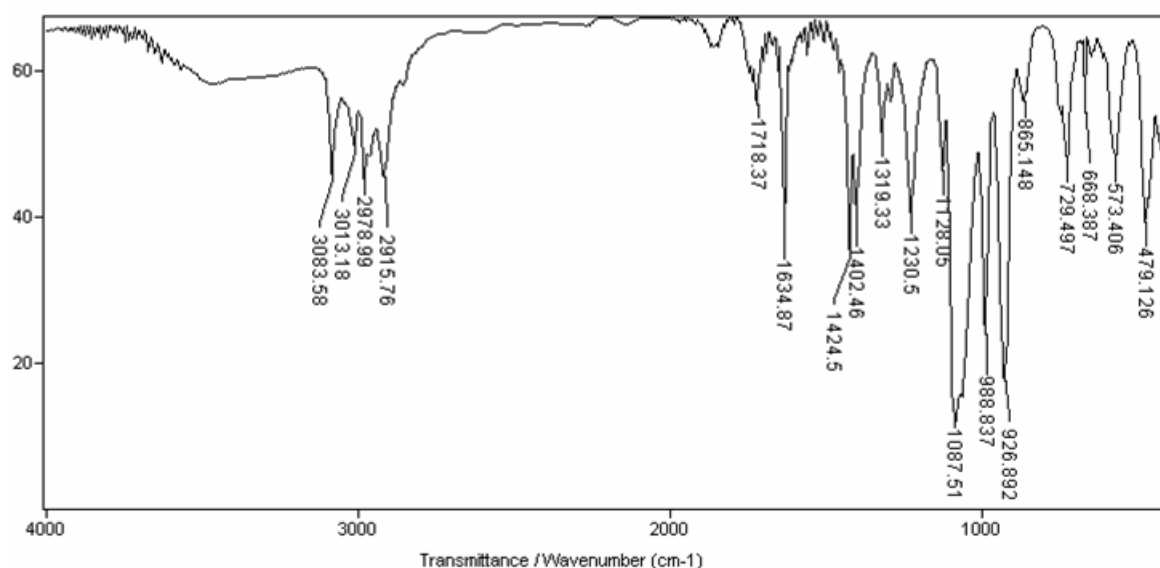
Infracrvena spektroskopija. U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o infracrvenoj spektroskopiji sintetisanog alicina. U našim ranijim ispitivanjima analiziran je prirodni alicin, izolovan iz vodenog ekstrakta belog luka [70], infracrvenom spektroskopijom. Prisustvo trake u oblasti valencionih vibracija na oko 1090 cm^{-1} je indikativna za S=O grupu, karakterističnu za tiosulfinate tj. alicin. IC spektar prirodnog alicina dat je na slici 17.



Slika 17 IC-spektar alicina izolovanog iz vodenog ekstrakta belog luka.

U IC spektru sintetisanog alicina (slika 18) u oblasti oko 3000 cm^{-1} postoje više traka slabog intenziteta koje potiču od asimetričnih (ν_{AS}) i simetričnih (ν_S) valencionih C-H vibracija alkenkog dela molekula i to: ν_{AS} (C-H) na 3083 cm^{-1} i ν_S (C-H) na 2978 cm^{-1} , kod terminalnih alkena. Deformacione C-H vibracije u ravni, δ (C-H), se kod ovog tipa alkena očekuju

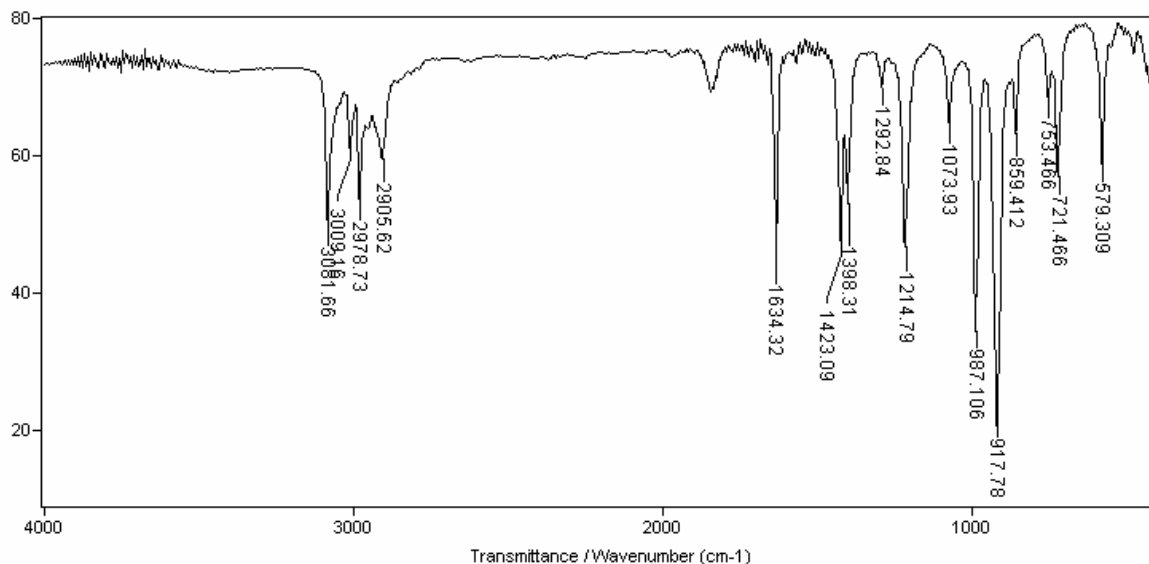
na oko 1420 i 1300 cm^{-1} prema literaturnim podacima [26] U spektru alicina (slika 18) se u ovoj oblasti nalaze dve trake, jedna na 1423 cm^{-1} , druga na 1318 cm^{-1} , koje bi po svom položaju, obliku i intenzitetu trebalo pripisati dvema deformacionim vibracijama u ravni, $\delta(\text{C-H})$. Za terminalne alkene karakteristična je oblast deformacionih C-H vibracija van ravni, $\gamma(\text{C-H})$. Kod terminalnih alkena tipa, $\text{CH}_2=\text{CHR}$, u oblasti deformacionih vibracija van ravni, $\gamma(\text{C-H})$, (1000-800 cm^{-1}) se očekuju dve trake, jedna na oko 990 cm^{-1} i druga oko 920 cm^{-1} , čiji overton se očekuje na 1800 cm^{-1} . U spektru alicina u ovoj oblasti postoje trake na 989 i 927 cm^{-1} , koje su rezultat $\gamma(\text{C-H})$ vibracija i traka slabog intenziteta na 1860 cm^{-1} kao overton trake na 927 cm^{-1} . Prisustvo trake jakog intenziteta na 1087 cm^{-1} je indikativno za valencione vibracije, S=O grupe, što je i jedna od glavnih potvrda strukture alicina, i u saglasnosti je sa IC spektrom prirodnog alicina. Spektar sintetisanog i prečišćenog alicina dat je na slici 18.



Slika 18 FT-IC spektar sintetisanog i prečišćenog alicina

Alil-disulfid polazni supstrat za sintezu alicina, koji se po hemijskoj strukturi razlikuje od alicina po tome što ne poseduje S=O grupu, ima veoma sličan spektar sa alicinom (slika 19). Naime, ovde je odsutna traka na 1087 cm^{-1} , što se očekuje, ali je prisustvo ostalih traka od alilnog dela molekula identično sa spektrom alicina. Trake od valencionih i deformacionih vibracija u ravni, $\delta(\text{C-H})$, i van ravni, $\gamma(\text{C-H})$, idući od disulfida do sintetisanog proizvoda nisu promenile svoju frekvenciju, oblik i intenzitet, na osnovu čega

se može zaključiti da u toku sinteze nisu narušene terminalne alkenske veze. Spektar alil-disulfida dat je na slici 19.



Slika 19 FT-IC spektar alil-disulfida

Protonska nuklearna magnetna rezonanca ($^1\text{H-NMR}$). Kada se atomska jezgra nekih elemenata (^1H , ^{13}C , ^{19}F) izlože dejstvu jakog i homogenog spoljašnjeg polja (B_0) i istovremeno ozrače elektromagnetnim talasima iz radiofrekventnog (RF) dela spektra dolazi do takozvane nuklearne magnetne rezonance (NMR). NMR predstavlja izmenu energije između jezgara i RF-zračenja prilikom koje jedan broj jezgara apsorbuje, a preostali broj emituje zračenje iste frekvencije. Nuklearna magnetna rezonanca ograničena je samo na atomska jezgra koja imaju ugaoni moment (spin, I) Takva jezgra imaju i magnetni moment (μ). Ugaoni moment jezgra definisan je spin kvantnim brojem (I). Kod jezgra kod kojih je $I=0$ (^{12}C , ^{16}O , ^{32}S) ugaoni moment je nula i kao posledica toga nemaju ni magnetni moment ($\mu=0$). Takva jezgra ne stupaju u rezonanciju sa RF zračenjem i ne mogu da se detektuju NMR spektroskopijom. Postojanje ugaonog, odnosno magnetnog momenta uslovljeno je brojem protona (p) i neutrona (n) u atomskom jezgru. Ako su p i n parni brojevi onda je $I=0$ i takva jezgra su spin neaktivna, ako je $p+n$ neparno, što znači da je jedan od ovih brojeva neparan a drugi paran, tada I ima polovinu vrednosti ($1/2$, $3/2$, $5/2$) i ta jezgra su spin aktivna, stupaju u rezonanciju, ako su p i n neparni, I ima celobrojne vrednosti ($1,2,3$...) i takva jezgra su takođe spin aktivna. U odsutvu spoljašnjeg magnetnog polja ($B_0=0$), magnetni momenti, zbog termalnog kretanja, neprekidno menjaju svoj pravac,

tako da su u svakom trenutku haotično usmereni. Zbog toga sva jezgra imaju istu prosečnu energiju (E). Pod dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja (B_0), kod spin aktivnih jezgara, magnetni momenti zauzimaju dozvoljene orijentacije čije su energije proporcionalne jačini polja B_0 . Prema kvantno mehaničkim pravilima broj dozvoljenih orijentacija (n) određen je spin kvantnim brojem (I) prema jednačini:

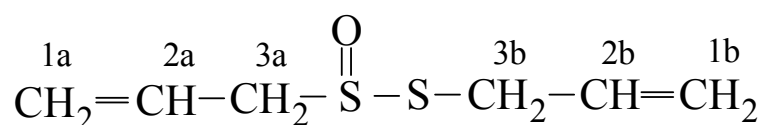
$$n = 2I + 1 \quad (8)$$

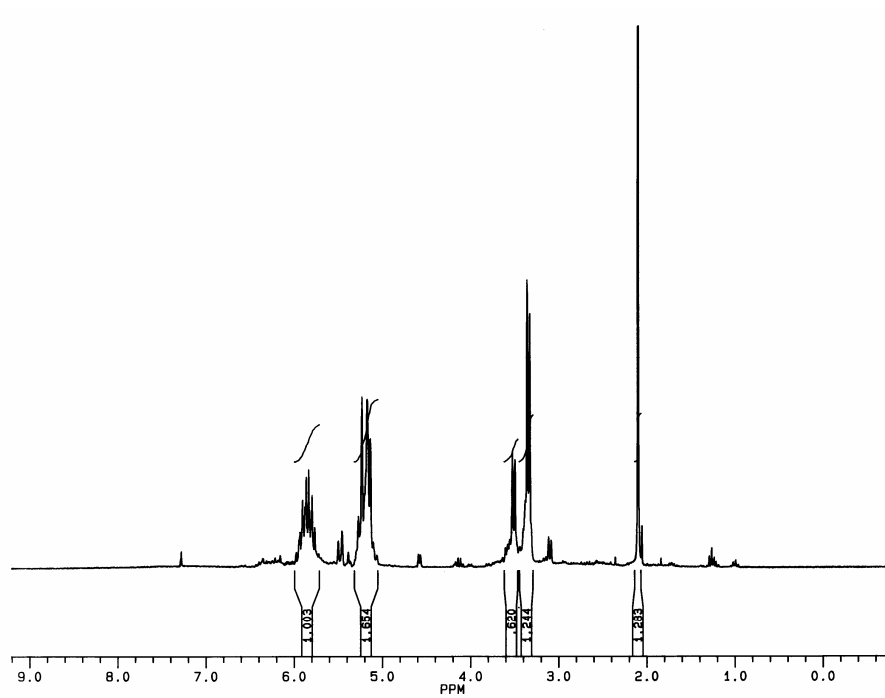
Pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja spinovi se približno ravnomerno raspoređuju po energetskim nivoima. Međutim postoje izvesna mala odstupanja, koja su posledica, različitih energetskih sadržaja i dirigovana su Boltzman-ovim zakonom. Prema ovom zakonu najveća je zastupljenost najnižeg energetskog nivoa, tj. javlja se mali višak jezgra na donjem nivou pa će preovlađivati apsorpcija energije iz oblasti RF-zračenja što daje signal u NMR spektru. S obzirom da spin aktivna jezgra posmatranih atoma imaju i elektrone u elektronskom omotaču i određenu hemijsku okolinu (ostali atomi u molekulu) jasno je da će imati različita pomeranja u NMR-spektru jer će ispoljiti i njihov uticaj.

S obzirom da su u alicinu prisutna vodonikova jezgra koja su spin aktivna, moguće je primenom NMR-spektroskopije odrediti tj. dokazati njegovu hemijsku strukturu. Ova metoda je takođe i u literaturi znatno više primenjivana od strane brojnih istraživača [3, 4, 15] za karakterizaciju i određivanje hemijske strukture prirodnog i sintetičkog alicina. Primena NMR spektroskopije za strukturalna određivanja zasnovana je na vezi između rezonancione (precesione) frekvencije posmatranog jezgra i jačine efektivnog magnetnog polja koje ono oseća u molekulu. Sintetisanom i prečišćenom alicinu snimljen je $^1\text{H-NMR}$ spektar u CDCl_3 uz primenu internog standarda tetrametilsilana (TMS) i dat je na slici 20.

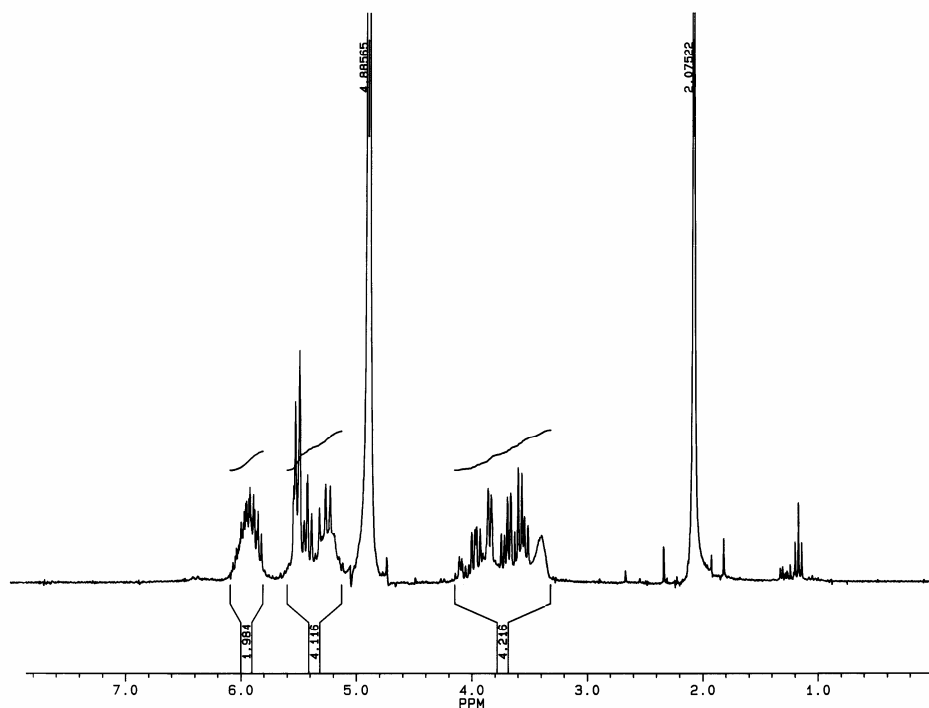
Takođe je snimljen $^1\text{H-NMR}$ spektar sintetisanog i prečišćenog alicina u D_2O , uz primenu TMS-a kao eksternog standarda (slika 21) u cilju dokazivanja strukture alicina.

U molekulu alicina uočavaju se tri tipa protona i to 1a, 2a, 3a, 1b, 2b i 3b što se vidi i iz prikazanih spektara na slikama 20 i 21.





Slika 20 ¹H-NMR spektar sintetisanog i prečišćenog alicina snimljen u CDCl₃



Slika 21 ¹H-NMR spektar sintetisanog i prečišćenog alicina snimljen u D₂O

Očigledno je da postoje velike razlike između hemijskih pomeranja pojedinih tipova protona, što je u direktnoj vezi sa njegovom ukupnom zaštitnom konstantom. To je rezultat dejstva više različitih magnetnih uticaja njihove odgovarajuće okoline. Hemijska pomeranja protona iz fragmenta $\text{CH}_2=\text{C}-$ (1a i 1b protoni) javljaju se na δ 5,16-5,3 i to kao dublet zbog magnetne interakcije susednih CH protona (2a i 2b) koji dovodi do cepanja signala tj. sprezanja spinova. Protoni iz fragmenta $\text{C}=\text{CH}-\text{C}$ (2a i 2b) takođe imaju velika hemijska pomeranja na δ 5,8-5,96. Signal se cepa na multiplet usled magnetnih intrakcija susednih protona iz fragmenta $\text{CH}_2=\text{C}$ i $\text{C}-\text{CH}_2$ (1a i 3a tj. 1b i 3b). Ovako visoka hemijska pomeranja kod 1a, 2a, 1b i 2b protona uslovljena su elektronskom gustinom oko protona koji su direktno vezani za sp^2 -hibridizovane ugljenike $\text{C}=\text{C}$ veze, koji je elektronegativniji od sp^3 -hibridizovanog ugljenika, zato što je veći udeo 2s orbitale u hibridnoj orbitali sp^2 , tako da su elektroni prostih σ -veza u kojima one učestvuju, više pomereni ka ugljeniku. S obzirom da hemijsko pomeranje tj. magnetna oklina protona u $\text{C}=\text{C}$ vezi zavisi od dijamagnetne anizotropije, koja potiče od kruženja π -elektrona dvogube veze oko pravca spoljašnjeg polja B_0 , i dovodi, takođe do pomeranja NMR-signala ka većim δ -vrednostima. Efekat je najači kada je dvoguba veza u ravni normalnoj na B_0 , kada najviše dolaze do izražaja kružne struje π -elektrona. U ostalim orijentacijama prema B_0 , kroz koje brzo prolazi $\text{C}=\text{C}$ veza prilikom rotacije u rastvoru, indukovana polja su znatno manja i imaju neznatan uticaj na magnetni anizotropni efekat. Magnetno polje koje indukuju π -elektroni svojom cirkulacijom istog je smera sa B_0 , pa su protoni na $\text{C}=\text{C}$ vezi manje zaštićeni nego što bi se to očekivalo, na osnovu elektronske gustine, tj. lokalne dijamagnetne zaštite, pa iz tog razloga signali alilnih protona koji se nalaze na sp^2 -ugljenicima imaju izuzetno velika hemijska pomeranja. Protoni iz fragmenta $\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}=\text{O}$ i $\text{S}-\text{CH}_2-\text{C}$ (3a i 3b protoni) imaju hemijska pomeranja na δ 3,25-3,6. NMR-signal ovih protona u spektru daje dublete, tj. dolazi do cepanja signala usled magnetne interakcije susednih protona iz fragmenta $\text{C}-\text{CH}=\text{C}$ tj. 2a i 2b protona. Kako ovi protoni (α protoni u α -položaju prema dvoguboj vezi) imaju nešto veća hemijska pomeranja u odnosu na odgovarajuće protone iz zasićenih jedinjenja, jer se nalaze u oblasti paramagnetnog dejstva dvogube veze, tj. anizotropija susedne dvogube veze utiče na hemijsko pomeranje signala protona ka većim vrednostima ppm-a vezanih za sp^3 hibridizovan ugljenikov atom. Ipak, zbog veće udaljenosti od dvogube veze, na α -protone tj. protone na sp^3 -ugljenikovom atomu (3a i 3b protoni) imaju slabije paramagnetno dejstvo protoni na sp^2 hibridizovanim ugljenikovim atomima. Takođe je negativni induktivni efekat (-I), koji smanjujući lokalnu dijamagnetnu zaštitu, deluje u istom pravcu, znatno slabiji na 3a i 3b protone nego na protone $\text{C}=\text{C}$ veze, ali

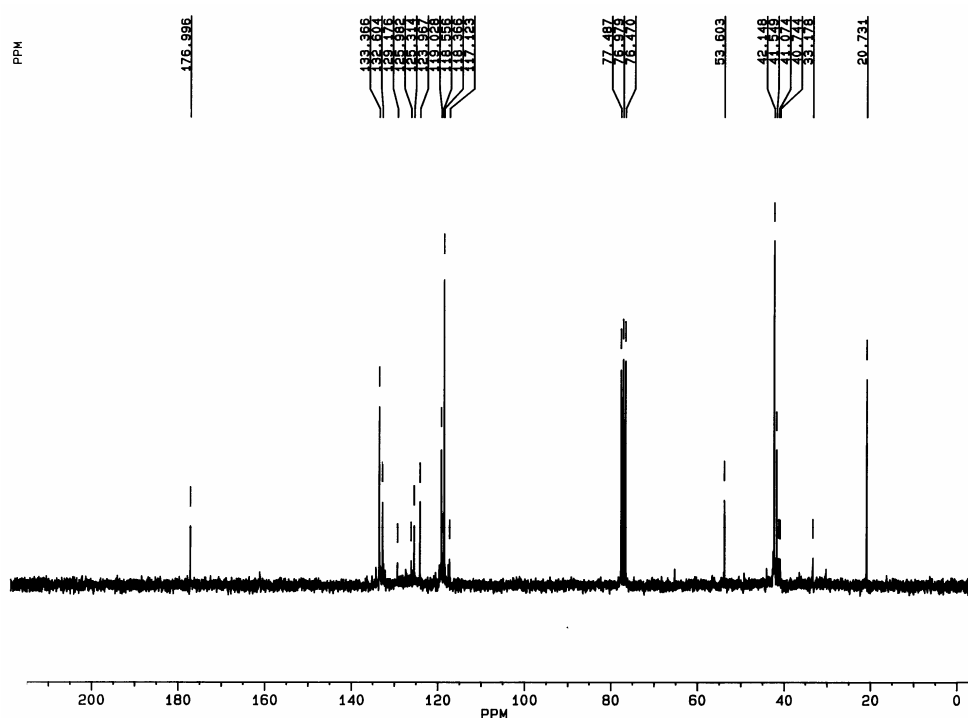
ipak dovodi do povećanja hemijskog pomeranja signala u proseku za nekoliko δ jedinica u odnosu na zasićene alkane. S obzirom da je u bližoj okolini protona 3a i 3b i sumpor, kao hetero-atom sa negativnim induktivnim efektom, to se dodatno povećava hemijsko pomeranje protona na sp^3 hibridizovanom ugljenikovom atomu. Sumpor za koga je vezan kiseonik, ima smanjenu elektronegativnost te dublet u NMR spektru koji potiče od protona 3a ima manje hemijsko pomeranje od protona 3b u čijoj okolini se nalazi sumpor bez vezanog kiseonika na sebi. Kod povećane elektronegativnosti sumpora, smanjuje se elektronska gustina na α -ugljeniku, a takođe, mada u znatno manjoj meri, i na protone koji su za njega vezani. Ovim se smanjuje lokalna dijamagnetna zaštita i povećava hemijsko pomeranje 3b protona iz fragmenta $S-CH_2-C=C$ tj. dublet se javlja pri većim δ jedinicama i to na δ 3,5-3,6. Uporedne vrednosti hemijskih pomeranja različitih tipova protona u molekulu alicina u našim ispitivanjima i iz literature [4, 15] u 1H -NMR spektrima snimljeni u različitim rastvaračima (D_2O i $CDCl_3$) date su u tabeli 4.

Tabela 4 Vrednosti relativnih hemijskih pomeranja u odnosu na tetra-metil-silan (TMS) kao interni odnosno eksterni standard različitih tipova protona u molekulu alicina u našim ispitivanjima (*) i literaturi [4, 15] u 1H -NMR spektrima snimljeni u D_2O i $CDCl_3$

Struktura fragmenta	$CH_2=C-$	$C=CH-C$	$C-CH_2-S=O$	$-C=CH_2$	$C-CH=C$	$O=S-S-CH_2-C$
Broj protona	2H	1H	2H	2H	1H	2H
Tip protona	1a	2a	3a	1b	2b	3b
* hem. pomeranja (ppm) u $CDCl_3$	5,16-5,3	5,8-5,96	3,25-3,6	5,16-5,3	5,8-5,96	3,25-3,6
* hem. pomeranja (ppm) u D_2O	5,2-5,6	5,8-6,0	3,6-3,8	5,2-5,6	5,8-6,0	3,6-3,8
[15] hem. pomeranja (ppm) u $CDCl_3$	5,18-5,49	5,9	3,78	5,18-5,49	5,9	3,78
[4] hem. pomeranja (ppm) u $CDCl_3$	5,16-5,45	5,8-5,96	3,7-3,86	5,2-5,45	5,8-5,96	3,7-3,86

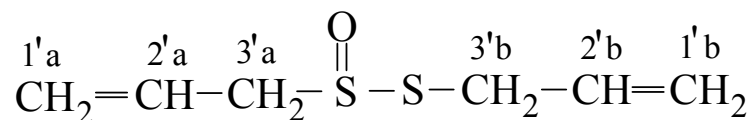
Pulsna nuklearna magnetna rezonanca ugljenika-13 (^{13}C -NMR). Ova metoda je relativno kasno našla primenu za određivanje hemijske strukture različitih organskih jedinjenja zbog male prirodne zastupljenosti spin aktivnih izotopa ugljenika-13 (^{13}C) oko 1,11 %, kao i slabe osetljivosti pri detekciji ugljenika ^{13}C . To je zahtevalo znatno veću količinu (koncentraciju) uzorka, koja je s druge strane povezana i sa brojem ugljenikovih atoma u ispitivanom molekulu (veći broj C-atoma zahteva veću koncentraciju uzorka). Spektralni opseg u kome se nalaze NMR-signalni ispitivanog jezgra ^{13}C ugljenika znatno je širi u odnosu na spektralni oseg za protone. Na ugljenike koji čine osnovni skelet jedinjenja i delove funkcionalnih grupa, znatno jače se ispoljavaju direktni elektronski uticaji supstituenata, za razliku od protona na čiju magnetnu okolinu ovi efekti deluju slabije, zbog njihovog posrednog prenosa preko ugljenika. Zato ^{13}C -NMR spektri pružaju preciznije i direktnije podatke o strukturi i stereochemiji molekula od ^1H -NMR spektara. Broj signala u ^{13}C -NMR spektrima određen je brojem neekvivalentnih jezgara ugljenika u molekulu ispitivanog jedinjenja.

U novije vreme istraživači su primenjivali ^{13}C -NMR spektroskopiju za određivanje strukture različitih hemijskih jedinjenja kao i alicina [4, 27] ili za potvrdu poznatih hemijskih struktura. U našim ispitivanjima sintetisanom i prečišćenom alicinu snimljen je ^{13}C -NMR spektar u CDCl_3 koji je dat na slici 22.



Slika 22 ^{13}C -NMR spektar sintetisanog i prečišćenog alicina snimljen u CDCl_3

Na spektru se uočavaju različiti tipovi ugljenika u molekulu alicina, a o kojim se ugljenicima tačno radi vidi se iz molekulske formule alicina označeni kao 1'a, 2'a, 3'a, 3'b, 2'b i 1'b.



Vrednosti hemijskih pomeranja signala neekvivalentnih ugljenika ^{13}C u ^{13}C -NMR spektrima u molekulu alicina snimljeni u CDCl_3 i literaturni podaci dati su u tabeli 5.

Tabela 5 Vrednosti hemijskih pomeranja signala neekvivalentnih ugljenika ^{13}C u ^{13}C -NMR spektrima u molekulu alicina snimljeni u CDCl_3 (*) i upoređeni sa literaturnim [4, 27] vrednostima

Tip C-atoma u molekulu alicina	1'a	2'a	3'a	1'b	2'b	3'b
* hemijska pomeranja (ppm) u CDCl_3	123,96	132,6	53,6	118,55	125,3	33,17
[4] hemijska pomeranja (ppm) u CDCl_3	124,63	132,71	59,6	118,91	125,63	34,87
[27] hemijska pomeranja (ppm) u CDCl_3	124,0	133,0	59,0	118,0	126,0	35,0

Iz tabele se vidi da su hemijska pomeranja za sve tipove ugljenika C-13 u molekulu sintetisanog alicina u našim ispitivanjima ista sa literaturnim vrednostima [4, 27], što ukazuje da je postupak sinteze i prečišćavanja zadovoljavajući jer se dobija čisto jedinjenje što potvrđuje i priloženi ^{13}C -NMR spektar (slika 22).

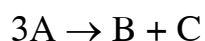
Dok kod protona najveći doprinos ukupnoj zaštiti potiče od lokalnog dijamagnetnog efekta 1s-elektrona (σ^{dia}), kod ugljenika C-13 dominantan je paramagnetni uticaj (σ^{para}) elektrona u orbitalama bez sferne simetrije. Dakle sa povećanjem σ^{para} , smanjuje se ukupna zaštita posmatranog jezgra. Kod ugljenika C-13 najveći doprinos ukupnoj zaštiti daje paramagnetni efekat elektrona iz aksijalno simetričnih 2p-orbitala. Ovaj efekat je rezultat mešanja osnovnih elektronskih energetske stanja (σ , π i n) sa pobuđenim (σ^* i π^*), do koga dolazi pod uticajem primenjenog magnetnog polja. Lokalni

paramagnetni efekat zavisi od energije pobuđivanja elektrona i od elektronske gustine na posmatranom ugljeniku C-13, prirode veze i radijusa 2p-orbitale sa čijim povećanjem se smanjuje σ^{para} . Zbog toga su hemijska pomeranja ugljenika dvostrukih veza u spektralnoj oblasti 80-160 ppm. U molekulu alicina sp^2 -hibridizovani ugljenikovi atomi (1'a, 2'a, 2'b i 1'b) imaju relativna hemijska pomeranja na 123,67; 133,37; 118,37; 125,98 ppm, respektivno koja su veća od relativnih hemijskih pomeranja sp^3 -hibridizovanih ugljenikovih atoma, što je rezultat delovanja lokalnog paramagnetnog efekta (σ^{para}) koji je smanjen, zbog povećane elektronegativnosti sp^2 -hibridizovanog ugljenikovog atoma u odnosu na sp^3 -hibridizovani ugljenik i povećane elektronske gustine dvostruke π -veze. Ugljenici (3'a i 3'b) sp^3 -hibridizovani u molekulu alicina imaju relativna hemijska pomeranja na 53,60 i 33,178 ppm, respektivno. Ova hemijska pomeranja su pomerena ka nešto većim vrednostima ppm-a, nego kod alkana jer na ova jezgra ugljenika imaju uticaj heteroatomi, sumpora, koji dijamagnetno pomeraju rezonancu. Takođe ovi ugljenikovi atomi trpe i uticaj električnog polja polarne grupe $-S^+-O^-$, zbog čega dolazi do preraspodele i u vezama drugih ugljenika. To uslovljava pojavu signala u ^{13}C -NMR spektru na većim vrednostima ppm-a. Hemijsko pomeranje ugljenika 3'a je nešto veće od relativnog hemijskog pomeranja ugljenika 3'b zbog veće elektronske gustine na sumporu za koji je vezan 3'b ugljenikov atom nego na sumporu za koji je vezan kiseonik. Triplet, tri signala približnog intenziteta (1:1:1), koji se javljaju u ^{13}C -NMR spektru alicina, na 76,47; 76,98; 77,487 ppm karakteristična su za primenjeni rastvarač u kome je snimljen spektar, tj. CDCl_3 .

4.2. AJOENI

4.2.1. Ispitivanje kinetike sinteze ajoena pomoću HPLC

Ajoeni su farmakološki aktivna jedinjenja. U ovom radu su dobijena organskom sintezom polazeći od alicina kao prekursora. Iz tri molekula alicina nastaju dva molekula ajoena i to E-ajoen (*trans*-izomer) i Z-ajoen (*cis*-izomer), prema složenom mehanizmu, po kome najpre dolazi do tioalilizacije zatim eliminacije i kondenzacije alilsulfenske kiseline. Ovaj složeni proces sinteze ajoena se može prikazati sledećom uprošćenom jednačinom:



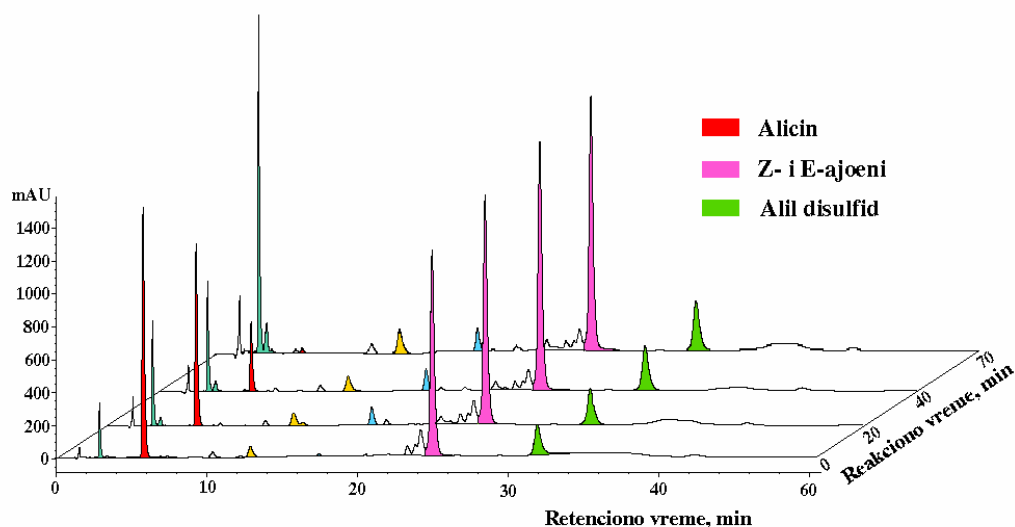
pri čemu je A oznaka za alicin, B oznaka za E-izomer ajoena i C oznaka za Z-izomer ajoena. Kinetika sinteze ajoena praćena je promenom koncentracije alicina sa vremenom pomoću HPLC.

Na slici 23 dati su HPLC hromatogrami reakcione smeše sinteze ajoena iz alicina. Površina pikova je proporcionalna koncentraciji komponenata. U tabeli 6 date su promene koncentracije alicina sa vremenom za sintezu ajoena.

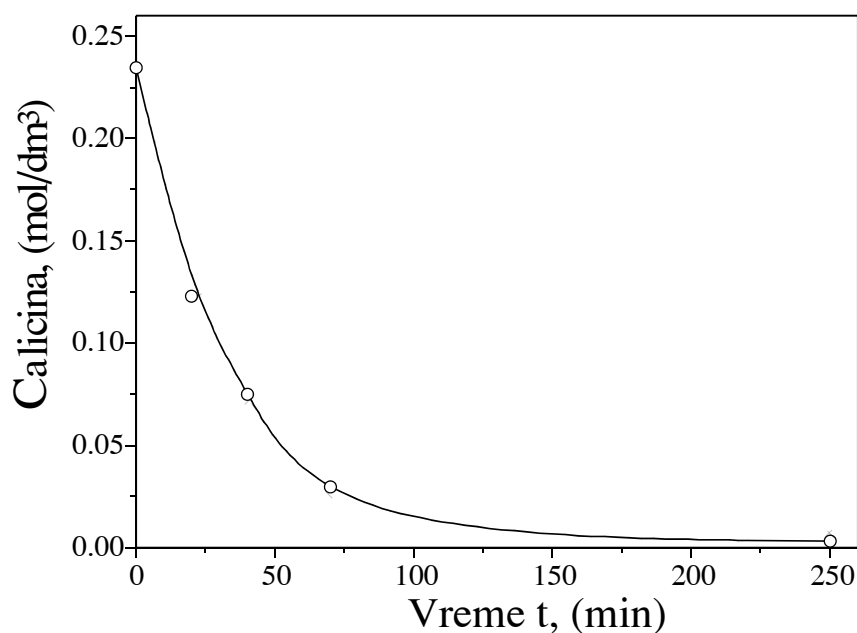
Tabela 6 Promena koncentracije alicina u toku sinteze ajoena

Reaktant	R_t , min	Koncentracija, mol/dm ³				
		0	20	40	70	250
Alicin	5,83	0,2346	0,1229	0,0749	0,0261	0,0033

Retenciono vreme za alicin je 5,83 min, Z-ajoen 25,38 min, E-ajoen 26,68 i alildisulfid 32,00 min. Iz HPLC hromatograma (slika 23) i tabele 6 vidi se da u toku sinteze ajoena koncentracija alicina opada postepeno i do završetka reakcije dolazi posle 250 minuta. Kriva zavisnosti promene koncentracije alicina u acetonu na 80 °C u toku vremena data je na slici 24 i predstavlja eksponencijalnu opadajuću krivu.



Slika 23 HPLC hromatogrami uzoraka uzetih iz reakcione smeše za sintezu ajoena u različitim vremenskim intervalima sinteze ($t = 0, 20, 40, 70, 250$ min)



Slika 24 Promena koncentracije alicina u acetonu na 80 °C

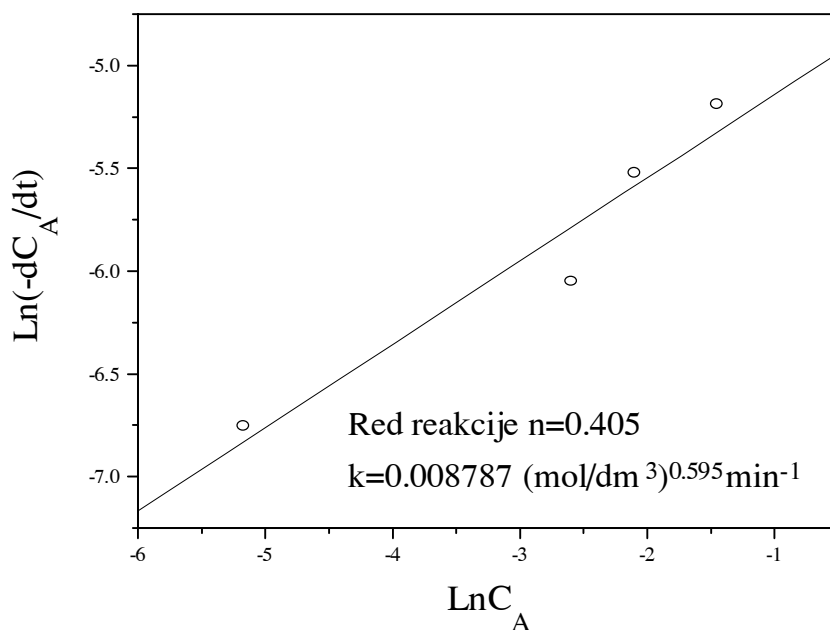
Za određivanje kinetičkih parametara pri sintezi ajoena pošlo se od jednačine za brzinu reakcije n-tog reda:

$$-\frac{dC_A}{dt} = k \cdot C_A^n \quad (9)$$

Logaritmovanjem jednačine 9 i primenom diferencijalne metode analize podataka promene koncentracije reaktanta sa vremenom (slika 24) dobija se jednačina:

$$\ln\left(-\frac{dC_A}{dt}\right) = \ln(k) + n \cdot \ln(C_A) \quad (10)$$

Jednačina 10 predstavlja jednačinu prave iz koje se mogu odrediti kinetički parametri sinteze ajoena ili reakcije raspada alicina tj. konstanta brzine hemijske reakcije (k) i red reakcije (n). Na slici 25 prikazana je pravolinijska zavisnost funkcije $\ln(-dC_A/dt)$ od $\ln(C_A)$, gde je iz nagiba određen red reakcije (n) i ima vrednost $n = 0,405$, a iz odsečka na ordinati određena je vrednost konstante brzine hemijske reakcije (k), koja iznosi $k = 0,008787 \text{ (mol/dm}^3\text{)}^{0,595} \text{ min}^{-1}$.



Slika 25 Određivanje kinetičkih parametara za sintezu ajoena.

Na osnovu dobijenih vrednosti za kinetičke parametre, k i n , jednačina za brzinu reakcije alicina do ajoena za date uslove sinteze ima sledeći oblik:

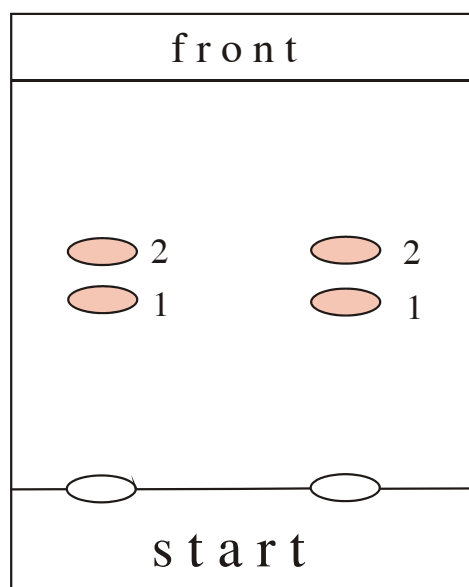
$$(-r_A)[\text{mol/dm}^3 \text{ min}] = 8,787 \cdot 10^{-3} \cdot C_A^{0,405} \quad (11)$$

4.2.2. Razdvajanje strukturnih izomera ajoena i strukturna karakterizacija

4.2.2.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)

U sirovoj reakcionoj smeši pri sintezi ajoena nastaju dva izomera ajoena, E- (*trans*-) i Z- (*cis*-) ajoen. Za razdvajanje ova dva strukturna izomera primenjena je tankoslojna hromatografija na tankom sloju silika gela G 60. Za razvijanje hromatograma korišćen je etilacetat, a na startu ploče nanoseno je 50 μl sirove reakcione smeše. Posle razvijanja hromatograma mrlje su detektovane baznim rastvorom N-etil-maleimida koji je pripremljen u *izo*-propanolu, karakterističan reagens za tio-sulfinatnu grupu prisutnu u strukturnim izomerima ajoena. Boja detektovanih mrlja je svetlo ružičasta, a identifikacija razdvojenih strukturnih izomera izvršena je upoređivanjem

dobijenih R_f vrednosti sa literaturnim R_f vrednostima [20]. Rezultati razdvajanja strukturnih izomera ajoena na tankom sloju silika gela G 60 dati su na slici 26 i u tabeli 7.

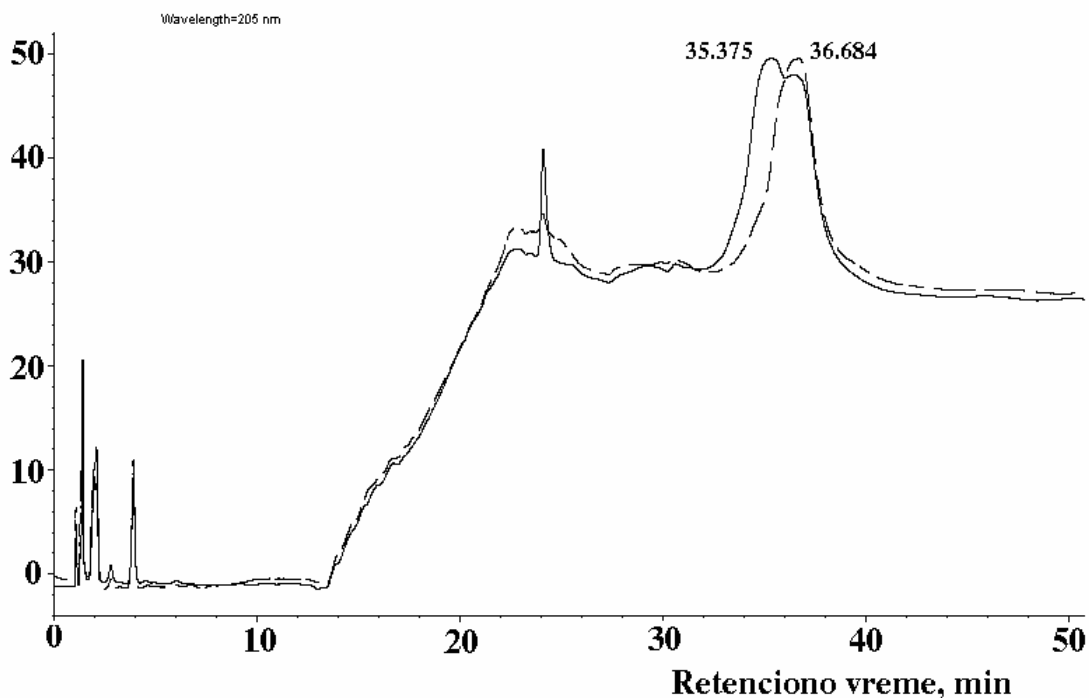


Slika 26 Hromatogram razdvojenih strukturnih izomera ajoena iz sirove reakcione smeše (silika gel G 60; 0,25 mm; 50 μ l; etilacetat; bazni rastvor N-etilmaleimida u *izo*-propanolu; sobna temperatura)

Tabela 7 Rezultati kvalitativnog ispitivanja sadržaja ajoena u sirovoj reakcionoj smeši na silika gelu G 60 upoređeni sa literaturnim vrednostima

Mrlja	R_f -vrednosti uzorka		Literaturne R_f -vrednosti	
	Ajoen	R_f -vrednost	Ajoen	R_f -vrednost
1	E-ajoen	0,49	E-ajoen	0,45
2	Z-ajoen	0,529	Z-ajoen	0,52

Iz prikazanih rezultata vidi se da su dobra slaganja dobijenih R_f -vrednosti sa literaturnim R_f -vrednostima za razdvojene strukturne izomere ajoena, što dokazuje da se pri transformaciji alicina u acetonu na 80 °C dobijaju oba izomera ajoena. Da bi utvrdili koji pik u HPLC hromatogramu odgovara ajoenima, razdvojeni strukturni izomeri ajoena su eluirani sa Si-TLC hromatograma u minimalnoj zapremini acetonitrila, filtrirani na membranskom filtru i analizirani primenom HPLC metode. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 27.



Slika 27 HPLC hromatogram (uslovi rada sa acetonitrilnim rastvorima i gradijentom mobilnih faza) strukturnih izomera ajoena razdvojenih na tankom sloju silika-gela iz sirove reakcione smeše (Z-ajoen: $R_t=35,375$; $R_f = 0,53$ i E-ajoen: $R_t=36,684$; $R_f = 0,49$)

Može se uočiti da ova dva strukturna izomera ajoena imaju vrlo bliska retenciona vremena, što je u saglasnosti sa HPLC analizom sirove reakcione smeše pri ispitivanju kinetike sinteze ajoena i što pokazuje koji od pikova odgovara određenom strukturnom izomeru ajoena.

4.2.2.2. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GH-MS)

Za određivanje kvalitativnog sastava sirove reakcione smeše ajoena primenjena je gasna hromatografija-masena spektrometrija. U sirovoj reakcionoj smeši ajoena registrovano je devetnaest komponenata, a identifikovano devet (47,9 %). Identifikacija razdvojenih komponenata gasnom hromatografijom urađena je na osnovu masenih spektara svake razdvojene komponente (m/e vrednosti i intenziteti pikova pojedinih fragmenata karakterističnih za određenu vrstu jedinjenja). Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8 Podaci o gasno-masenoj analizi (GH-MS) sirove reakcione smeše ajoena

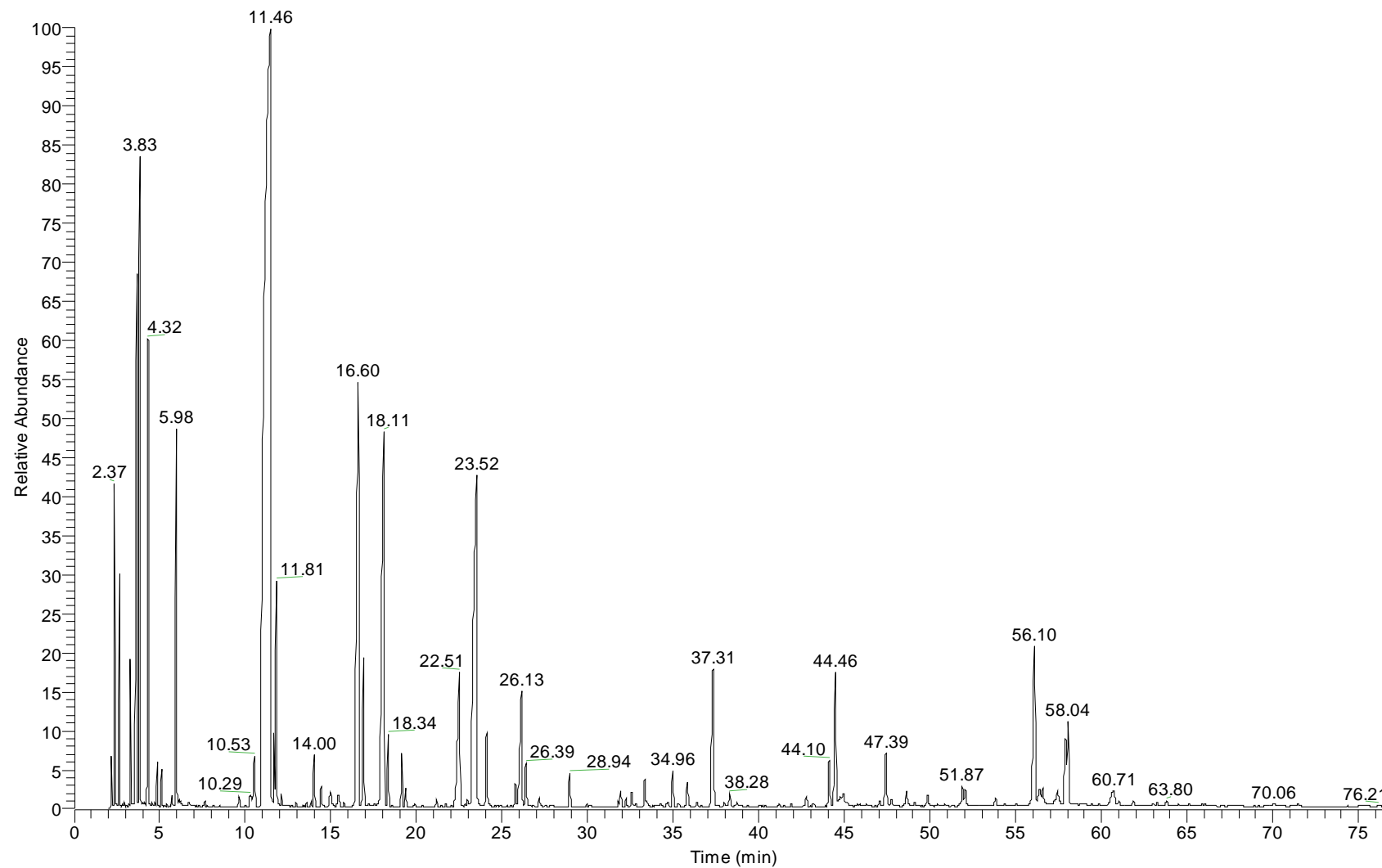
Pik	R _t (min)*	Jedinjenje	M _M **	MS-podaci (m/e vrednosti i relativni intenzitet pika)
1	2,34	metil-alil-sulfid	88	41(5); 45(100); 46(15); 47(77); 61(71); 73(63); 87(81); 88(81)
2	2,64	nepoznato	-	41(34); 43(94); 53(51); 55(93); 83(100); 98(74); 99(14); 100(2)
3	3,58	alil-sulfid	114	41(56); 45(67); 47(39); 71(52); 72(100); 81(36); 99(50); 114(55)
4	3,66	nepoznato	-	41(9); 49(35); 51(40); 65(49); 77(55); 91(100); 103(44); 105(95)
5	3,83	nepoznato	-	41(15); 51(100); 52(32); 63(53); 79(99); 89(34); 91(93); 103(58); 105(99)
6	4,32	nepoznato	-	41(7); 49(23); 51(32); 65(30); 77(47); 89(17); 91(87); 103(44); 105(100)
7	5,97	nepoznato	-	45(58); 52(31); 65(34); 69(52); 71(37); 76(10); 103(100); 105(25); 106(12)
8	11,25	ajoeni	234	41(100); 45(69); 71(55); 73(51); 81(67); 105(47); 113(45); 146(52)
9	11,81	propil-alil-disulfid	148	41(100); 43(65); 45(59); 64(26); 73(27); 75(10); 106(67); 148(70)
10	16,56	3-vinil-4H-1,2-ditiin	144	45(96); 71(94); 72(59); 76(65); 97(65); 103(62); 111(100); 144(80)
11	18,07	2-vinil-4H-1,3-ditiin	144	45(50); 72(17); 71(100); 111(50); 144(40); 103(19)
12	22,50	nepoznato	-	41(100); 45(50); 64(26); 71(13); 97(23); 105(20); 129(5); 162(25); 164(4)
13	23,46	alil-trisulfid	178	41(99); 45(81); 71(45); 73(100); 74(15); 113(77); 114(10); 138(7); 178(9)
14	24,08	izobutil-izotiocijnat	115	41(100); 43(53); 45(52); 73(80); 74(22); 105(12); 115(47)
15	26,17	nepoznato	-	41(100); 45(63); 47(49); 64(57); 73(26); 74(22); 99(10); 114(4)
16	37,24	alil-disulfid	146	41(100); 45(46); 64(50); 81(5); 105(12); 113(17); 146(15)
17	44,42	nepoznato	-	41(100); 45(94); 73(57); 79(17); 103(55); 104(17); 105(13); 113(12); 145(39); 146(5)
18	47,40	nepoznato	-	41(100); 45(59); 64(45); 67(36); 73(32); 95(17); 105(45); 129(18)
19	56,07	nepoznato	-	41(100); 45(92); 71(47); 73(58); 79(13); 103(58); 104(22); 111(12); 113(8); 145(22); 146(5)

* - R_t- retenciono vreme (min)

** - M_M- molekulska masa (g/mol)

RT: 0.00 - 76.98

NL:
1.14E8
TIC MS
Sample
2-2
Acetone



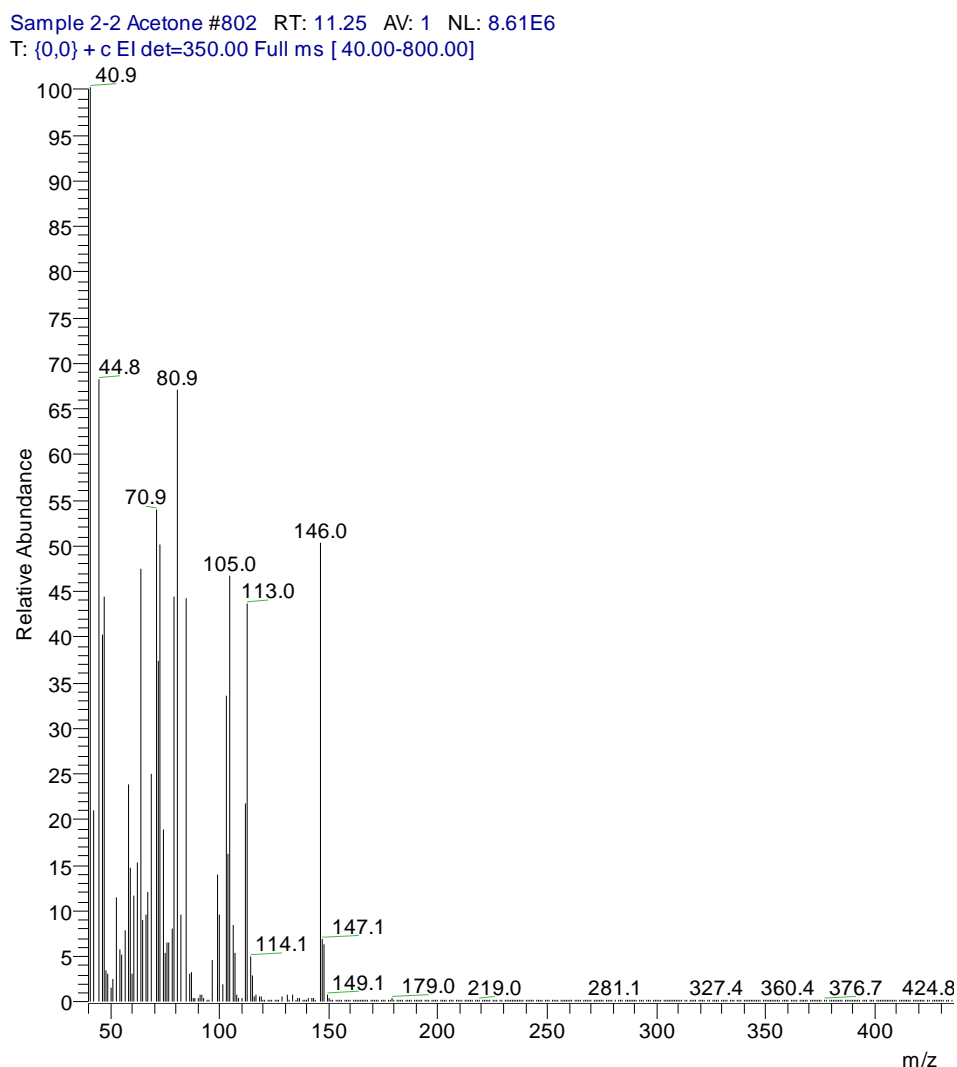
Slika 28 Gasni hromatogram sirove racione smeše ajoena

Gasni hromatogram sirove reakcione smeše ajoena prikazan je na slici 28.

Pikovi od E- i Z-ajoena na gasnom hromatogramu slabo su razdvojeni i javljaju se na 11,38 i 11,46 min, pa se mogu računati kao jedan pik čiji maseni spektar je dat na slici 29.

Maseni spektri preostalih komponenata izdvojenih iz kompleksne reakcione smeše ajoena, pri sintezi ajoena prikazani su u prilogu (P1).

U tabeli 9 prikazane su vrednosti m/e i mogući fragmenti od kojih potiču pikovi u MS-spektru ajoena.



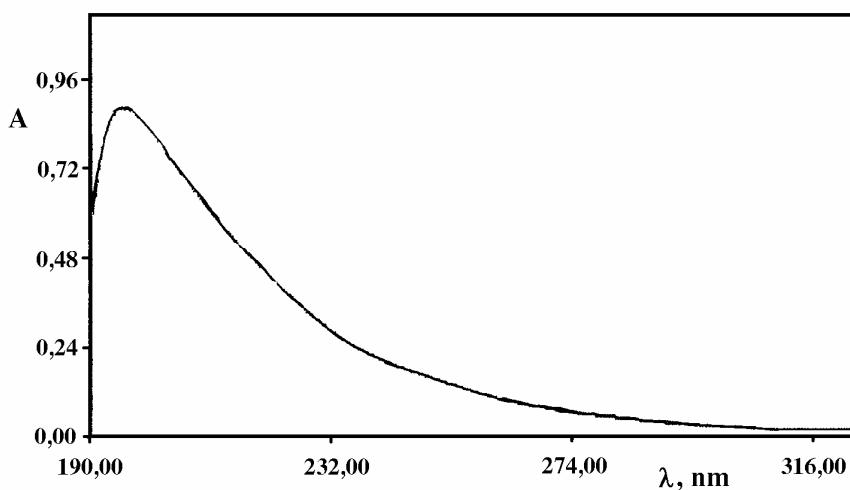
Slika 29 Maseni spektar ajoena izdvojenih gasnom hromatografijom iz sirove rakkione smeše

Tabela 9 Vrednosti m/e i mogući fragmenti od kojih potiču pikovi u MS-spektru ajoena

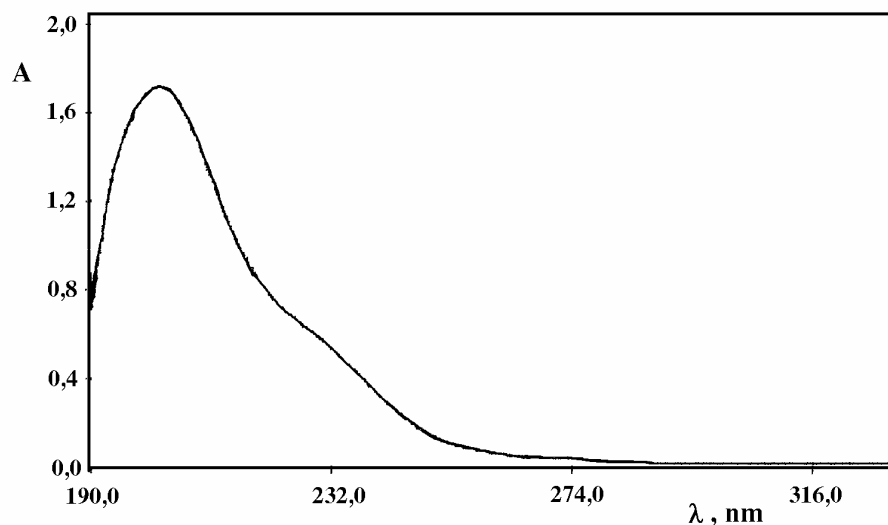
m/e	Fragment	m/e	Fragment
41	$[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2]^+$	81	$[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}]^+$
45	$[\text{S}=\text{CH}]^+$	105	$[\cdot\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2]^+$
71	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{CH} \\ \quad \\ \text{S} - \text{CH} \\ \oplus \end{array}$	113	$[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}]^+$
73	$[\cdot\text{S}-\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2]^+$	146	$[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2]^+$

4.2.2.3. Ultraljubičasta spektroskopija

Izomeri ajoena koji su izdvojeni iz reakcione smeše tankoslojnom hromatografijom eluirani su u acetonitrilu, centrifugirani i filtrirani na membranskon filtru. Dobijenim supernatantima snimljeni su UV spektri u bliskoj ultraljubičastoj oblasti od 190 do 300 nm (slika 30, 31).



Slika 30 UV spektar E-ajoena u acetonitrilu



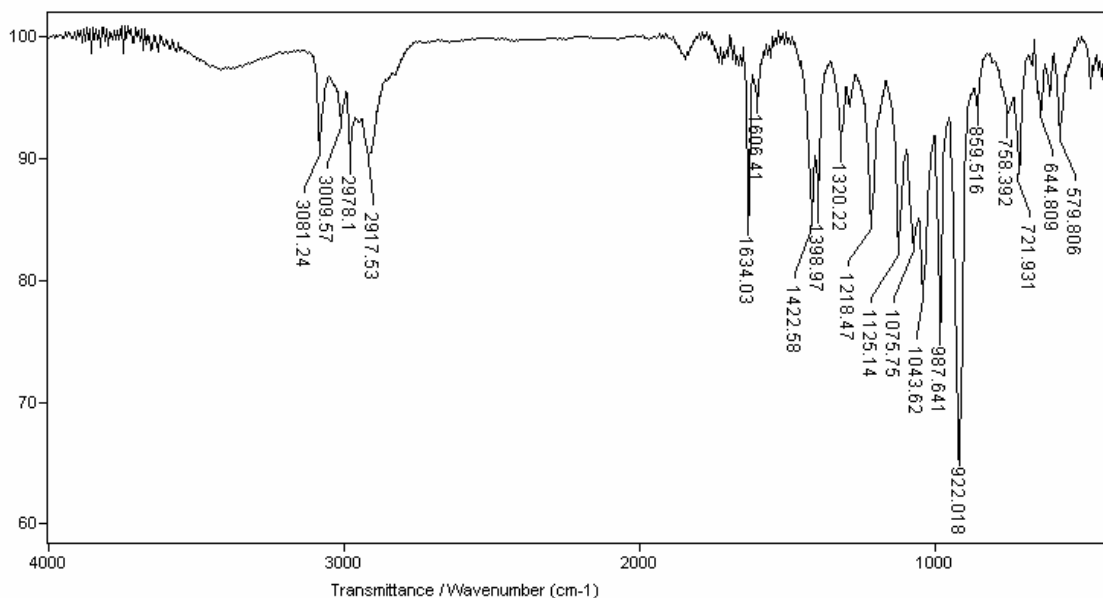
Slika 31 UV spektar Z-ajoena u acetonitrilu

UV spektri obadva izomera ajoena su vrlo slična. Glavni maksimumi se javljaju na 200-215 nm i približavaju se baznoj liniji na oko 280 nm. Sekundarni maksimum kod Z-ajoena javlja se na oko 235 nm, širok je i lakše uočljiv nego kod E-ajoena koji se javlja na 240 nm i teško se uočava.

Glavni maksimumi potiču od dozvoljenog $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza, izolovane C=C veze kao hromofora prisutne u molekulima obadva izomera ajoena. Od ovih hromofora javlja se i zabranjeni, $n(p_y) \rightarrow \pi^*$ prelaz koji se detektuje u bliskoj ultra-ljubičastoj oblasti kao slaba traka na talasnoj dužini od 235 i 240 nm kod Z- i E-ajoena respektivno. U molekulima obadva izomera ajoena prisutna je auksohromna grupa, S=O, koja nije direktno vezana za C=C vezu i ima manji hipsokromni uticaj nego li obično na $n(p_y) \rightarrow \pi^*$ prelaz i manji batohromni efekat na $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaz. Pored navedena dva prelaza u S=O grupi se javlja i dozvoljeni $n \rightarrow \sigma^*$ prelaz, koji daje relativno intenzivnu traku u oblasti oko glavnog maksimuma, tj. dovodi do hiperhromnog efekta u oblasti u kojoj se javlja i $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaz (slika 30 i 31).

4.2.2.4. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom

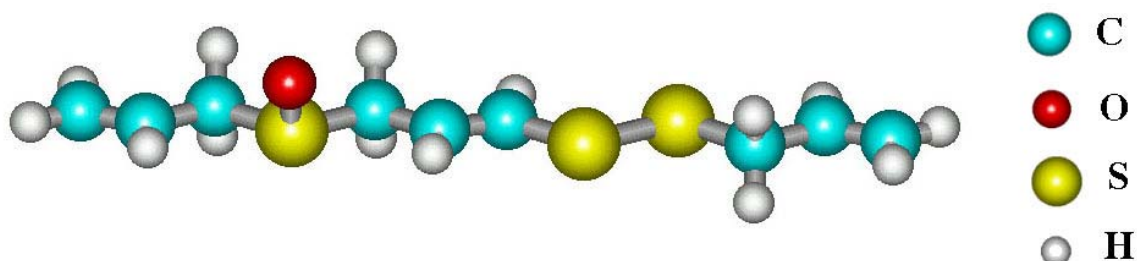
FT-IC spektar ajoena prikazan je na slici 32, i to E-izomera tj. *trans*-ajoena kao stabilnijeg jedinjenja, s obzirom da u toku stajanja Z-izomer postepeno izomerizuje u stabilniji E-izomer ajoena.



Slika 32 FT-IC spektar E-ajoena (film na KBr pločici)

Prisustvo S=O grupe kod alicina dokazano je potojanjem intenzivne trake u FT-IC spektru na 1080 cm^{-1} koja potiče od valencione vibracije $\nu(\text{S}=\text{O})$. U molekulu ajoena koji je dobijen transformacijom alicina je takođe prisutna S=O grupa čije prisustvo je registrovano u IC spektru preko trake koja potiče od valencionih vibracija ove grupe i javlja se na 1076 cm^{-1} . Na 1634 cm^{-1} postoji traka od valencionih vibracija, $\nu(\text{C}=\text{C})$, alkenskih veza prisutnih u molekulu ajoena (dve terminalne C=C veze i jedna disupstituisana C=C veza). Oštar signal koji se javlja na 987 cm^{-1} , rezultat je deformacionih C-H vibracija van ravni, $\gamma(\text{C-H})$, trans supstituisane dvostruke veze, a dva jaka signala na 922 i 1043 cm^{-1} potiču od deformacionih C-H kretanja van ravni, $\gamma(\text{C-H})$, koja su tipična za terminalne alkenske grupe. Karakteristična osobina alkena u poređenju sa alkanima je jača C-H veza, pa bi ona trebala da ima jači signal u IC spektru. U IC spektru ajoena postoji oštar signal na 3080 cm^{-1} koji potiče od valencione asimetrične C-H vibracije, $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, kao i traka na 2978 cm^{-1} , koja je rezultat valencionih simetričnih C-H vibracija, $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$ terminalnih alkena. Valencionna vibracija C-H, $\nu(\text{C-H})$, iz fragmenta R-CH daje signal na 3008 cm^{-1} . Potvrda za prisustvo deformacionih C-H vibracija je pojava

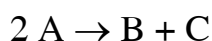
overtona u IC spektru u oblasti talasnih brojeva od 1800 do 1850 cm^{-1} . Ovakvom IC analizom ajoena potvrđena je struktura E-ajoena tj. *trans*-ajoena, glavnog proizvoda pri sintezi ajoena.



4.3. VINILDITIINI

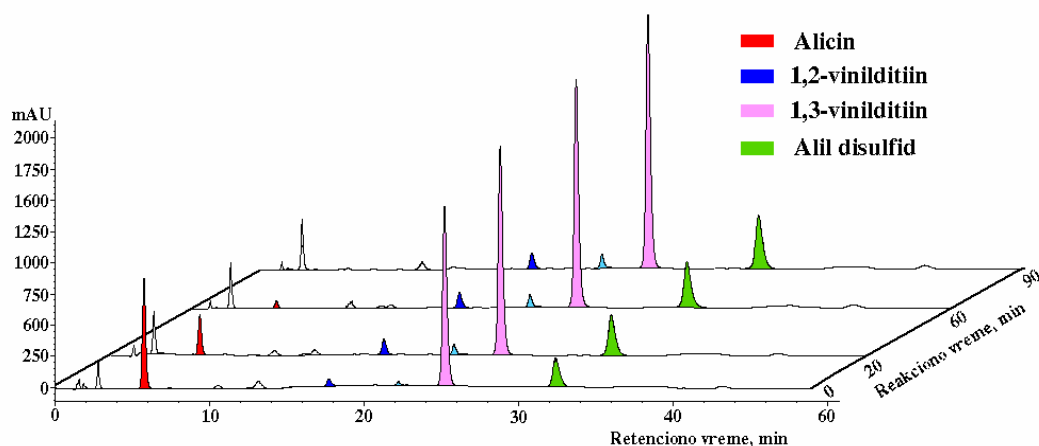
4.3.1. Ispitivanje kinetike sinteze vinilditiina pomoću HPLC

Vinilditiini su farmakološki aktivna jedinjenja i nastaju transformacijom alicina u *n*-heksanu na blago povišenoj temperaturi. Ovaj proces sinteze obuhvata najpre razgradnju alicina do alilsulfenske kiseline, vrlo reaktivnog jedinjenja, koje može da se kondenzuje i da nagradi alicin ili da se dehidratacijom dobije tioakrolein. Nadalje se dva molekula tioakroleina kondenzuju i grade izomere vinilditiina, 2-vinil-4H-1,3-ditiin kao glavni proizvod i 3-vinil-4H-1,2-ditiin, kao sporedni proizvod. Za razmatranja kinetike sinteze ovih izomera, data je sledeća reakciona šema po kojoj se odvija složeni proces sinteze:



pri čemu A odgovara alicinu, B odgovara 2-vinil-4H-1,3-ditiinu, a C odgovara 3-vinil-4H-1,2-ditiinu. Kinetički parametri za sintezu vinilditiina određeni su praćenjem promene koncentracije alicina sa vremenom uz primenu HPLC metode.

Na slici 33 dati su HPLC hromatogrami reakcione smeše sinteze vinilditiina iz alicina. Površina pikova je proporcionalna koncentraciji komponenata.



Slika 33 HPLC hromatogrami uzoraka uzetih iz reakcione smeše za sintezu vinilditiina u različitim vremenskim intervalima sinteze ($t = 0, 20, 60, 90$ min)

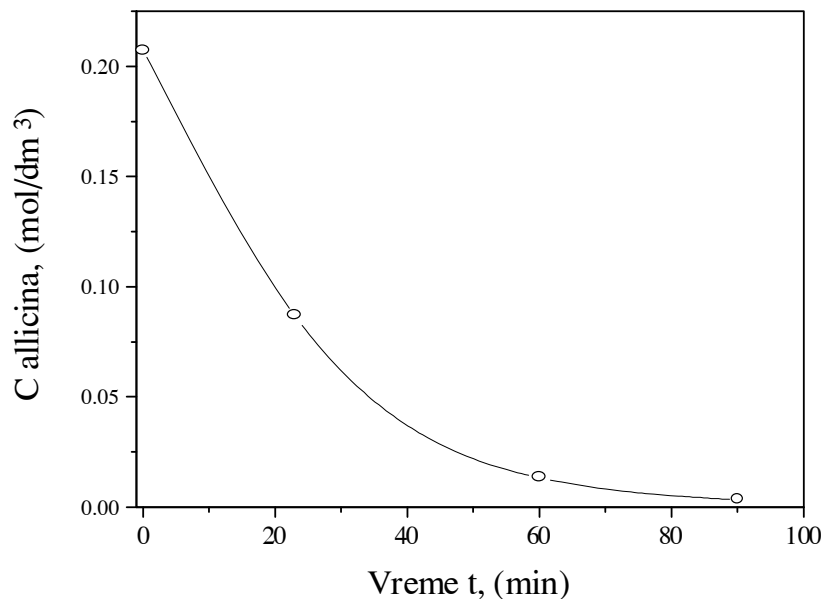
Retenciono vreme za alicin je 5,83 min, za 1,2 izomer vinilditiina 17,70 min, a za 1,3 izomer vinilditiina 25,00 min.

U tabeli 10 su date promene koncentracije alicina sa vremenom u toku sinteze vinilditiina.

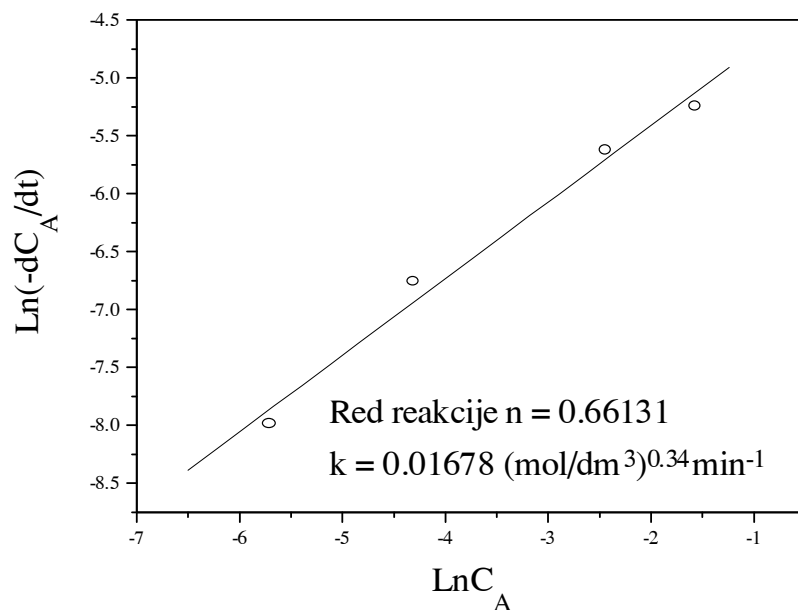
Tabela 10 Promena koncentracije alicina u toku sinteze vinilditiina

Reaktant	R_t , min	Koncentracija, mol/dm ³			
		0	23	60	90
Alicin	5,83	0,2075	0,0869	0,0135	0,0033

Promena koncentracije alicina u n-heksanu na blago povišenoj temperaturi predstavlja eksponencijalno opadajuću zavisnost koja je prikazana na slici 34. Za određivanje kinetičkih parametara sinteze vinilditiina korišćene su jednačine 9 i 10. Iz nagiba prave po jednačini 10 (slika 35) dobija se red reakcije, a iz odsečka prave na ordinati može se dobiti vrednost konstante brzine transformacije alicina pri sintezi vinilditiina.



Slika 34 Promena koncentracije alicina u n-heksanu na 45 °C



Slika 35 Dijagram zavisnosti $\ln(-dC_A/dt)$ od $\ln C_A$

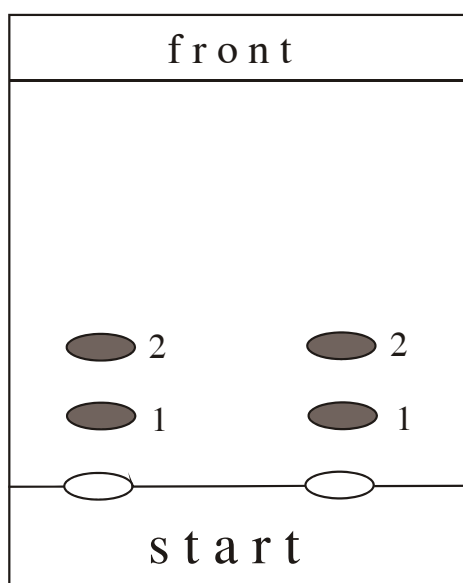
Na osnovu dobijenih kinetičkih parametara, konstante brzine hemijske reakcije, $k = 0,01678 \text{ (mol/dm}^3\text{)}^{0.34} \text{ min}^{-1}$ i reda reakcije, $n = 0,66$, konačna jednačina za brzinu dobijanja vinilditiina ima sledeći oblik:

$$(-r_A) [\text{mol/dm}^3 \text{ min}] = 0,01678 \cdot C_A^{0,66} \quad (12)$$

4.3.2. Razdvajanje strukturnih izomera vinilditiina i strukurna karakterizacija

4.3.2.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Alicin se u n-heksanu pri blagom zagrevanju najpre transformiše do alilsulfenske kiseline i tioakroleina koji u reakciji samokondenzacije gradi dva izomera vinilditiina. Glavni proizvod sinteze je 2-vinil-4H-1,3-ditiin, a kao sporedni proizvod nastaje 3-vinil-4H-1,2-ditiin. Ova dva izomera vinilditiina izdvojena su iz sirove reakcione smeše hromatografijom na tankom sloju silika gela G 60. Posle razvijanja hromatograma mrlje su detektovane 50%-nim rastvorom sumporne kiseline. Identifikacija razdvojenih strukturnih izomera vinilditiina izvršena je upoređivanjem dobijenih R_f - vrednosti sa literaturnim R_f - vrednostima [20]. Rezultati razdvajanja strukturnih izomera vinilditiina na tankom sloju silika gela G 60 dati su na slici 36 i u tabeli 11.

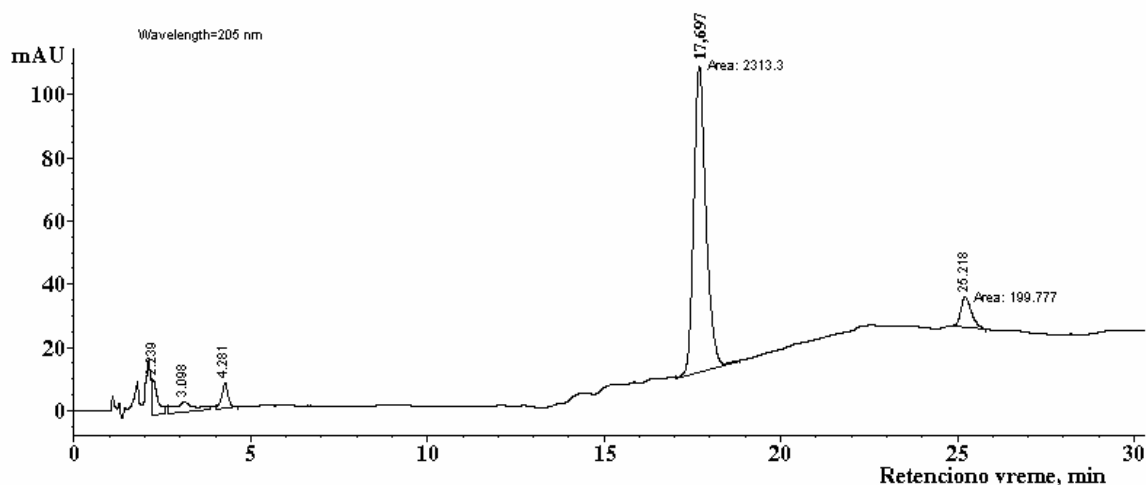


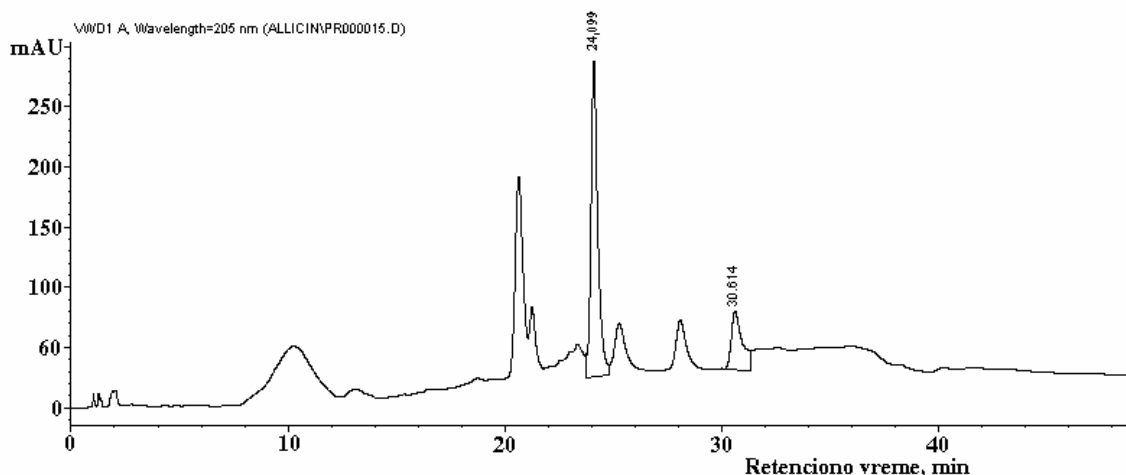
Slika 36 Hromatogram razdvojenih strukturnih izomera vinilditiina iz sirove reakcione smeše (silika-gel G 60; 0,25 mm; 50 μ l; n-heksan; 50 %-ni rastvor sumporne kiseline; sobna temperatura)

Tabela 11 Eksperimentalne i literaturne R_f -vrednosti vinilditiina

Mrlja	R_f -vrednosti uzorka		Literaturne R_f -vrednosti [3]	
	Vinilditiin	R_f	Vinilditiin	R_f
1	2-vinil-4H-1,3-ditiin	0,190	2-vinil-4H-1,3-ditiin	0,18
2	3-vinil-4H-1,2-ditiin	0,432	3-vinil-4H-1,2-ditiin	0,47

Kao što se iz prikazanih rezultata vidi R_f -vrednosti dobijene za razdvojene izomere vinilditiina su u saglasnosti sa literaturnim R_f -vrednostima. Ovo pokazuje da transformacijom alicina u n-heksanu na 45 °C nastaju oba izomera vinilditiina. Rezultati tankoslojnog razdvajanja izomera vinilditiina su visoko reproduktivni što znači da su ova jedinjenja veoma stabilna. Da bi potvrdili poreklo pikova od vinilditiina na HPLC hromatogramima, koji su dobijeni pri ispitivanju kinetike sinteze vinilditiina, mrlje od izomera vinilditiina sa tankog sloja silika-gela su eluirane u minimalnoj zapremini acetonitrila (5 cm³) i posle filtriranja na membranskom filtru, supernatanti korišćeni za HPLC hromatografiju. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slici 37 i 38.

**Slika 37** HPLC hromatogram (uslovi rada sa acetonitrilnim rastvorima i gradijentom mobilnih faza) 3-vinil-4H-1,2-ditiina ($R_t = 17,697$) eluiran sa Si-TLC ($R_f = 0,43$)



Slika 38 HPLC hromatogram (uslovi rada sa acetonitrilnim rastvorima i gradijentom mobilnih faza) 2-vinil-4H-1,3-ditiina ($R_t = 25,0$) eluiran sa Si-TLC ($R_f = 0,19$)

4.3.2.2. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GH-MS)

Za potpuno definisanje kvantitativnog sastava sirove reakcione smeše vinilditiina primenjena je metoda gasne hromatografije-masene spektrometrije (GH-MS). Gasnom hromatografijom izdvojeno je iz sirove reakcione smeše vinilditiina dvanaest komponenata, a identifikovano osam (66,67 %). Identifikacija razdvojenih komponenata gasnom hromatografijom urađena je na osnovu masenih spektara svake razdvojene komponente (tj. m/e vrednosti i intenziteta pikova pojedinih fragmenata karakterističnih za određenu vrstu jedinjenja). Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slici 39 i u tabeli 12.

Iz tabele 12 i slike 39 se vidi da u reakcionoj smeši, po završetku reakcije dominiraju ajoeni i vinilditiini. Dva izomera vinilditiina se mogu dobro razdvojiti gasnom hromatografijom, 1,3-izomer vinilditiina na gasnom hromatogramu daje pik na 18,04 min, a 1,2-izomer na 16,6 min.

Maseni spektri oba izomera vinilditiina razdvojena gasnom hromatografijom prikazana su na slikama 40 i 41.

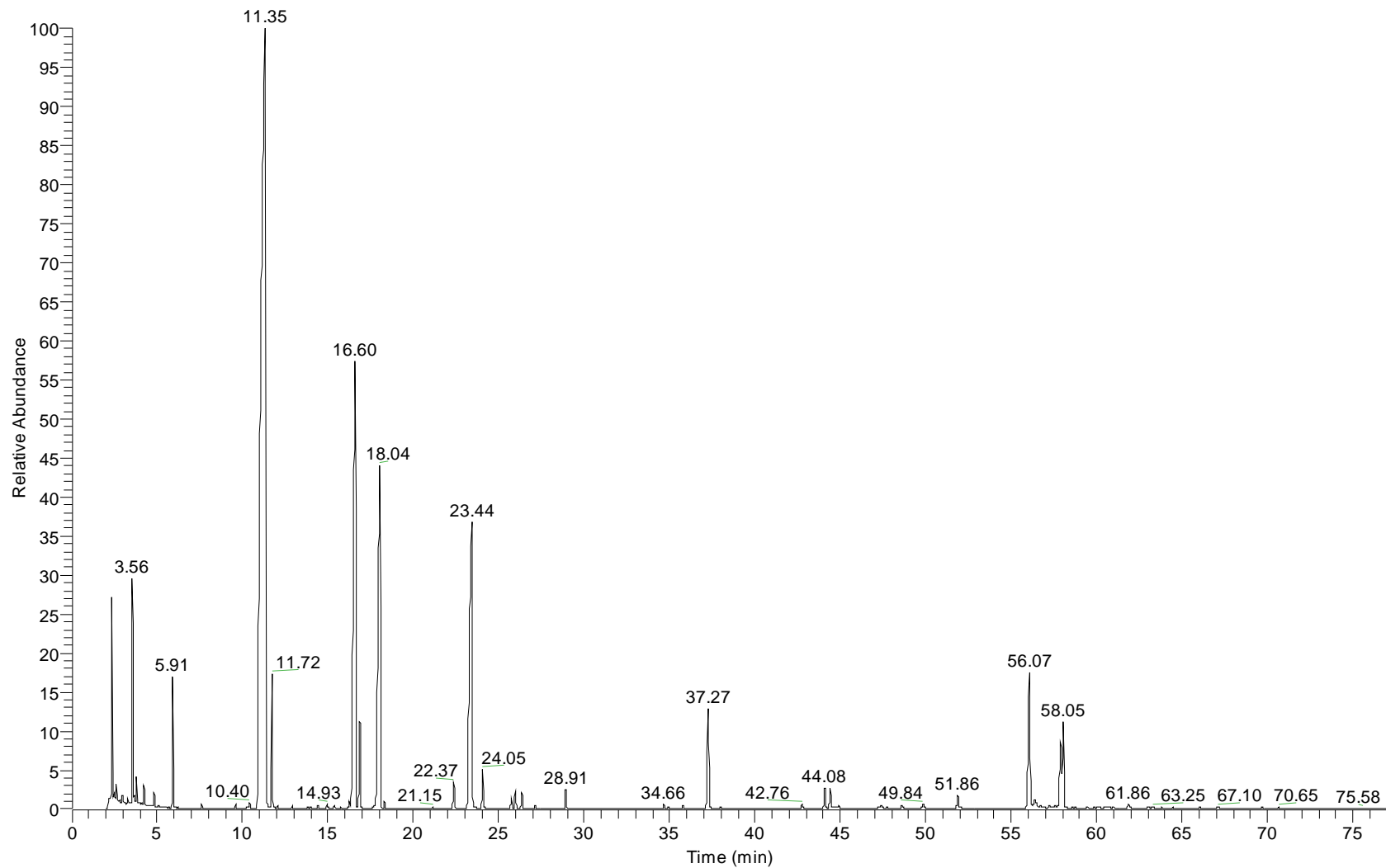
Tabela 12 Podaci o gasno-masenoj analizi (GH-MS) sirove reakcione smeše vinilditiina

Pik	R _t (min)*	Jedinjenje	M _M **	MS-podaci (m/e vrednosti i relativni intenzitet pika)
1	2,34	metil-alil-sulfid	88	41(19); 45(100); 46(9); 47(41); 61(45); 71(68); 73(14); 88(71)
2	3,56	alil-sulfid	114	41(87); 45(100); 47(25); 71(42); 72(53); 99(32); 114(35)
3	5,91	nepoznato		45(76); 69(42); 71(28); 72(11); 103(100); 104(54); 105(10); 106(6)
4	11,35	ajoeni	234	41(100); 45(73); 71(51); 73(47); 81(64); 105(42); 113(32); 146(45)
5	11,72	propil-alil-disulfid	148	41(100); 44(36); 45(42); 64(19); 73(20); 75(8); 106(51); 148(56)
6	16,6	3-vinil-4H-1,2-ditiin	144	45(100); 71(90); 72(53); 97(56); 103(52); 111(94); 144(69)
7	16,8	nepoznato	-	41(38); 45(94); 65(45); 71(100); 72(51); 77(4); 103(22); 136(50); 138(7)
8	18,04	2-vinil-4H-1,3-ditiin	144	45(61); 71(100); 72(40); 103(17); 111(47); 144(37)
9	23,44	dialil-trisulfid	178	41(100); 45(87); 71(32); 73(99); 74(12); 113(78); 114(8); 138(4); 178(8)
10	37,27	dialil-disulfid	146	41(100); 45(59); 79(4); 81(5); 105(14); 113(7); 146(15)
11	56,07	nepoznato	-	41(85); 45(100); 71(52); 73(46); 79(12); 103(56); 104(23); 105(12); 145(20); 146(5)
12	58,05	nepoznato	-	45(69); 65(17); 71(65); 97(50); 111(100); 117(38); 144(25); 183(7); 216(35); 218(5)

* - R_t- retenciono vreme (min)

** - M_M- molekulska masa (g/mol)

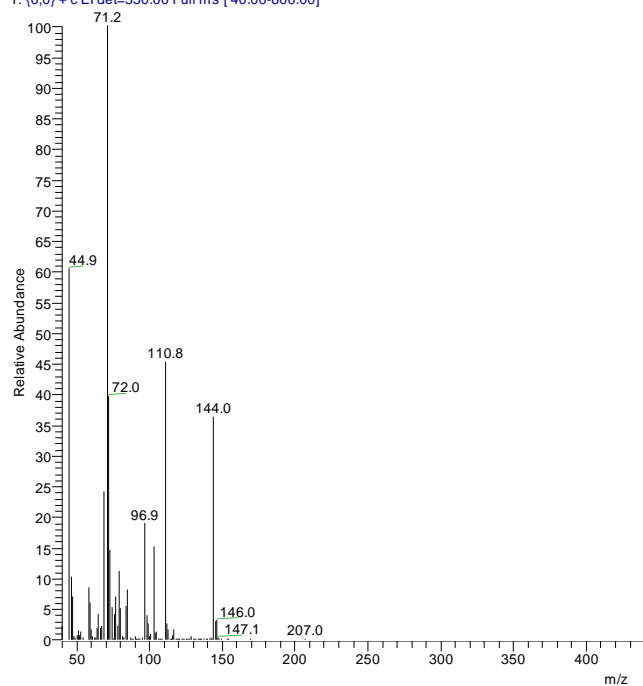
RT: 0.00 - 76.98



NL:
1.05E8
TIC MS
Sample
1-2
Hexane

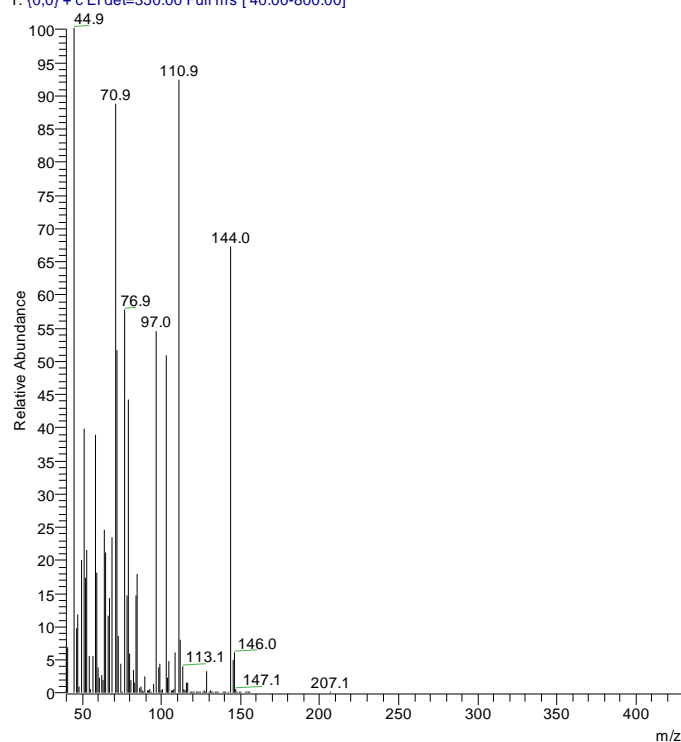
Slika 39 Gasni hromatogram sirove reakcije smeše vinilditiina

Sample 1-2 Hexane #1385-1413 RT: 17.77-18.09 AV: 29 SB: 18 2.08-2.27 NL: 4.27E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



Slika 40 Maseni spektar 2-vinil-4H-1,3-vinilditiina

Sample 1-2 Hexane #1261-1283 RT: 16.36-16.61 AV: 23 SB: 18 2.08-2.27 NL: 3.04E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



Slika 41 Maseni spektar 3-vinil-4H-1,2-vinilditiina

U tabeli 13 date su moguće strukture fragmenata od kojih poriču pikovi u masenim spektrima izomera vinilditiina i njihove m/e vrednosti.

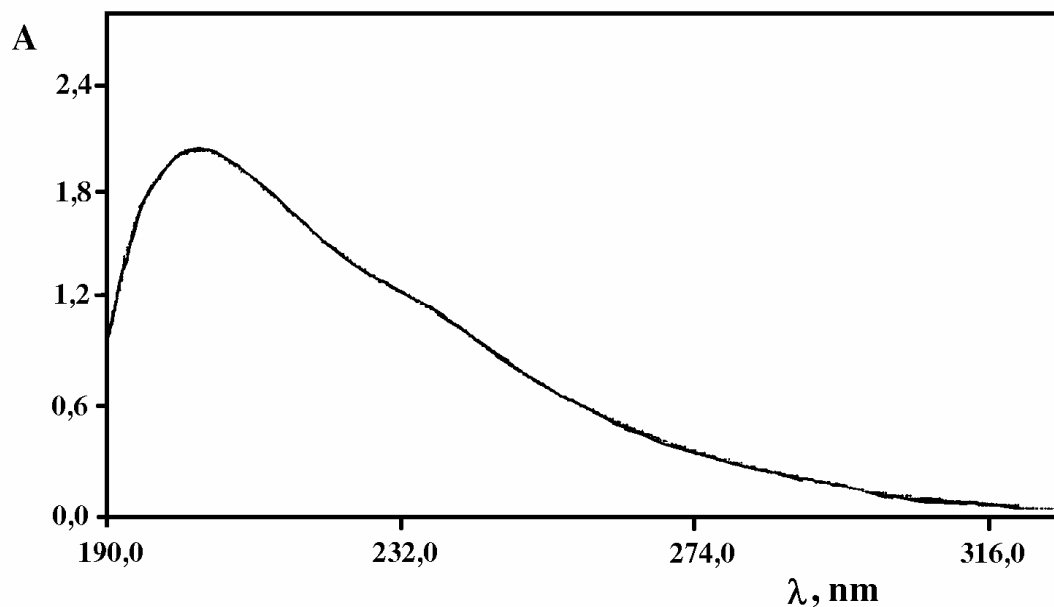
Tabela 13 Vrednosti m/e i mogući fragmenti od kojih potiču pikovi u masenim spektrima izomera vinilditiina

m/e	2-vinil-4H-1,3-ditiin Fragment	m/e	3-vinil-4H-1,2-ditiin Fragment
144		144	
111		111	
103		103	
72	$[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{S}]^{\oplus}$	72	$[\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{S}]^{\oplus}$
71	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{CH} \\ \quad \\ \text{S} - \text{CH} \\ \oplus \end{array}$	71	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{CH} \\ \quad \\ \text{S} - \text{CH} \\ \oplus \end{array}$
45	$[\text{S}=\text{CH}]^+$	45	$[\text{S}=\text{CH}]^+$

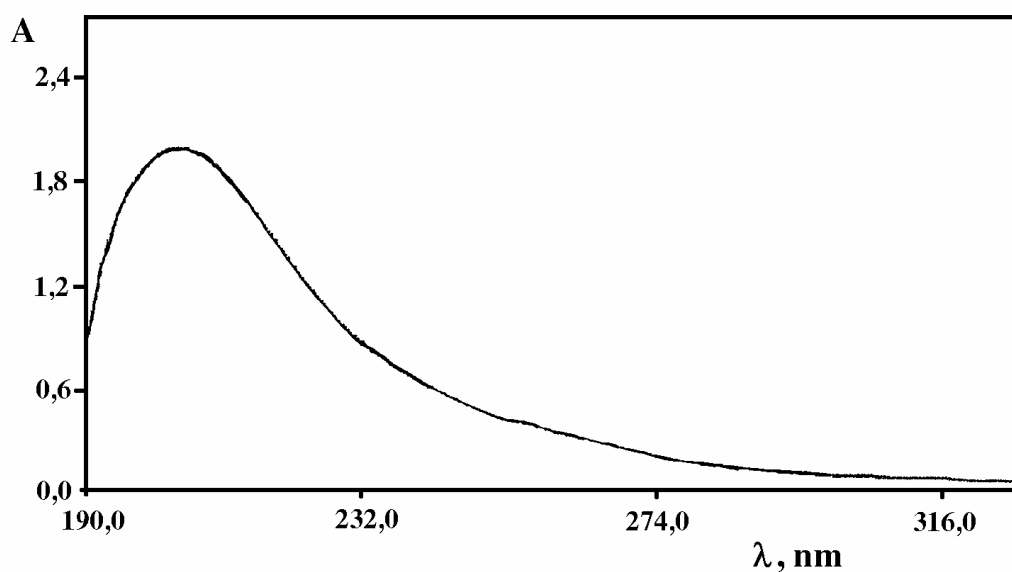
Maseni spektri ostalih komponenata razdvojenih iz sirove reakcione smeše vinilditiina gasnom hromatografijom prikazani su u prilogu P2 u ovom radu.

4.3.2.3. Ultraljubičasta spektroskopija

Izomeri vinilditiina su razdvojeni tankoslojnom hromatografijom i eluirani u acetonitrilu (5 cm^3) i posle filtriranja supernatantima su snimljeni UV spektri prikazani na slikama 42 i 43.



Slika 42 UV spektar 2-vinil-4H-1,3-ditiina izdvojenog Si-TLC hromatografijom iz sirove reakcione smeše



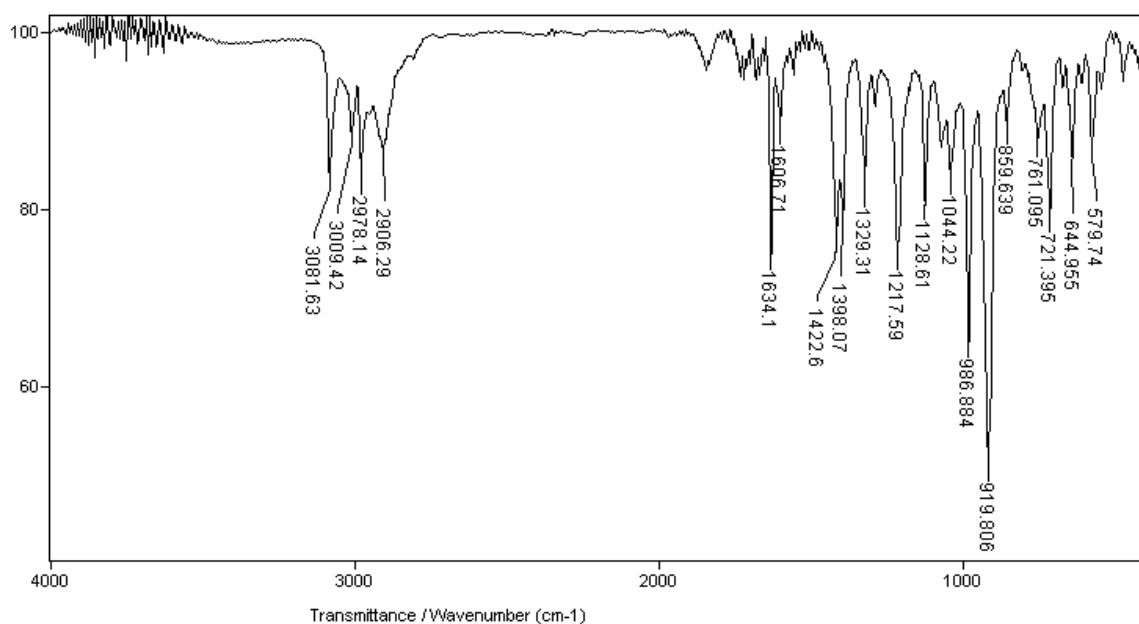
Slika 43 UV spektar 3-vinil-4H-1,2-ditiina, izdvojenog Si-TLC hromatografijom iz sirove reakcione smeše

Profili UV spektara obadva izomera vinilditiina se malo razlikuju. Naime glavni maksimumi u UV spektrima javljaju se na 203 nm, dok je sekundarni maksimum kod 2-vinil-4H-1,3-ditiina jače izražen i javlja se na 227 nm, a kod 3-vinil-4H-1,2-ditiina slabije izražen i javlja se na 232 nm. U obadva

strukturna izomera prisutne su po dve izolovane hromofore (C=C) i glavni maksimum potiče od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza ovih grupa. Batochromno pomeranje ovog $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza potiče od ostatka molekula za koji su vezani hromofori. Auksohrom (atom S) prisutan u prstenastoj strukturi vinilditiina apsorbuje na početku bliske ultraljubičaste oblasti tj. javlja se $n \rightarrow \rho^*$ prelaz u oblasti talasne dužine u kojoj je glavni maksimum obadva izomera.

4.3.2.4. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom

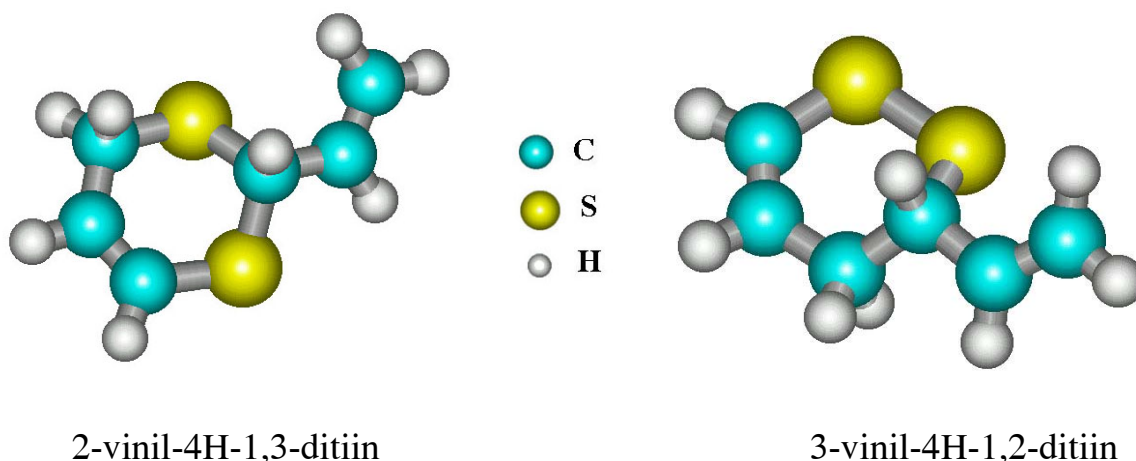
Na slici 44 prikazan je FT-IC spektar sintetisanih vinilditiina. Vinilditiinima je najpre odstranjen rastvarač otparavanjem na atmosferskom pritisku, a zatim pripremljen tanak film na KBr pločici i snimljen FT-IC spektar.



Slika 44 FT-IC spektar sintetisanih vinilditiina, snimljen u obliku filma na KBr pločici

U FT-IC spektru nije prisutan jak signal na 1080 cm^{-1} , koji potiče od valencionih vibracija, $\nu(\text{S}=\text{O})$, S=O grupe, koja je prisutna u alicinu. Ovaj rezultat je dokaz da se alicin potpuno transformiše obradom u n-heksanu na $45 \text{ }^\circ\text{C}$ za vreme od 1,5 čas u vinilditiine, koji u svojoj strukturi ne poseduju ovu grupu. Potvrdu o strukturi vinilditiina daju sledeće trake u spektru: oštar signal na 3081 cm^{-1} potiče od valencionih vibracija C-H, $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$, iz CH_2 fragmenta

vinil-grupe, dok valenciona simetrična vibracija C-H, $\nu_s(\text{C-H})$, daje signal na 2978 cm^{-1} . Relativno jaka i oštra traka na 1634 cm^{-1} potiče od valencionih vibracija, $\nu(\text{C=C})$, vinilne C=C grupe. Jaki signali u IC spektru na 986 cm^{-1} i 919 cm^{-1} rezultat su deformacionih C-H vibracija u ravni, $\delta(\text{C-H})$ iz CH_2 fragmenta vinil grupe. Valencione vibracije C-H, $\nu(\text{C-H})$, cikličnog dela molekula poklapaju se sa valencionim vibracijama C-H, $\nu(\text{C-H})$, iz vinil-grupe i javljaju se na 3081 cm^{-1} , dok deformacione vibracije van ravni $\gamma(\text{C-H})$ iz cikličnog dela molekula daju signal na 721 cm^{-1} . C-H deformacione vibracije u ravni, $\delta(\text{C-H})$, iz cikličnog dela molekula daju signal na 1422 cm^{-1} . Valencione vibracije, $\nu(\text{C-S})$, C-S veza u IC spektru pokazuju traku na 761 cm^{-1} . Celokupna analiza spektra ukazuje na strukture vililditiina koje su date sledećim formulama:

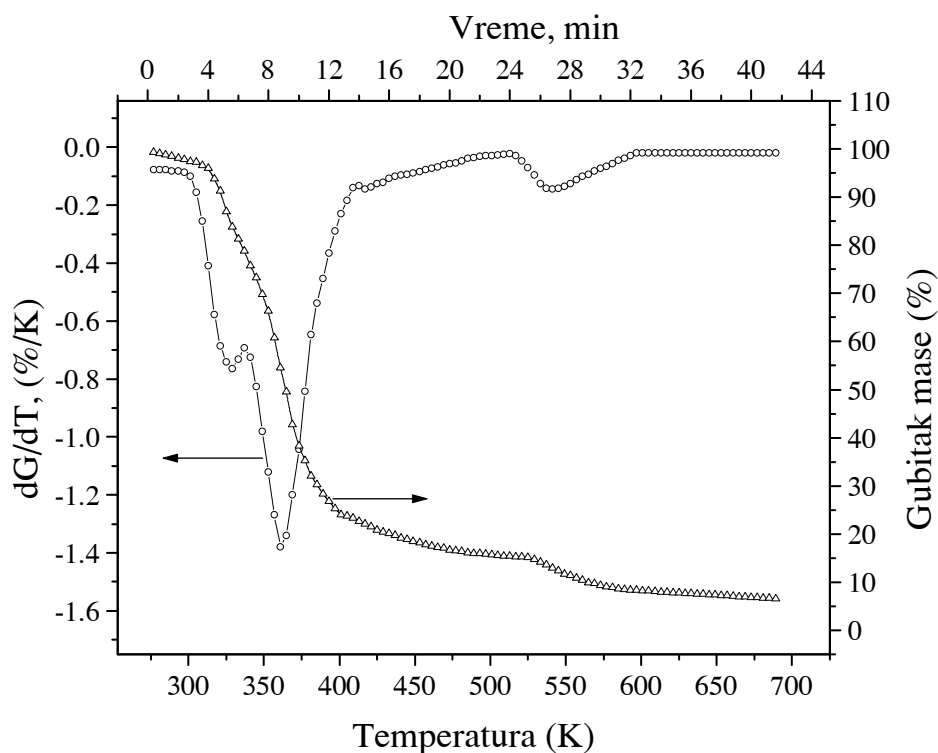


4.4. INKLUZIONI KOMPLEKSI ALICINA

4.4.1. Termogravimetrijska analiza

Da bi odredili termopostojanost tj. termostabilnost slobodnog alicina i alicina vezanog u kompleksu sa β -ciklodekstrinom i ureom, primenjena je termogravimetrijska analiza i to dinamička metoda, prema kojoj se meri masa uzorka u toku kontinualnog zagrevanja određenom brzinom. Kriva zavisnosti promene mase slobodnog alicina od temperature zagrevanja (TG - kriva) i njen prvi izvod (DTG - kriva) prikazane su na slici 45 sa odgovarajućom vremenskom skalom na vrhu grafika. Početak gubitka mase od alicina se pojavljuje još na sobnoj temperaturi, a zatim TG-kriva pokazuje vrlo strmi

otklon (pik na DTG-krivoj) koji se skoro završava na oko 393 K. Nadalje TG kriva prelazi u konstantni plato do 533 K kada se ponovo javlja blag otkolon krive koji pokazuje prisutne nečistoće u sintetičkom alicinu (K-acetat) i koje su potpuno degradirane na 673 K. Ovakva nagla promena mase alicina u uskom intervalu temperature od 303 do 393 K, ukazuje da je jako isparljiv i vrlo nestabilan.



Slika 45 TG i DTG kriva slobodnog alicina

Matematičkom obradom TG i DTG krivih za slobodni alicin određeni su kinetički parametri procesa gubitka mase alicina tj. energija aktivacije (E_a) i red reakcije (n). U tu svrhu primenjene su dve metode i to: metod Freeman-Carroll-a [81] i Vachuska-Voboril-a [82], prema jednačinama 13 i 14, respektivno.

$$\frac{\Delta \ln \frac{d\alpha}{dt}}{\Delta \ln(1-\alpha)} = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{\Delta \left(\frac{1}{T} \right)}{\Delta \ln(1-\alpha)} + n \quad (13)$$

$$\frac{\left(\frac{d^2\alpha}{dt^2}\right) \cdot T^2}{\left(\frac{d\alpha}{dt}\right) \cdot \left(\frac{dT}{dt}\right)} = -n \cdot \frac{d\alpha}{dt} \cdot \frac{T^2}{dT/dt} + \frac{E_a}{R} \quad (14)$$

Ove jednačine su dobijene polazeći od osnovne jednačine za stepen konverzije pri procesu gubitka mase:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \cdot (1-\alpha)^n \quad (15)$$

Predeksponencijalni faktor **A** određuje se prema jednačini 16 kao:

$$A = \frac{d\alpha}{dt} \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \cdot \frac{1}{(1-\alpha)^n} = \Phi \cdot \frac{d\alpha}{dT} \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \cdot \frac{1}{(1-\alpha)^n} \quad (16)$$

pri čemu je $d\alpha/dt = \Phi \cdot d\alpha/dT$.

U jednačinama je:

α - stepen konverzije jednog stadijuma procesa;

t - vreme reakcije, min;

T - temperatura, K;

n - red reakcije;

A - predeksponencijalni faktor, min^{-1} ;

E_a - energija aktivacije, kJ/mol;

R - univerzalna gasna konstanta, 8,314 J/mol K;

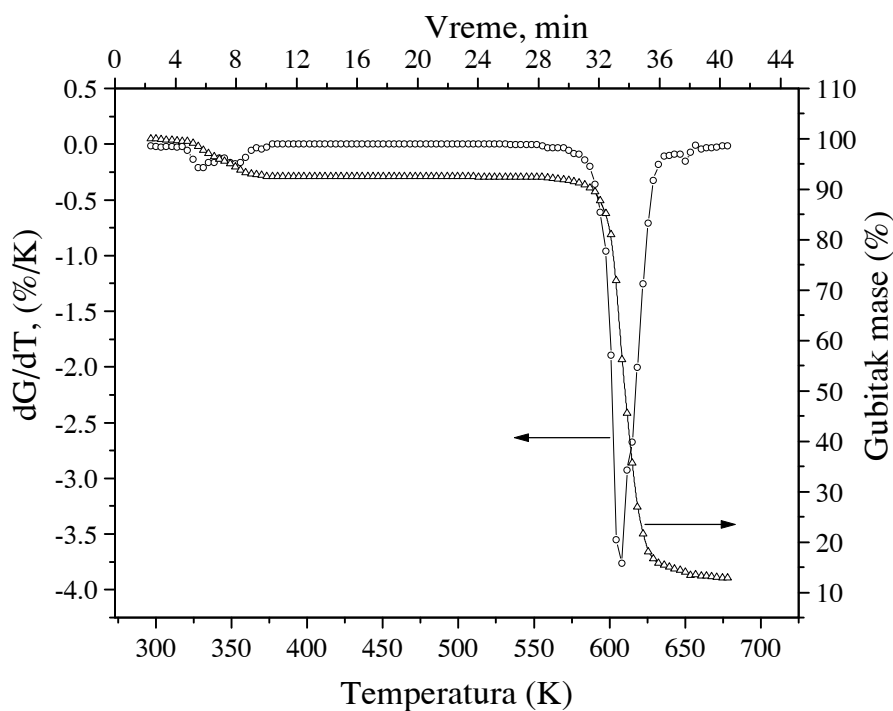
Φ - linearna brzina zagrevanja, 10 K/min.

Rezultati dobijeni primenom ovih metoda dati su u tabeli 14

Tabela 14 Kinetički parametri gubitka mase alicina određeni metodom Freeman-Carroll-a i Vachuska- Voboril-a za proces u temperaturnom opsegu 277-405 K

Metoda	n	E_a (kJ/mol)	A, min^{-1}
Freeman-Carroll-a	0,942	73,475	0,405
Vachuska- Voboril-a	1,127	59,774	0,646

β -ciklodekstrin kao komponenta domaćina u inkluzionom molekulskom kompleksu je vrlo stabilno jedinjenje. Dijagram zavisnosti promene mase od temperature zagrevanja (slika 46) pokazuje visoku stabilnost β -ciklodekstrina u širokom intervalu temperature od 303 do 593 K. Tek na temperaturi većoj od 593 K dolazi do strmog pada TG krive tj. do naglog gubitka mase.



Slika 46 TG i DTG kriva β -ciklodekstrina

Matematičkom obradom TG i DTG krivih za β -ciklodekstrin uz primenu navedenih metoda određeni su kinetički parametri termičke destrukcije i prikazani u tabeli 15.

Tabela 15 Prividni kinetički parametri termičke destrukcije β -ciklodekstrina određeni metodom Freeman-Carroll-a i Vachuska- Voboril-a za temperaturni opseg 560 - 670 K

Metoda	n	E_a (kJ/mol)	A, min^{-1}
Freeman-Carroll-a	2,682	365,44	$4,49 \cdot 10^5$
Vachuska- Voboril-a	2,765	394,64	$1,36 \cdot 10^5$

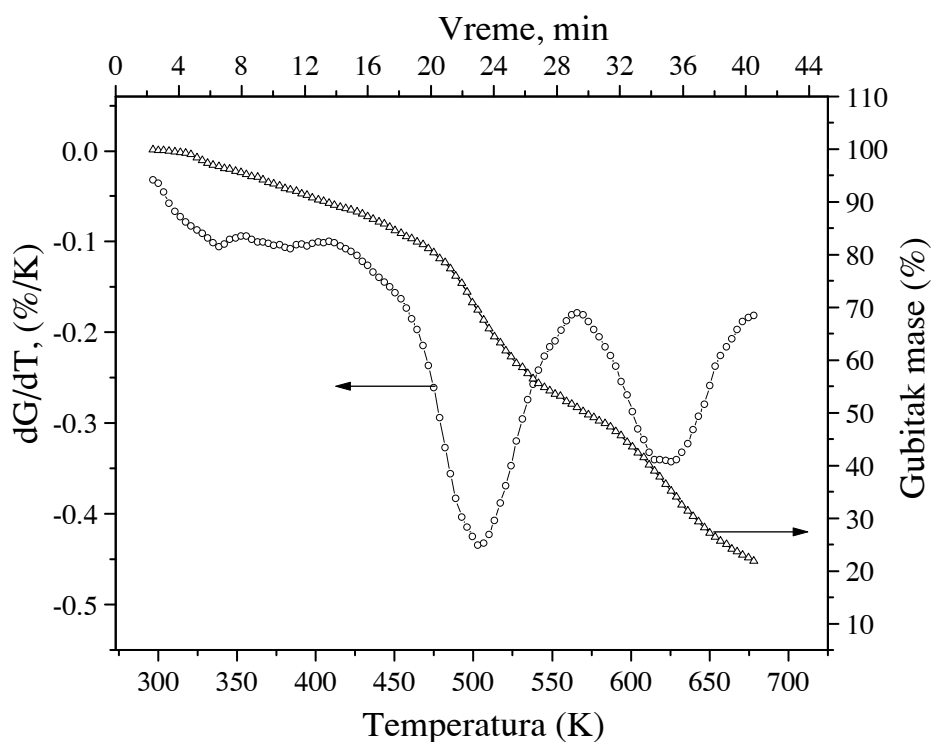
Režim destrukcije molekulskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin pokazuje vidnu razliku u odnosu na slobodni alicin i čist β -ciklodekstrin. Naime promena mase kompleksa u zavisnosti od temperature zagrevanja tj. TG kriva (slika 47) je kompleksnija i ima dva prelaza koja su vrlo postepena sa blagim nagibom. Ovo ukazuje da kompleks nije obična fizička smeša, već da postoje sile koje, drže molekule domaćina i gosta, β -ciklodekstrina i alicina, koji su već uspostavili određeni intermolekulski odnos. Prvi prelaz potiče od gubitka mase alicina u vezanom stanju i razlikuje se od TG krive slobodnog alicina. Gubitak mase vezanog alicina u zavisnosti od temperature je znatno sporiji i počinje od 313 K da bi se potpuni gubitak mase ostvario tek na 543 K. TG kriva kompleksa pokazuje drugi otklon koji se odnosi na komponentu domaćina (β -ciklodekstrin) u kompleksu. Ovaj deo krive ima daleko blaži nagib koji ukazuje na postepen gubitak mase i ima čak za 40-60 K pomenen plato krive ka višoj temperaturi.

TG i DTG krive kompleksa (slika 47) ukazuju na povezanost jedinjenja gosta i domaćina odgovarajućim vezama a nagrađeno jedinjenje ima karakteristike različite od alicina i β -ciklodekstrina pri termogravimetrijskom snimanju.

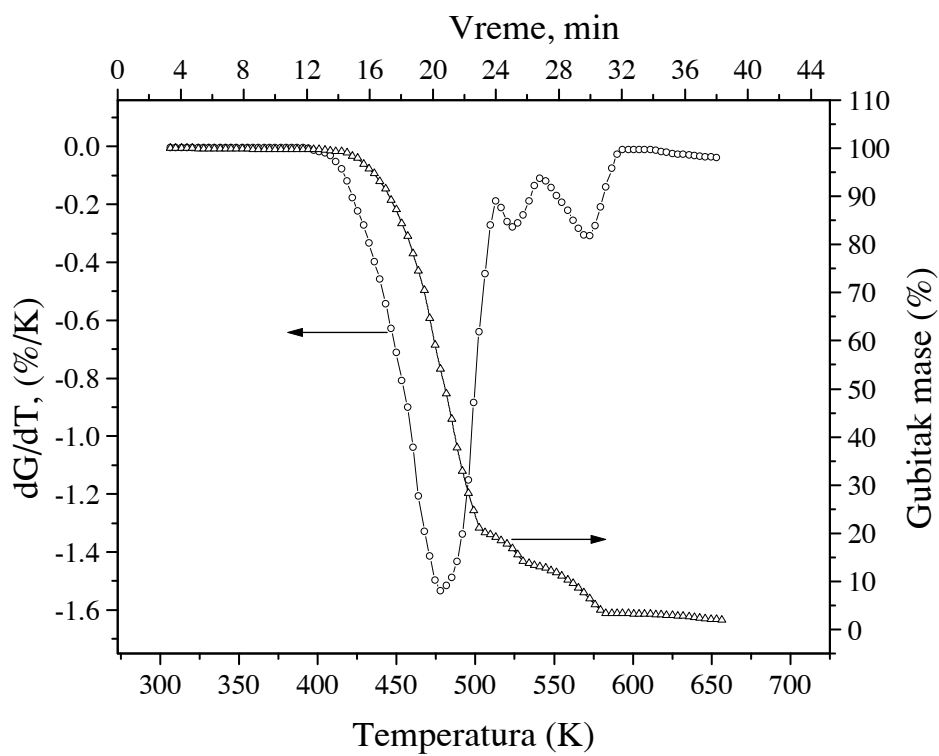
Tabela 16 Prividni kinetički parametri termičke destrukcije kompleksa β -ciklodekstrina i alicina određeni metodom Freeman-Carroll-a i Vachuska-Voboril-a

Metoda	T, K	n	E_a (kJ/mol)	A, min^{-1}
Freeman-Carroll-a	295 - 552	0,433	27,438	1,804
Vachuska- Voboril-a		0,376	24,722	1,608
Freeman-Carroll-a	590 - 680	0,537	52,817	0,243
Vachuska- Voboril-a		0,442	49,356	0,212

Na slici 48 na TG i DTG krivama vide se stadijumi višestepene razgradnje uree sa povećanjem temperature uzorka. Prvi stadijum pirolize se dešava u opsegu temperatura 420 - 509 K. Interesantno je da se taj stadijum destrukcije kanalskog kompleksa uree i alicina širi u pogledu temperaturnog opsega 387 - 541 K (slika 49). Gubitak mase, koji bi se mogao pripisati alicinu, skoro da je završen do oko 400 K, što ne odstupa od opsega temperature u kome se pojavljuje gubitak mase uzorka čistog alicina (390 K). To potvrđuje da su međumolekulske sile u kanalskom inkluzionom kompleksu uree i alicina slabije od međumolekulskih sila koje drže molekulsko inkluziono jedinjenje β -ciklodekstrina i alicina.



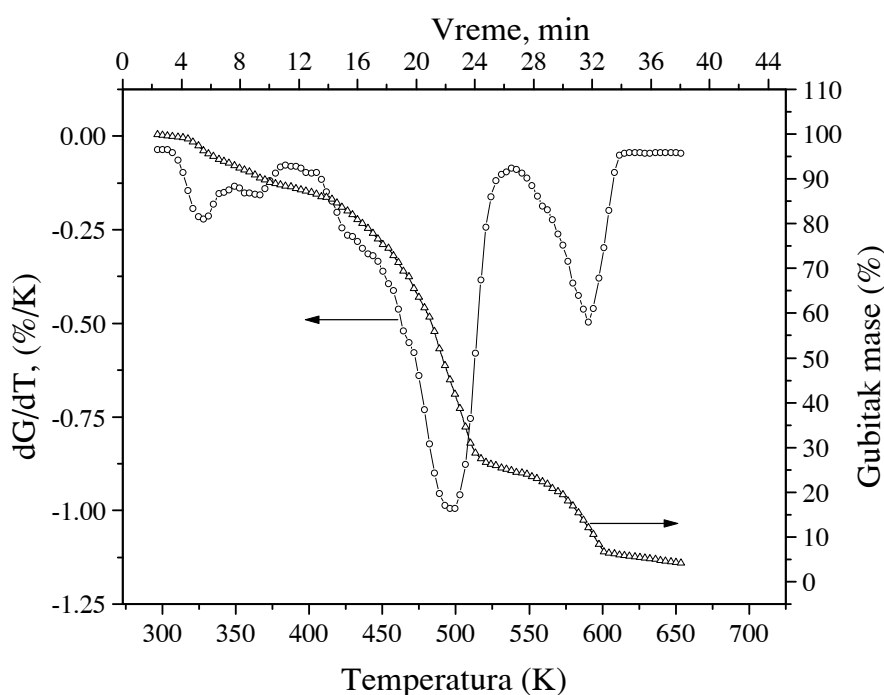
Slika 47 TG i DTG kriva molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin



Slika 48 TG i DTG kriva uree

Tabela 17 Prividni kinetički parametri termičke destrukcije uree

Metoda	T, K	n	E_a (kJ/mol)	A, min^{-1}
Freeman-Carroll-a	420 - 509	1,196	88,591	0,919
Vachuska- Voboril-a		1,017	92,732	0,571
Freeman-Carroll-a	509 - 541	1,655	160,77	1,716
Vachuska- Voboril-a		1,413	171,96	2,651
Freeman-Carroll-a	541 - 590	0,839	190,21	1,673
Vachuska- Voboril-a		1,233	210,77	2,047



Slika 49 TG i DTG kriva kanalskog kompleksa urea-alicin

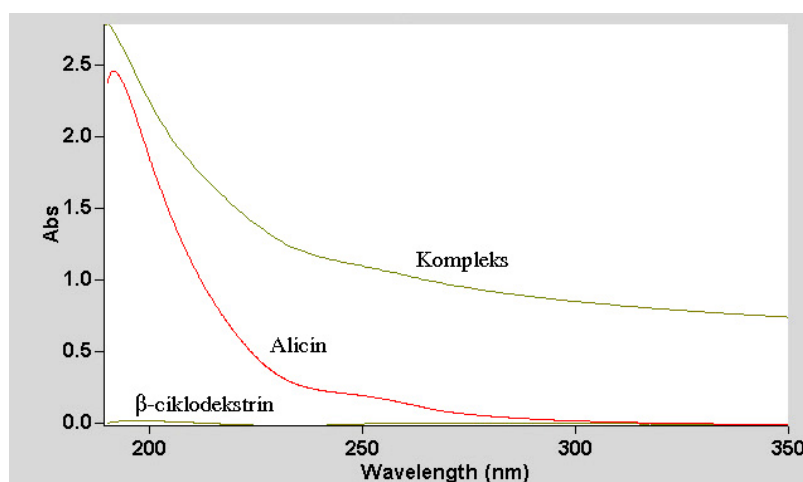
Tabela 18 Prividni kinetički parametri termičke destrukcije kanalskog kompleksa urea-alicin

Metoda	T, K	n	E_a (kJ/mol)	A, min^{-1}
Freeman-Carroll-a	300 - 384	0,734	56,912	0,317
Vachuska- Voboril-a		0,874	55,344	0,405
Freeman-Carroll-a	387 - 541	0,906	57,140	1,254
Vachuska- Voboril-a		0,756	56,239	1,992
Freeman-Carroll-a	548 - 622	1,115	166,281	0,979
Vachuska- Voboril-a		1,131	187,576	1,033

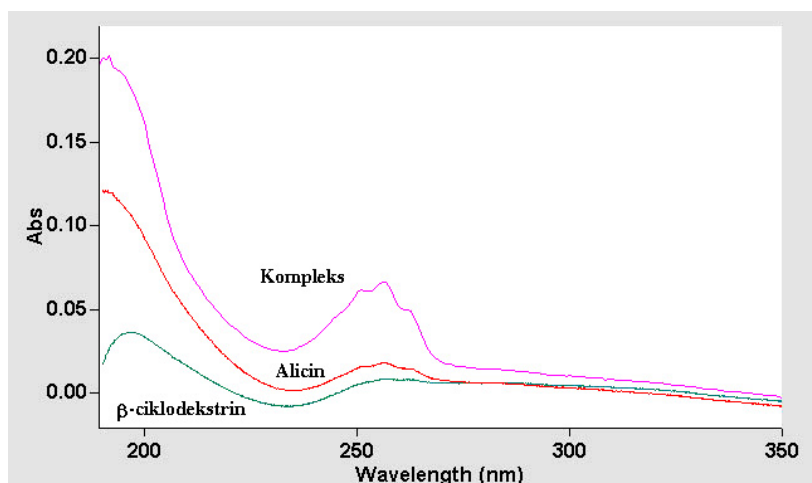
4.4.2. Strukturna karakterizacija inkluzionih kompleksa alicina

4.4.2.1. Ultraljubičasta spektroskopska analiza (UV)

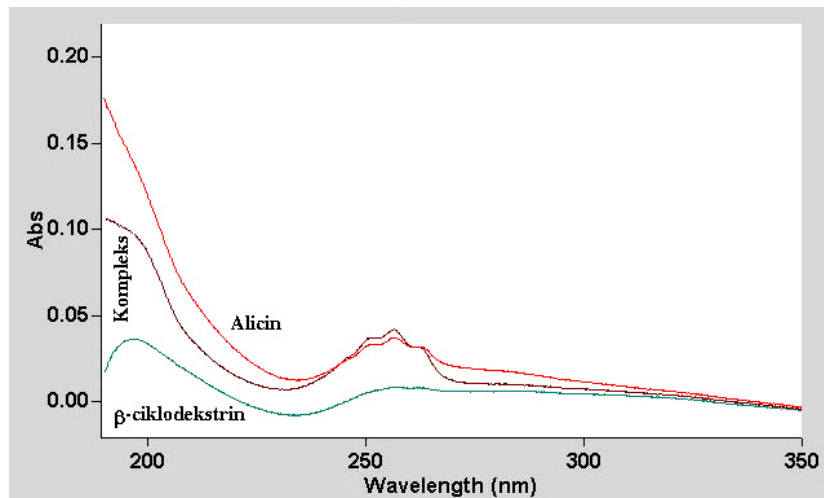
Ultraljubičasta spektroskopska analiza molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin. U cilju strukturne karakterizacije kompleksa β -ciklodekstrin-alicin snimljeni su UV spektri čistog alicina, kompleksa alicina sa β -ciklodekstrinom (1:1) i čistog β -ciklodekstrina, koji su dati na slikama 50-52.



Slika 50 UV spektar vodenih rastvora čistog β -ciklodekstrina ($c=300 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), alicina ($c=42,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin (1:1), za istu koncentraciju alicina u kompleksu i vodenom rastvoru čistog alicina



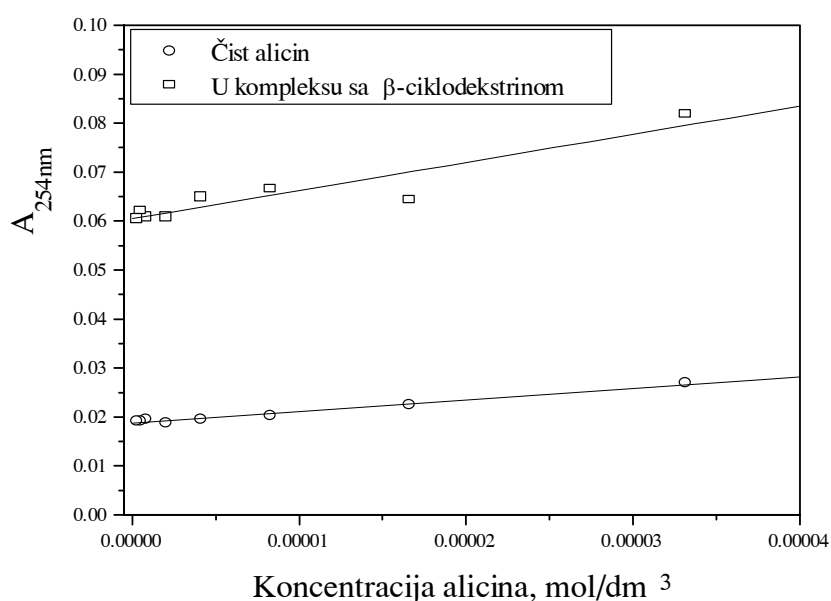
Slika 51 UV spektar vodenih rastvora čistog β -ciklodekstrina ($c=9,4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$), alicina ($c=1,346 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin (1:1), za istu koncentraciju alicina u kompleksu i vodenom rastvoru čistog alicina



Slika 52 UV spektar vodenih rastvora čistog β -ciklodekstrina ($c=9,4\mu\text{g}/\text{cm}^3$), alicina ($c=21\text{ ng}/\text{cm}^3$) i molekularnog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin (1:1), za istu koncentraciju alicina u kompleksu i vodenom rastvoru čistog alicina

UV-spektari pokazuju da čist β -ciklodekstrin, nezavisno od primenjene koncentracije, slabo apsorbira u bliskoj UV oblasti. Sintetisani alicin kao vodeni rastvor (odjeljak 4.1.3), ima dva karakteristična apsorpciona maksimuma na 198 nm i 254 nm u različitim oblastima koncentracija; visokoj, srednjoj i niskoj oblasti (slike 50-52). Kod molekularnog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin, u oblasti ispitivanih koncentracija postoji apsorpcija u oblasti od 190-300 nm. U oblasti visokih koncentracija primarni maksimum kompleksa je za par jedinica talasne dužine ispred maksimuma čistog alicina, dok je sekundarni maksimum više razvučen i slabije izražen nego kod alicina, a javlja se takođe na 254 nm. U oblasti srednjih koncentracija kompleks β -ciklodekstrin-alicin ima takođe dva maksimuma, primarni i sekundarni. Primarni maksimum pada u oblast gde i primarni maksimum od alicina na 198 nm i pokazuje jaču apsorpciju od alicina. Sekundarni maksimum je znatno više izražen kod kompleksa nego kod alicina i nalazi se na 254 nm. U oblasti niskih koncentracija, intenzitet apsorpcije glavnog maksimuma kod kompleksa je znatno niži od intenziteta glavnog maksimuma slobodnog alicina, što nije bio slučaj u oblasti visokih koncentracija i nešto je razvučeniji nego kod alicina. Maksimumi na 254 nm približnog su oblika i intenziteta. Apsorpcija kompleksa u ovom delu spektra je neznatno veća, nego kod alicina.

S obzirom da je koncentracija slobodnog alicina i alicina vezanog u kompleks, jednaka, razlike u apsorpciji koje se uočavaju (slika 50-52) pokazuju da alicin i β -ciklodekstrin ne predstavljaju fizičku smešu, već da je došlo do inkorporiranja molekula alicina u šupljine β -ciklodekstrina, tj. da je došlo do građenja kompleksa. Promena apsorpcije u zavisnosti od koncentracije alicina u slobodnom i vezanom stanju (u kompleksu) na 254 nm prikazana je na slici 53.



Slika 53 Promena apsorbanca na 254 nm u zavisnosti od koncentracije alicina u slobodnom stanju i u kompleksu sa β -ciklodekstrinom

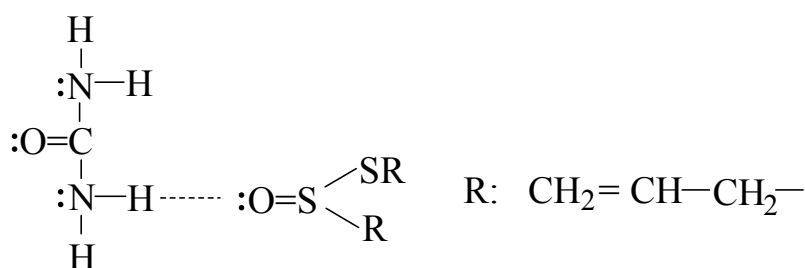
Zavisnost apsorbanca na 254 nm od koncentracije alicina u rastvoru u slobodnom stanju (slika 53) izražena matematički sa koeficijentom linearne korelacije r je:

$$A_{254} = 0,0187 + 237,577 \cdot C_{A1}; \quad r = 0,991 \quad (17)$$

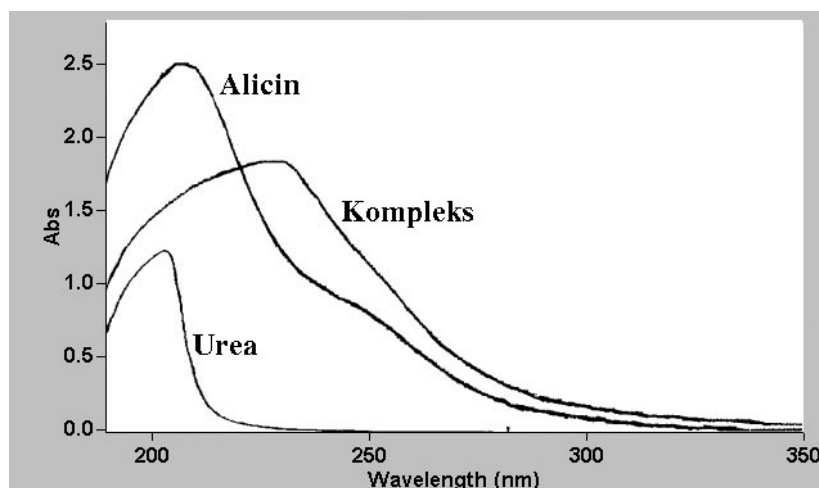
dok se apsorbanca od koncentracije alicina u kompleksu pokorava sledećoj korelaciji:

$$A_{254} = 0,0605 + 574,914 \cdot C_{A2}; \quad r = 0,934 \quad (18)$$

Ultraljubičasta spektroskopska analiza kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin. UV spektri kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin, čistog alicina i čiste uree prikazan je na slici 54. Na slici se jasno mogu videti razlike u apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane svakog jedinjenja. Imaju karakteristične krive apsorpcije sa odgovarajućim maksimumima. Slično ranijem tumačenju (deo 4.1.3.) kod alicina postoje dva karakteristična apsorpciona maksimuma, glavni na 198 nm i sekundarni na 254 nm. Čista urea pokazuje maksimum apsorbanace na $\lambda=208$ nm. S obzirom na strukturu karbamida koja u sebi sadrži hromofor, C=O, za koji su direkto vezane dve auksohromne, NH₂-grupe, apsorpcioni maksimum potiče od $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \sigma^*$ elektronskog prelaza. Auksohromne grupe koje su direktno vezane za karbonilnu grupu imaju veliki hipsokromni uticaj na $n \rightarrow \pi^*$ i manji batokromni efekat na $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronski prelaz. Hipsokromni efekat $n \rightarrow \pi^*$ elektronskog prelaza je rezultat induktivnih i rezonancionih efekata koji povećavaju energiju π^* -orbitale i istovremeno smanjuju energiju n-elektrona. Auksohromne grupe svoje nevezivne elektrone dele sa hromofornom grupom i dovode do produžene konjugacije tj. do nove produžene hromofore koja apsorbuje ($n \rightarrow \sigma^*$) oko početka bliske ultraljubičaste oblasti tj. u oblast apsorpcionog maksimuma uree. Kod kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin apsorpcioni maksimum je znatno razvučeniji i javlja se na $\lambda=230$ nm. Izrazito batokromno pomeranje apsorpcionog maksimuma kompleksa u odnosu na čiste komponente, može se objasniti različitom stabilizacijom π -, π^* -, $n(p_y)$ -orbitala zbog interakcije karbamida i alicina, koja je najverovatnije po tipu intramolekulske vodonične veze.



Tako je n-orbitala najvećim delom stabilizovana stvaranjem vodonične veze u kojoj učestvuju n-elektroni između molekula domaćina i gosta. Antivezivna π^* -orbitala je, zbog svoje veće polarnosti, više stabilizovana, uzimajući u obzir da je i alicin polaran, u odnosu na vezivnu π -orbitalu. Posledica ovoga je smanjenje energije $\pi \rightarrow \pi^*$, i povećanje energije $n \rightarrow \pi^*$ elektronskog prelaza.



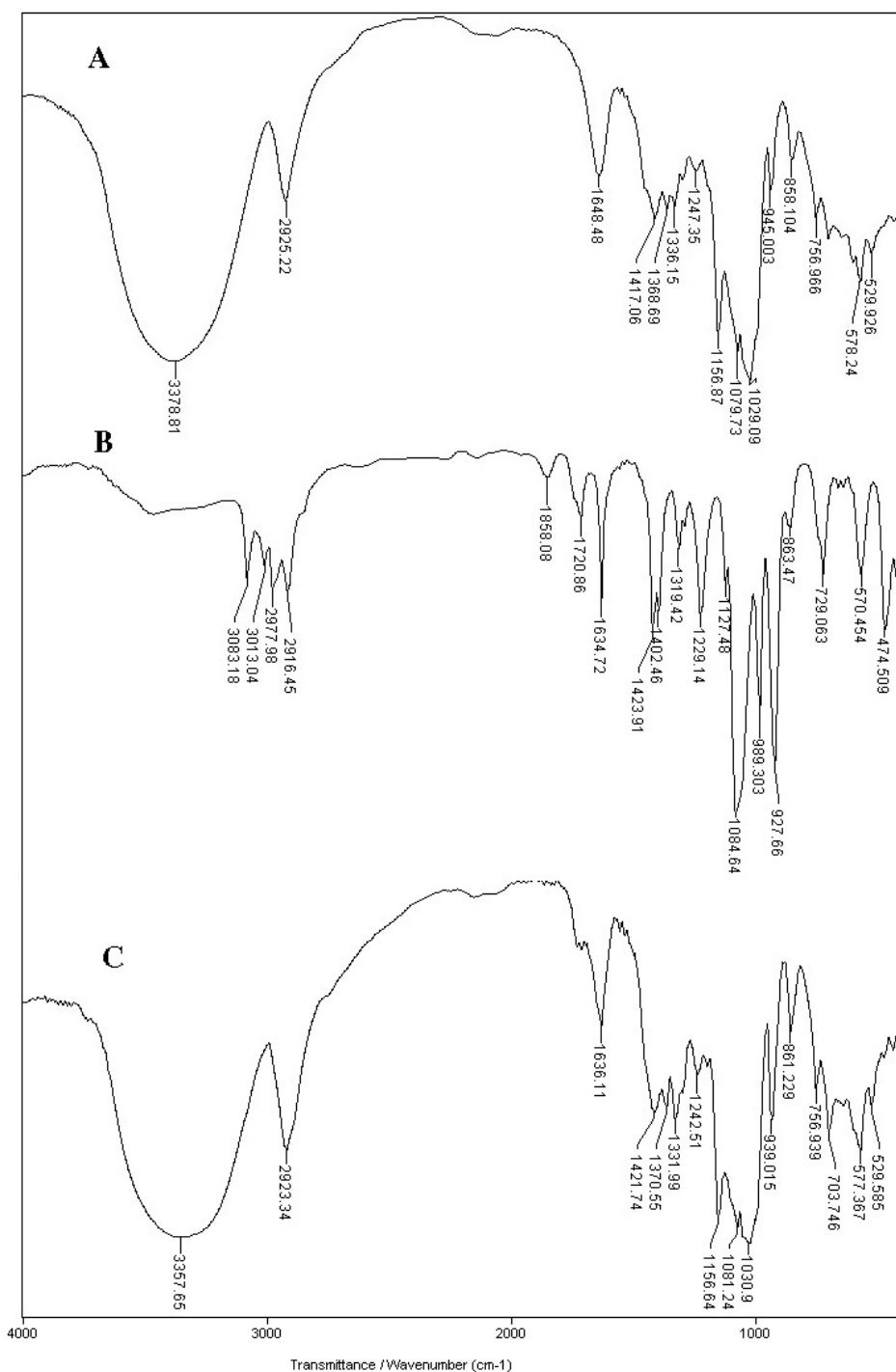
Slika 54 UV spektri vodenih rastvora čiste uree ($c=30 \text{ mg/cm}^3$), alicina ($c=0,28 \text{ mg/cm}^3$) i kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin (4:1), za istu koncentraciju alicina u kompleksu i vodenom rasvoru čistog alicina

4.4.2.2. Infracrvena spektroskopija (IC) inkluzionih kompleksa

IC spektroskopija molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin. Uporedni pregled spektara čistog alicina, β -ciklodekstrina i molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin prikazan je na slici (55).

U IC spektru β -ciklodekstrina, koji odgovara literaturnim ispitivanjima [83] zapažena je široka intenzivna traka u oblasti oko 3400 cm^{-1} , koja je rezultat valencionih OH vibracija. U oblasti oko 2930 cm^{-1} postoji traka od asimetričnih i simetričnih valencionih C-H vibracija CH_2 - grupe, ali i valencione C-H vibracije iz CHOH grupe. Deformacione $\delta(\text{C-H})$ vibracije, CH_2 i CHOH grupe padaju u oblast od 1200 do 1400 cm^{-1} . U ovoj oblasti se očekuju i trake od deformacionih $\delta(\text{O-H})$ vibracija, CHOH grupacija. U oblasti talasnih brojeva od 1200 do 1000 cm^{-1} javlja se kompleksna traka sa više maksimuma: $1150, 1079, 1029 \text{ cm}^{-1}$, koja se asignira kao kuplovana vibracija koja uključuje CO, COC, CCO, CCC asimetrične valencione vibracije. Deformacione vibracije C-CH kuplovane sa C-C valencionim i CCO, OCO, COC deformacionim vibracijama glukopiranoznih jedinica padaju u oblast talasnih brojeva od 700 do 1000 cm^{-1} . Često se na osnovu izgleda spektra u ovoj oblasti može odrediti konformacija glukopiranozne jedinice. S obzirom da u IC spektru β -ciklodekstrina postoje trake na 945 i 858 cm^{-1} , koje su karakteristične za C1 stoličastu konformaciju, potvrđuju da

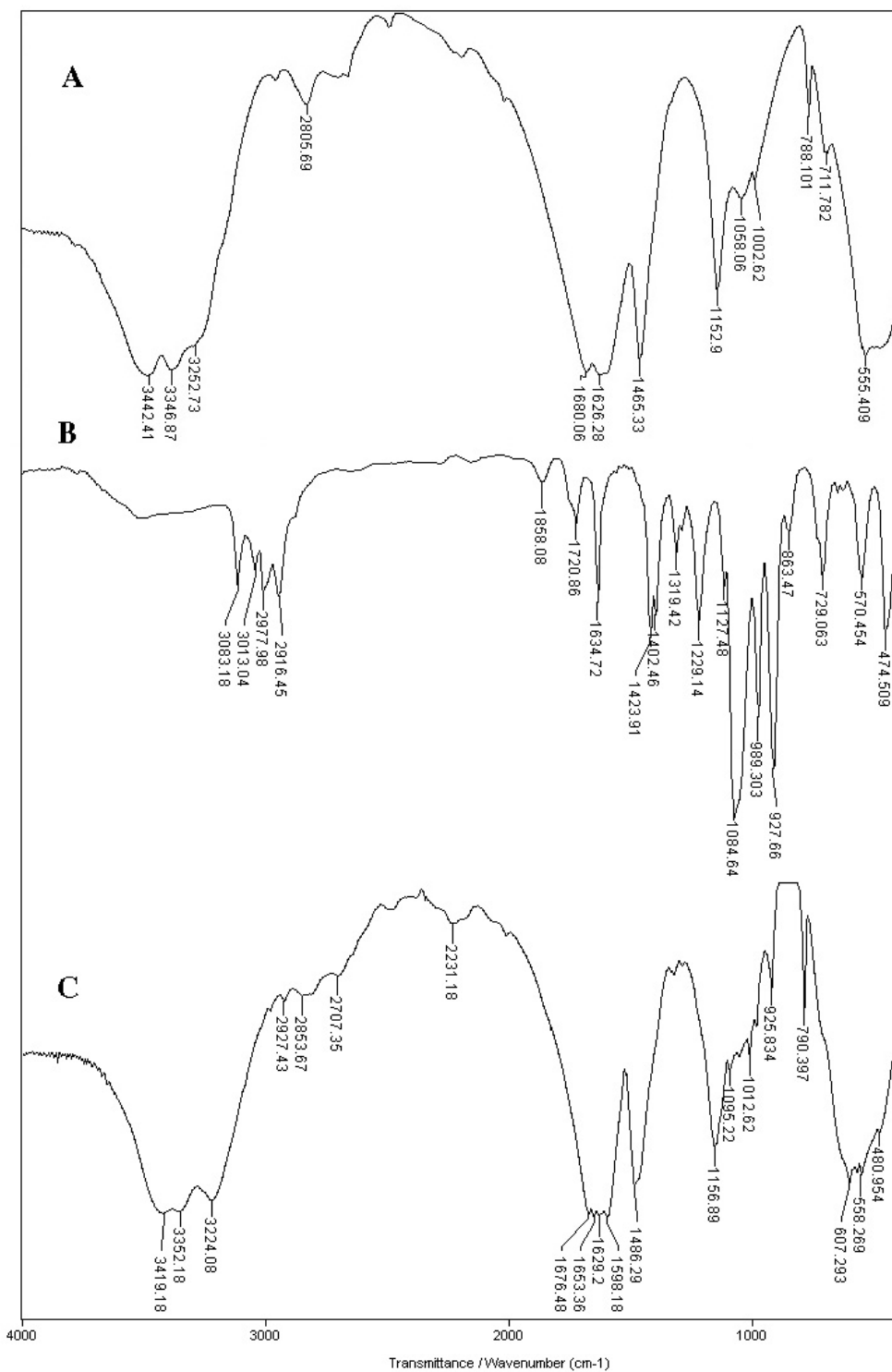
su i ovde glukopiranozne jedinice u toj konformaciji. Dve trake u oblasti 756 i 938 cm^{-1} potvrda su da su glukopiranozne jedinice u molekulu β -ciklodekstrina povezane $\alpha(1\rightarrow4)$ glukozidnom vezom.



Slika 55 IC spektri β -ciklodekstrina (A), alicina (B) i molekulskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin (C)

Kod kompleksa β -ciklodekstrin-alicin, ako bi se radilo o prostoj fizičkoj smeši, IC spektar bi trebalo da predstavlja jednostavno sumu spektara polaznih jedinjenja. Ukoliko, bi se pak eventualno uspostavila neka hemijska veza, vodonikova ili pak veza interakcije Van der Waals-ovog tipa izgled spektara u odnosu na polazna jedinjenja bi trebalo da bude različit po intenzitetu, obliku, položaju i broju traka. Analiza IC spektara kompleksa pokazuje da su spektri u osnovi slični i da postoje razlike u položaju nekih traka u kompleksu u odnosu na polazna jedinjenja. Prvo centroid kompleksne trake u spektru kompleksa u oblasti valentnih $\nu(\text{OH})$ vibracija je pomeren za oko 20 cm^{-1} prema nižim frekvencijama u odnosu na položaj slične trake u spektru β -ciklodekstrina. Ova činjenica ukazuje na to da je kod kompleksa došlo do interakcije alicina sa β -ciklodekstrinom po tipu vodonikove veze koja se verovatno ostvaruje između OH grupa β -ciklodekstrina, proton donora, i S=O grupe iz alicina, kao proton akceptora. Na osnovu napred iznesenog može se zaključiti da kompleks ne predstavlja prostu fizičku smešu. U oblasti od $1200\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ u kojoj se kod β -ciklodekstrina očekuju trake od $\nu(\text{C-O})$ i $\nu(\text{C-O-C})$ postoje tri trake $1156, 1079$ i 1029 cm^{-1} , u spektru alicina postoji jedna traka na 1085 cm^{-1} , koju po svom intenzitetu, obliku i položaju treba pripisati $\nu(\text{S=O})$ vibraciji. U spektru kompleksa se prema očekivanju nalaze trake na $1156, 1081 \text{ cm}^{-1}$ sa slabo izraženim prevojem na visoko frekventnoj strani i 1030 cm^{-1} . Trake na 1156 i 1030 cm^{-1} imaju istu frekvenciju kod svih jedinjenja, a samo traka od $\nu(\text{S=O})$ vibracija je pomerenka ka nižim frekvencijama, idući od alicina ka kompleksu za 4 cm^{-1} , što se očekuje, ukoliko je S=O grupa uključena u obrazovanju vodonične veze u kompleksu. U ostalim spektralnim oblastima položaj traka, oblik i intenzitet nije promenjen. Tako, recimo, trake u oblasti spektra kompleksa od $945, 860$ i 760 cm^{-1} , karakteristične za C1 konformaciju glukopiranozne jedinice imaju isti intenzitet, oblik i položaj kao kod β -ciklodekstrina, što ukazuje da C1 konformacija glukopiranozne jedinice u toku sinteze kompleksa nije izmenjena.

IC spektroskopija kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin. Na slici 56 prikazani su IC spektri sintetisanog alicina, uree i kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin.



Slika 56 IC spektri uree (A), alicina (B) i kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin (C)

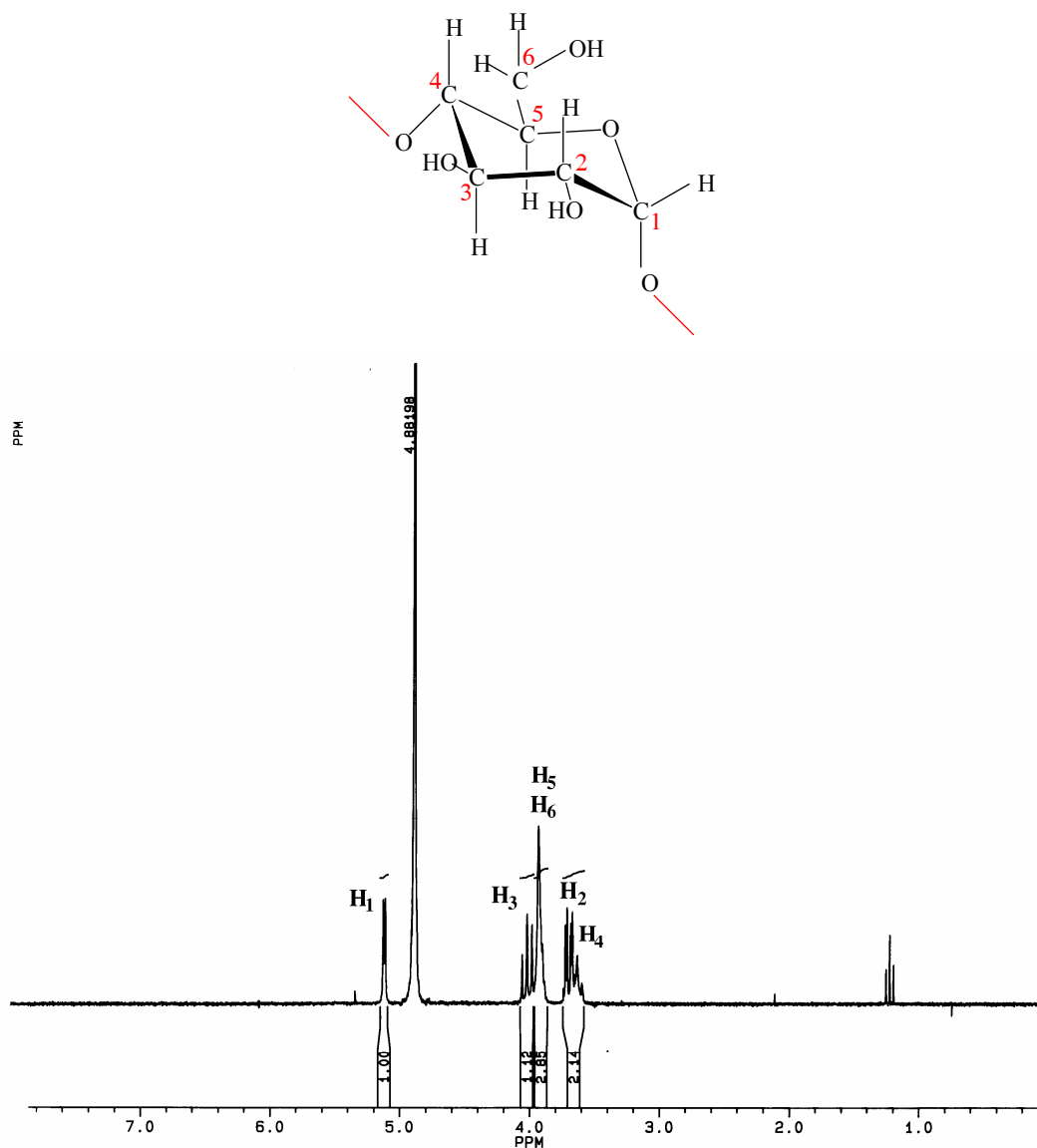
U spektru karbamida u oblasti 3000-4000 cm^{-1} javljaju se dve karakteristične trake koje potiču od valencionih N-H vibracija, $\nu(\text{N-H})$. Asimetrična valencionna vibracija, $\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$ pokazuje maksimum na 3442 cm^{-1} , dok se simetrična valencionna vibracija, $\nu_{\text{s}}(\text{N-H})$ javlja na 3346 cm^{-1} . U sklopu ove kompleksne i intenzivne trake javlja se kao mali prevoj traka slabijeg intenziteta na 3252 cm^{-1} i pripisana je višem tonu N-H-deformacione vibracije, $\gamma(\text{N-H})$. Deformaciona vibracija u ravni, $\delta(\text{N-H})$, NH_2 grupe daje jaku traku na 1626 cm^{-1} i karakteristika je primarnih amina. Široka i kompleksna traka jakog intenziteta u oblasti od 700-600 cm^{-1} potiče od N-H - deformacionih vibracija van ravni, $\gamma(\text{N-H})$ i takođe je karakteristična za primarne amine, a poznata je kao "amidna traka II". "Amidna traka III" potiče od C-N-valencionih vibracija, $\nu(\text{C-N})$, koje se kupluju sa N-H -deformacionim vibracijama. U spektru karbamida javlja se na 1465 cm^{-1} , oštra je i jakog intenziteta. "Amidna traka I" potiče od valencione vibracije, $\nu(\text{C=O})$, C=O grupe i njen položaj u velikoj meri zavisi od jačine vodonične veze odnosno fizičkog stanja uzorka. U IC spektru karbamida ona se javlja na oko 1680 cm^{-1} , što pokazuje da molekuli nisu u asosovanom već u slobodnom stanju. U IC spektru kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin postoje razlike u odnosu na IC spektre alicina i uree. U oblast od 3000-4000 cm^{-1} , u kompleksu, dva pika iz uree su objedinjena u jedan širi i kompleksniji pik sa slabo naglašenim prevojem čiji maksimum je pomeren ka nešto nižoj vrednosti frekvencije, što je karakteristika za pojavu vodonične veze, a znatno jasnije je izražen pik na oko 3224 cm^{-1} . Ova oblast pokriva valencione vibracije N-H, $\nu(\text{N-H})$ iz molekula uree i valencione C-H vibracije, $\nu(\text{C-H})$, iz alicina. "Amidna traka I" koja potiče od valencione vibracije C=O grupe, u kompleksu je pomeren ka manjoj vrednosti frekvencije i nalazi se na 1676 cm^{-1} , što takođe ukazuje na pojavu vodonične veze u kompleksu. Deformacione vibracije, $\delta(\text{N-H})$, iz NH_2 grupe u kompleksu javljaju se na 1653 cm^{-1} , dakle na nešto većoj vrednosti frekvencije nego kod čiste uree, najverovatnije zbog intermolekulske vodonične veze između alicina i uree u kompleksu. U prilog ovoj konstataciji ide i pomeranje "amidne trake III" u kompleksu na veću vrednost frekvencije tj. na 1486 cm^{-1} i "amidne trake II" koja se u kompleksu pojavljuje kao kompleksna i intenzivna traka sa maksimumom na 607 cm^{-1} .

Na osnovu rezultata iz IC spektara (slika 56) može se zaključiti da je u kompleksu tj. "rešetkastom inkluzionom jedinjenju" urea-alicin, u kome kanale koji sadrže alicin (molekul gosta) obrazuje kristalna rešetka domaćina (urea), ostvarena intermolekulska vodonična veza tipa N-H-----O. Posledica građenja vodonične veze je slabljenje kovalentnih veza u akceptoru ($>\text{S}=\text{O}$) i donoru ($>\text{N-H}$), odnosno smanjenje konstanti sile njihovih valencionih vibracija. S toga je jasno, što je u ovim grupama došlo do smanjenja

frekvencija valencionih vibracija i povećanja frekvencija deformacionih vibracija, što je u predhodnom odeljku i komentarisano.

4.4.2.3. Nuklearna magnetna rezonanca(NMR) inkluzionih kompleksa

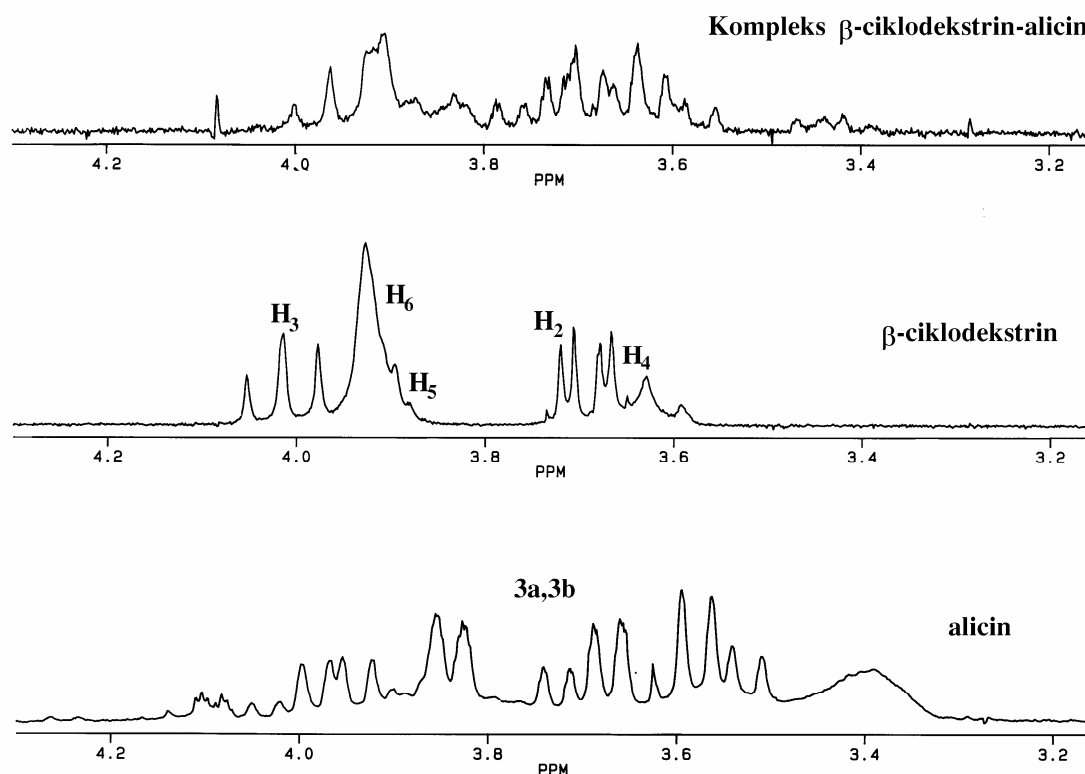
Protonski NMR spektri molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin. Na slici 57 prikazan je ^1H -NMR spektar čistog β -ciklodekstrina snimljen u D_2O . S obzirom da u strukturi β -ciklodekstrina postoje sedam glukopiranoznih jedinica koje su povezane $\alpha(1\rightarrow4)$ -glukoziidnom vezom, na primeru jedne glukopiranozne jedinice, označeni su protoni koji daju signale u ^1H -NMR spektru u formuli:



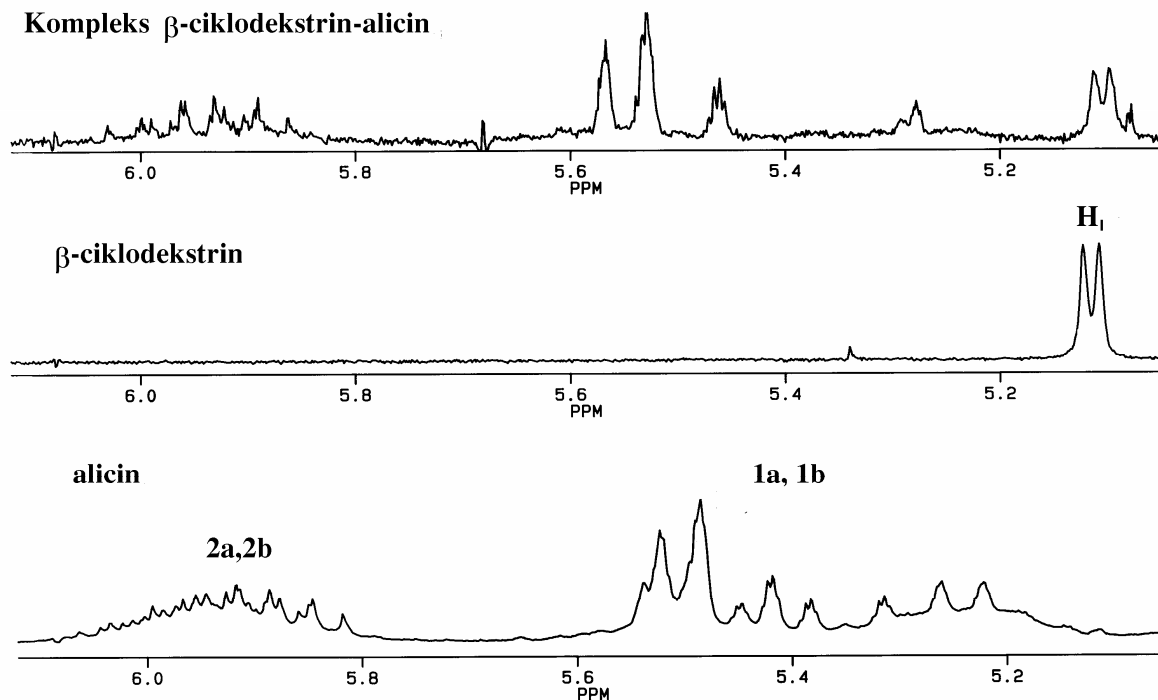
Slika 57 ^1H -NMR spektar čistog β -ciklodekstrina snimljen u D_2O

Naime, u spektru se mogu uočiti tri grupe signala i to dva multiplleta i jedan dublet. Dublet u oblast hemijskih pomeranja δ 5-5,2 potiče od H_1 protona glukopiranoznih jedinica β -ciklodekstrina. Multiplet u oblasti hemijskih pomeranja od δ 3,8-4,1 sastoji se iz tripleta koji odgovara H_3 protonima i jednog intenzivnog signala na δ 3,9 koji odgovara H_6 protonima i preklapa se sa dva signala slabijeg intenziteta koji se pojavljuju na δ 3,85 i 3,87 a potiču od H_5 protona glukopiranoznih jedinica β -cilodekstrina. Multiplet u oblasti hemijskih pomeranja δ 3,6-3,8 sastoji se od dubleta na δ 3,72 koji asignira H_2 protone i multiplleta na δ 3,6-3,7 koji odgovara H_4 protonima u β -ciklodekstrinu, a što je u saglasnosti sa literaturnim ispitivanjima [45, 47].

U $^1\text{H-NMR}$ spektru sintetisanog alicina, koji je takođe snimljen u D_2O (slika 21 prikazana u delu 4.1.3.), uočavaju se tri grupe signala tj. multiplta. Kako je ranije već diskutovano (deo 4.1.3.) multiplet na δ 3,2-3,4 potiče od 3a i 3b protona alicina tj. fragmenta $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}$. U oblasti hemijskih pomeranja od δ 5-5,6, multiplet odgovara 1a i 1b protonima tj. fragmentu $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$. I multiplet na δ 5,8-6,2 potiče od 2a i 2b protona odnosno iz fragmenta alicina $\text{C}=\text{CH}-\text{C}$.



Slika 58 a $^1\text{H-NMR}$ spektar molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin, β -ciklodekstrina i alicina za oblast δ 3 - 5 ppm



Slika 58 b $^1\text{H-NMR}$ spektar molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin, β -ciklodekstrina i alicina za oblast δ 5 - 6,5 ppm

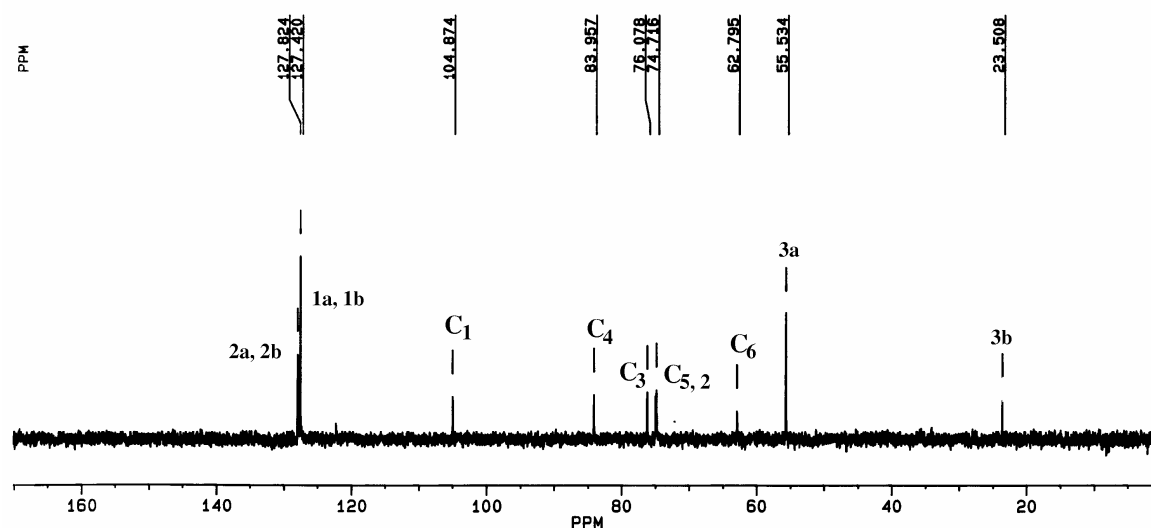
$^1\text{H-NMR}$ spektar kompleksa prikazan je na slici 58 a i b. Uporedo sa njim, prikazani su spektri β -ciklodekstrina i alicina, i to različiti regioni spektra, da bi se lakše uočile razlike između spektara.

Naime, u spektru molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin uočava se pet grupa multipleta. Multiplet u oblasti hemijskih pomeranja δ 3,5-3,8 je složeniji nego li kod β -ciklodekstrina i alicina i neznatno je pomeren ka većim vrednostima δ jedinica. Multiplet na δ 3,85-4 se takođe razlikuje od β -ciklodekstrina i alicina. Indikativno je da je triplet od H_3 protona iz β -ciklodekstrina u kompleksu pomeren sa δ 4,018 na δ 3,956. Dakle, pojavljuje se $\Delta\delta$ od 0,062, što je potvrda da H_3 proton iz β -ciklodekstrina učestvuje u građenju vodoničnih veza pri formiranju kompleksa, a vrednost pomeranja je identična sa podacima o građenju kompleksa β -ciklodekstrina sa drugim jedinjenjima iz literature i mera je vrlo jakih hidrofobnih interakcija između molekula gosta i domaćina u inkluzionom kompleksu [45, 47 i 83]. U prilog ovoj konstataciji ide i

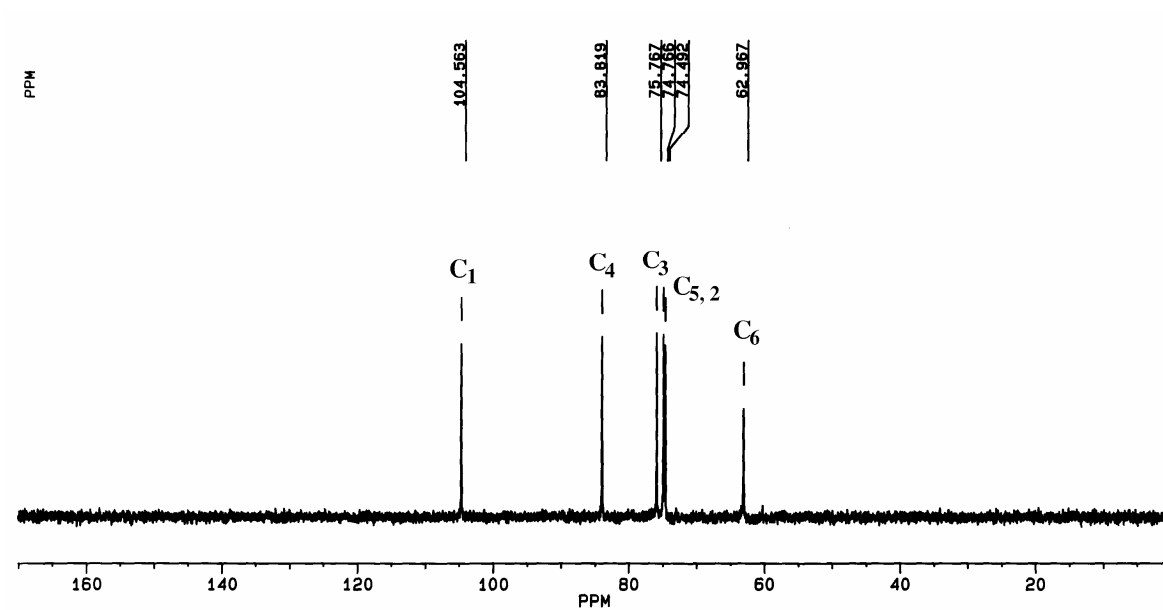
pomeranje multipleta na δ 5,4-5,6 u kompleksu u odnosu na signale 1a i 1b protona iz alicina. I multiplet u kompleksu na δ 5,82 je pomeren ka većim vrednostima δ u odnosu na alicin tj. u odnosu na signale od 2a i 2b protone iz alicina.

Na osnovu rezultata $^1\text{H-NMR}$ analize vidi se da kompleks nije prosta fizička smeša, već da je došlo do interakcije između β -ciklodekstrina i alicina po tipu intermolekulske vodonične veze i to najverovatnije $\text{O-H}_3\text{---O-S}$, ali se ne isključuje i interakcija između $\text{O-H}_2\text{---O-S}$, s obzirom da se u $^1\text{H-NMR}$ spektru kompleksa zapaža pomeranje signala i od ovog protona.

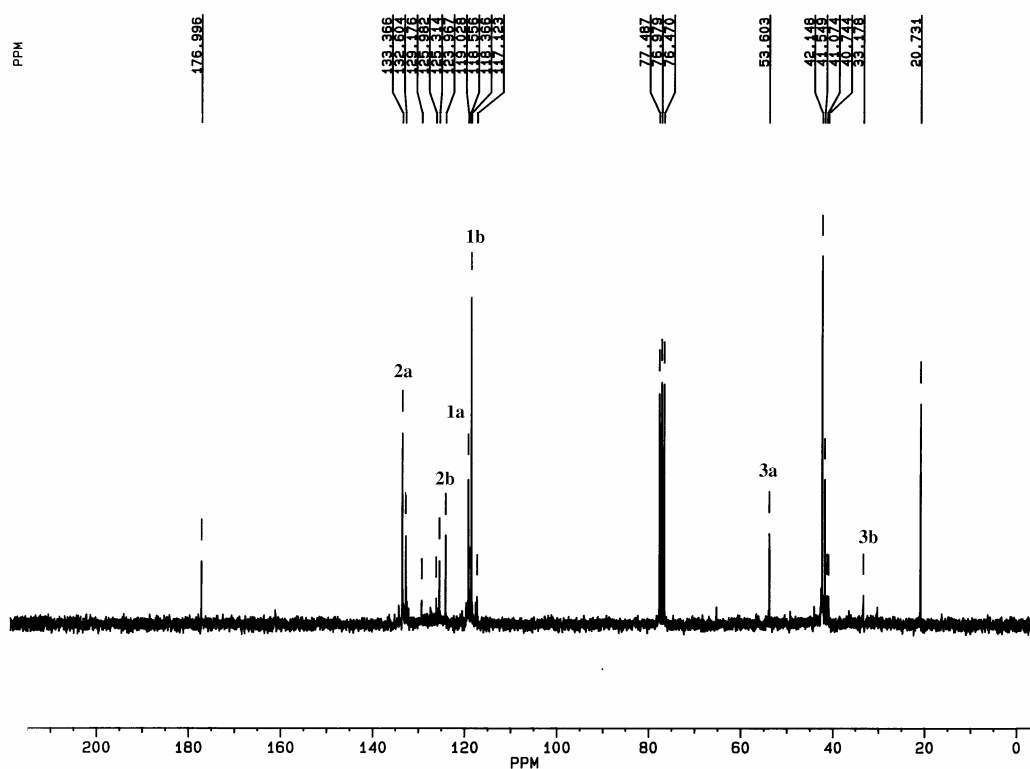
$^{13}\text{C-NMR}$ spektri molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin. U cilju potvrde interakcije β -ciklodekstrina i alicina u molekuskom inkluzionom kompleksu urađena je $^{13}\text{C-NMR}$ analiza kompleksa (slika 59), β -ciklodekstrina (slika 60) i alicina (slika 61) a hemijska pomeranja pikova su data u tabeli 19.



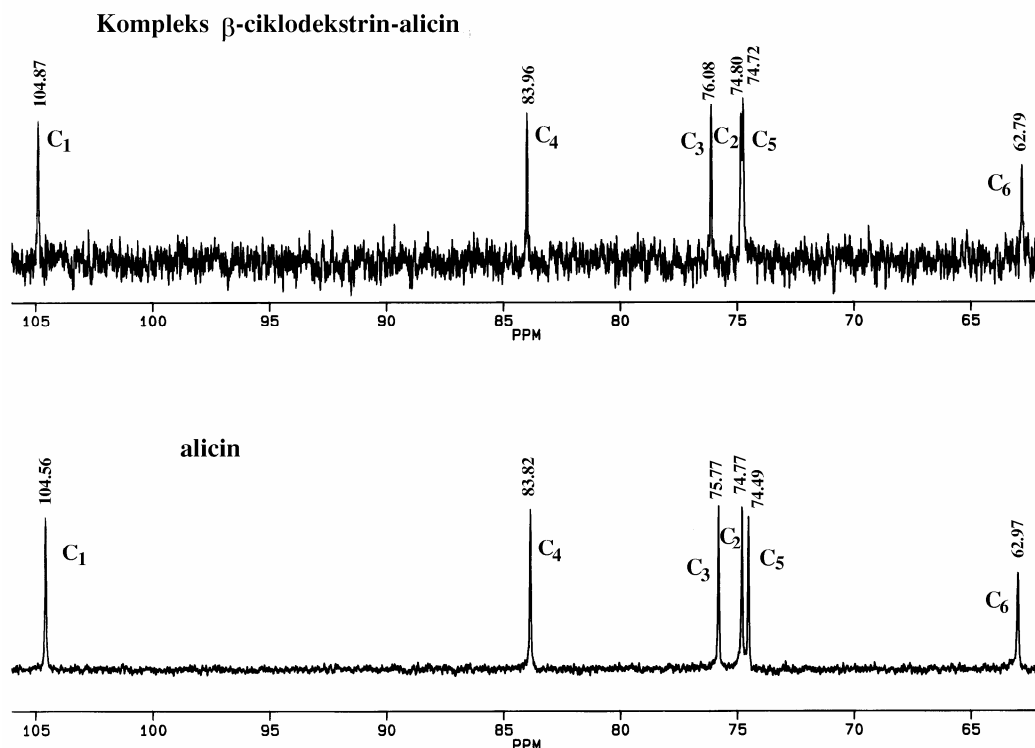
Slika 59 $^{13}\text{C-NMR}$ spektar molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin snimljen u D_2O



Slika 60 ^{13}C -NMR spektar čistog β -ciklodekstrina snimljen u D_2O



Slika 61 ^{13}C -NMR spektar sintetisanog i prečišćenog alicina snimljen u CDCl_3



Slika 62 ^{13}C -NMR spektri molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin i β -ciklodekstrin snimljeni u D_2O (region spektra δ 60-105 ppm)

Tabela 19 ^{13}C -NMR hemijska pomeranja za β -ciklodekstrin i inkluzioini kompleks β -ciklodekstrina i alicina i razlike u hemijskom pomeranju

Ugljenik	Hemijska pomeranja, δ (ppm)					
	1	2	3	4	5	6
β -ciklodekstrina	104,56	74,77	75,77	83,82	74,49	62,97
β -ciklodekstrin-alicin	104,87	74,80	76,08	83,96	74,72	62,79
$\Delta\delta$ (ppm)	- 0,31	- 0,03	- 0,31	- 0,14	- 0,23	+ 0,18

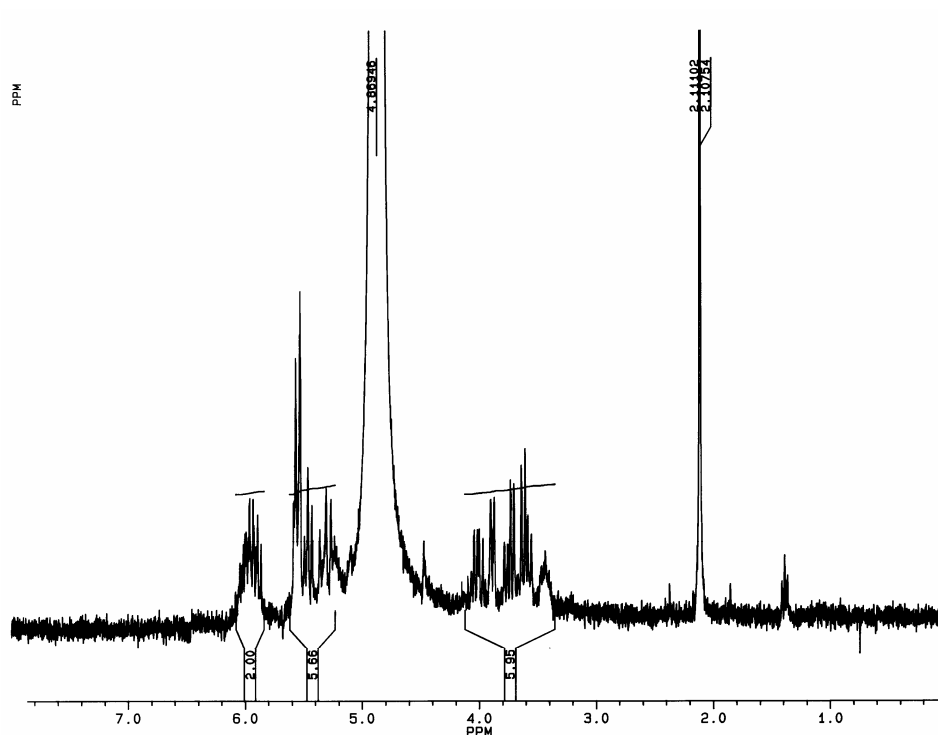
Iz slika 59 do 62 i tabele 19 vide se hemijska pomeranja za C-atome β -ciklodekstrina čistog i u inkluzionom kompleksu sa alicinom. Najveća hemijska pomeranja $\Delta\delta$ su zapažena na C-atomima u položaju 1, 3 i 5, što sugeriše na učestvovanje H i O-atoma vezanih za ove ugljenike u stvaranju vodoničnih veza sa molekulima alicina, gosta u kompleksu, a što je u saglasnosti sa literaturom [83].

Takođe se može uočiti da su signali od 3a, 1a i 1b ugljenika iz alicina u kompleksu pomereni ka nešto većim vrednostima hemijskog pomeranja. To upućuje najverovatnije na postojanje interakcije protona vezanih za ove C-atome u alicinu sa protonima i OH grupama u molekulu β -ciklodekstrina.

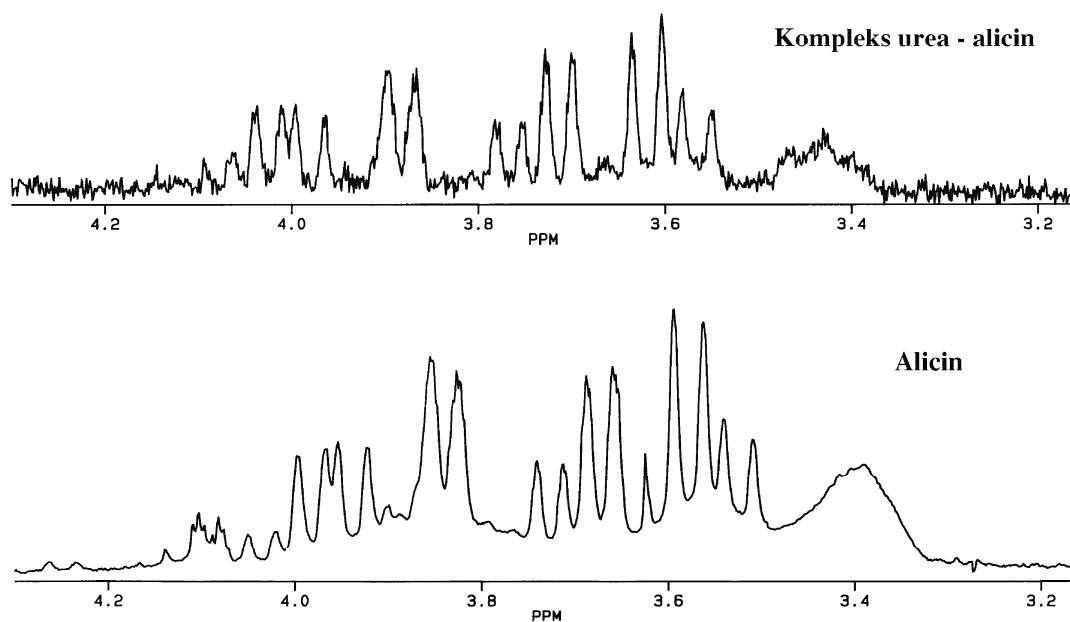
Protonski NMR spektri kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin. U cilju pojašnjenja strukture tj. interakcije alicina i uree u kanalskom inkluzionom kompleksu urea-alicin urađeni su $^1\text{H-NMR}$ spektri kompleksa (slika 63) i alicina (slika 21).

S obzirom na strukturu karbamida u kojoj postoje protoni direktno vezani za heteroatom (azot, N), njihove precesione frekvencije tj. položaj signala u $^1\text{H-NMR}$ spektru u mnogome zavisi od elektronske gustine, odnosno kiselosti protona. Javljaju se u širokoj oblasti hemijskih pomeranja od δ 5,8 do 6,2, kao karakteristično, široko i nisko uzvišenje. U toj oblasti padaju i signali od 2a i 2b protona iz alicina tj. fragmenta alicina $\text{C}=\text{CH}-\text{C}$, takođe kao nisko i široko uzvišenje. U kompleksu je ovaj multiplet nešto intenzivniji, kompleksniji i više pomeren ka višim vrednostima hemijskog pomeranja, što pokazuje da protoni uree na azotu učestvuju u građenju vodonične veze sa alicinom tj. kiseonikovim atomom iz alicina. Multiplet u spektru alicina u oblasti hemijskih pomeranja od δ 5,2-5,6, a koji potiče od 1a i 1b protona iz alicina ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}$), u spektru kompleksa je intenzivniji, složenijeg izgleda i takođe pomeren ka većim vrednostima hemijskog pomeranja. Multiplet u oblast hemijskih pomeranja od δ 3-4,4 koji asignira 3a i 3b protone u alicinu ($\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}$), takođe u spektru kompleksa je pomeren ka većim vrednostima hemijskog pomeranja. Ove promene se jasnije uočavaju na slikama 64 a i b na kojima su prikazani uporedo spektri kompleksa i alicina u različitim regionima.

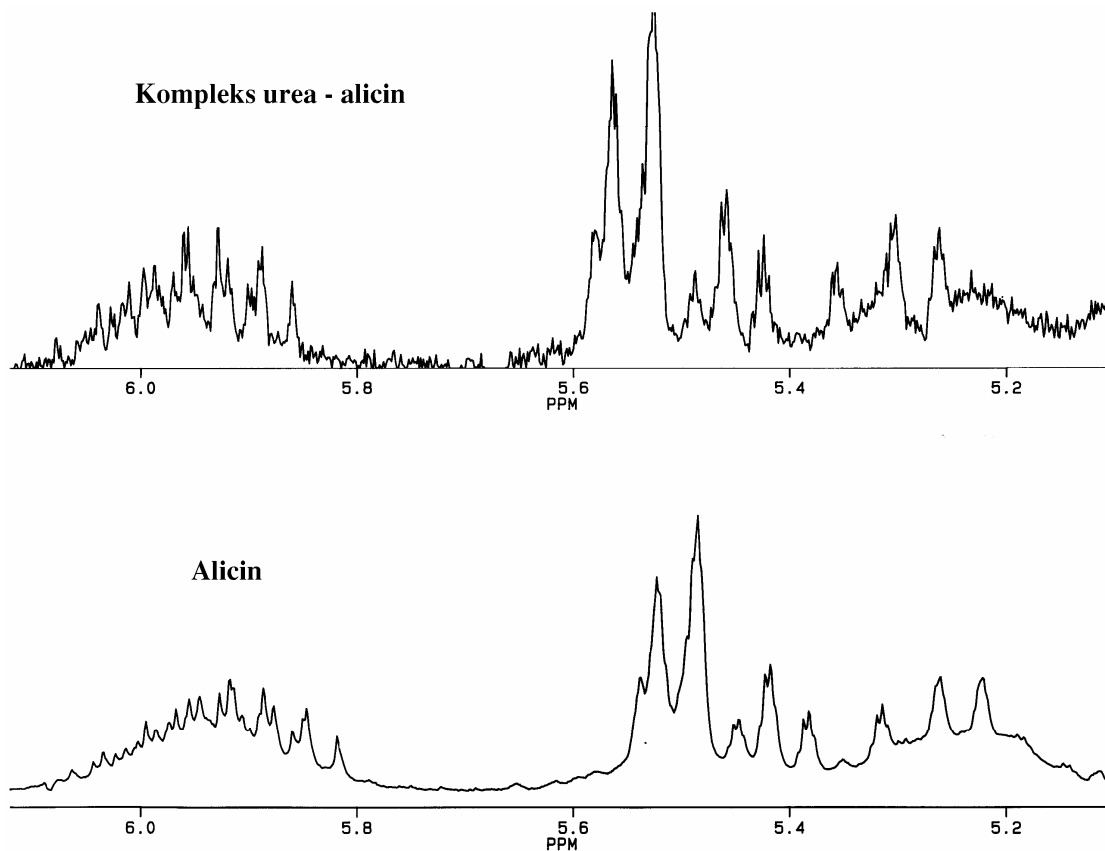
Rezultati $^1\text{H-NMR}$ ispitivanja ukazuju da je u rešetkastom kanalskom inkluzionom kompleksu urea-alicin došlo do interakcije uree sa alicinom najverovatnije po tipu vodonične veze između protona sa azota iz uree i kiseonika iz alicina ($>\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}-\text{S}<$).



Slika 63 $^1\text{H-NMR}$ spektar kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin, snimljen u D_2O



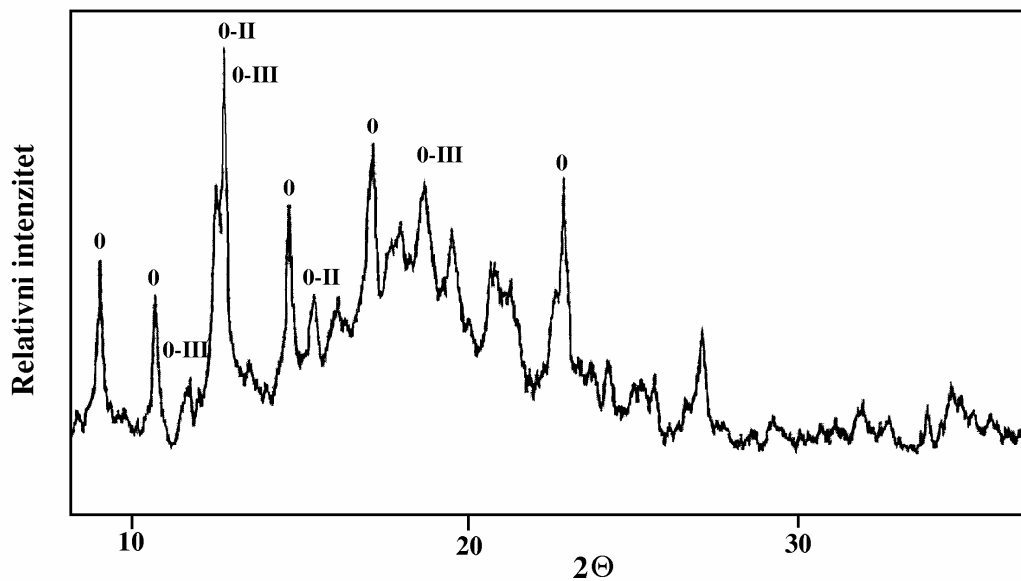
Slika 64 a $^1\text{H-NMR}$ spektri kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin i alicina snimljeni u D_2O (region spektra δ 3,2-4,2 ppm)



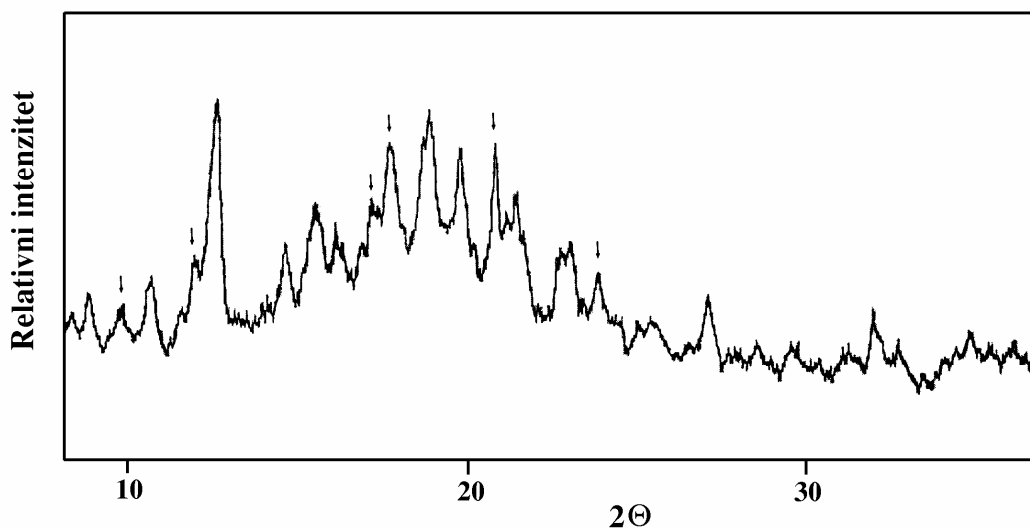
Slika 64 b ¹H-NMR spektri kanalskog inkluzionog kompleksa urea-alicin i alicina snimljeni u D₂O (region spektra δ 5-6 ppm)

4.4.2.4. Difrakcija X-zraka (X-R difrakciona analiza)

Molekulski inkluzioni kompleks β-ciklodekstrin-alicin. Za kristalografska ispitivanja molekulskog inkluzionog kompleksa β-ciklodekstrin-alicin, pripremljena je serija uzoraka sa molskim odnosom β-ciklodekstrin : alicin, 1:1, 1:3, 1:6, kao i uzorak β-ciklodekstrin:alicin, 1:6 , pripremljen u D₂O. Dobijeni uzorci su u obliku belog praha sa niskim stepenom kristaličnosti. Difraktogrami odgovaraju podacima iz JCPDS-tablica za β-ciklodekstrin (32-1626; 27; 28) i prikazani su na slikama 65 a i 65 b.



a)

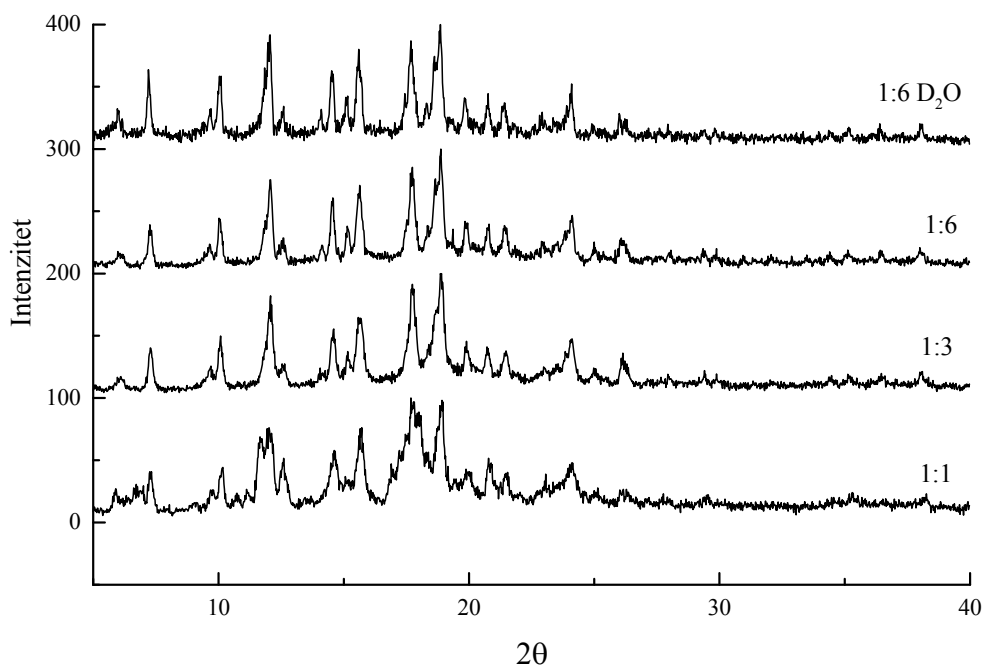


b)

Slika 65 Difraktogram čistog β -ciklodekstrina (a) i molekulskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin za molski odnos 1: 6 (b)

Uporednom analizom difraktograma na slikama 65 a i 65 b uočava se promena položaja i intenziteta određenih pikova (označeni na difraktogramima), što pokazuje da je došlo do inkludovanja alicina u šupljine β -ciklodekstrina, a da pritom nije došlo do promene strukture domaćina.

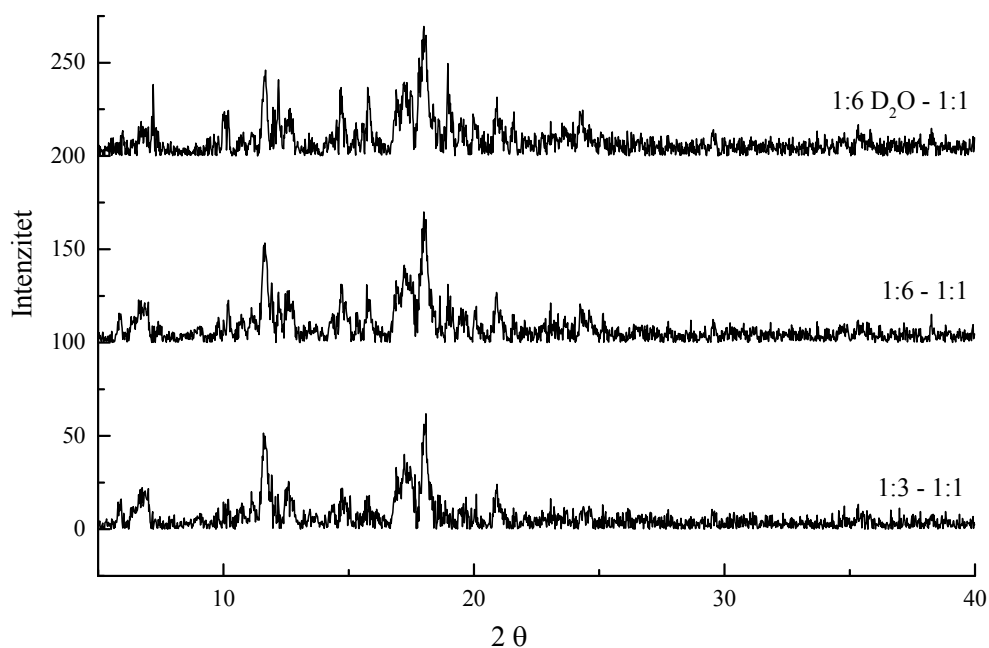
Difraktogrami serije molekulskih inkluzionih kompleksa β -ciklodekstrin-alicin različitog molskog odnosa dati su na slici 66.



Slika 66 Difraktogrami serije molekularnih inkluzionih kompleksa β -ciklodekstrin-alicin različitog molskog odnosa, 1:1, 1:3, 1:6 i uzorak kompleksa pripremljenog iz D₂O, molskog odnosa 1: 6

Poređenjem difraktograma serije kompleksa uočena je takođe samo promena intenziteta pojedinih pikova što isto pokazuje da ugrađivanje alicina u šupljine β -ciklodekstrina ne menja strukturu domaćina kao i to da je neuređeno i nestehiometrijsko. Ukoliko se napravi razlika difraktograma sa najmanjim molskim odnosom (1:1) od difraktograma kompleksa sa odnosom 1:3 i 1:6 dobijaju se difraktogrami sa istim položajem i intenzitetom pikova (slika 67). Ovo pokazuje da se u šupljine β -cilkodekstrina uvek ugrađuje ista količina alicina, što je s jedne strane, povezano sa kapacitetom kanala β -cilkodekstrina i veličinom molekula alicina, a s druge strane sa molekulskim silama (uglavnom vodonične veze) koje se uspostavljaju između molekula gosta i domaćina.

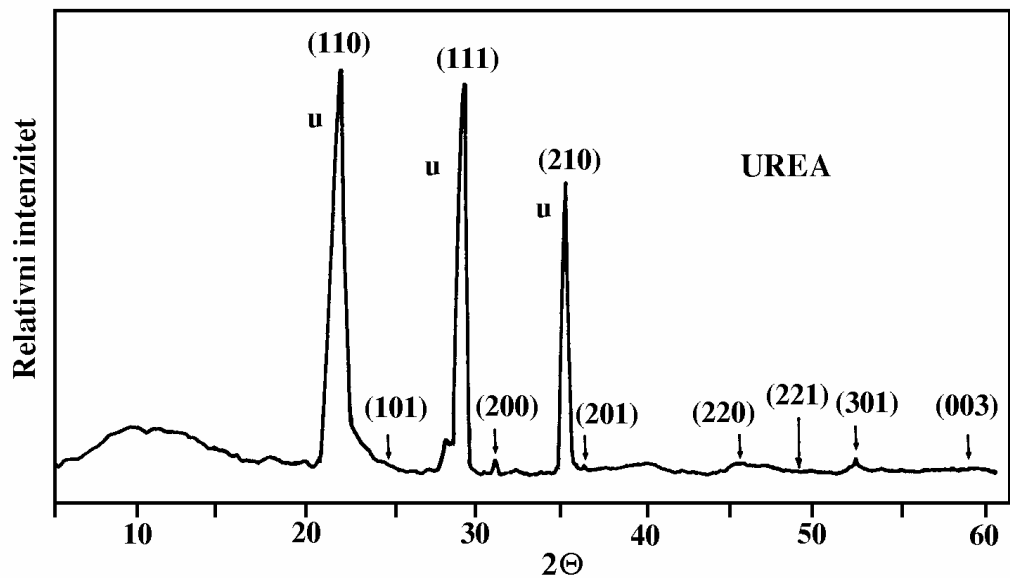
Činjenica da nije došlo do pojave amorfne zone na difraktogramima kompleksa i pri molekulskom odnosu domaćin-gost 1:6, može ukazati na mogućnost inkluzije većeg broja molekula alicina u šupljinu molekula β -ciklodekstrina.



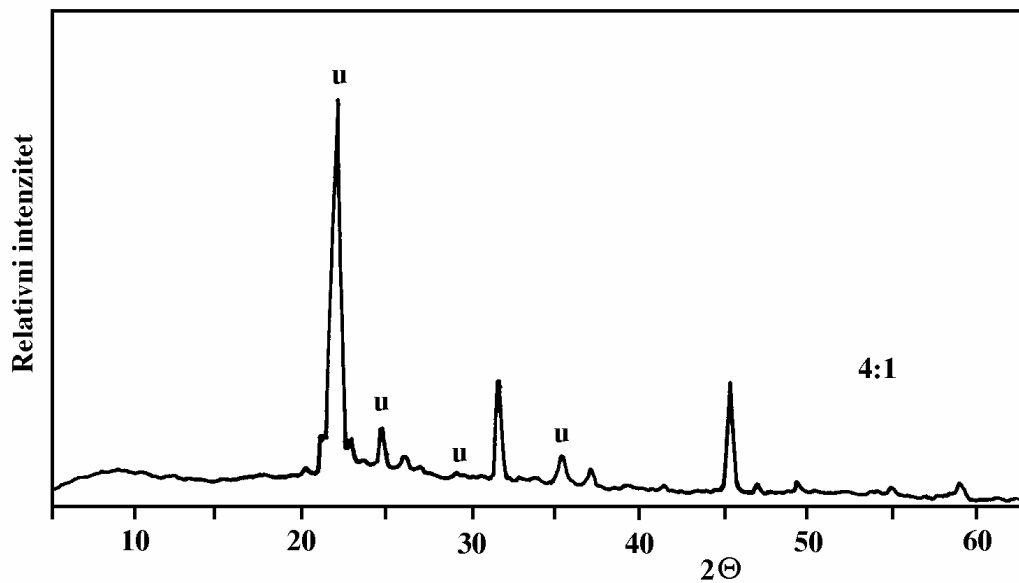
Slika 67 Razlika difraktograma sa najmanjim molaskim odnosom (1:1) od difraktograma molekularskih inkluzionih kompleksa β -ciklodekstrin-alicin sa odnosom 1: 3 i 1: 6

Slika 67 potvrđuje da postoji i pomeranje u 2θ položaju pikova u kompleksiranim uzorcima što je najverovatnije posledica promene parametra rešetke kristala (povećanje zapremine) usled ubacivanja u ovom slučaju alicina u inkluzionom jedinjenju.

Rešetkasti inkluzioni kompleks urea-alicin. Za kristalografska ispitivanja rešetkastog inkluzionog jedinjenja urea-alicin, takođe je pripremljena serija uzoraka sa različitim molaskim odnosima uree i alicina (4:1, 6:1 i 8:1) i uzorak kompleksa urea-alicin (4:1) pripremljen kristalizacijom iz D₂O. Čista urea kao i svi inkluzioni kompleksi urea-alicin su izrazito kristalični. Difraktogrami uree i rešetkastog inkluzionog kompleksa urea-alicin (4:1) prikazani su na slici 68 a i 68 b.



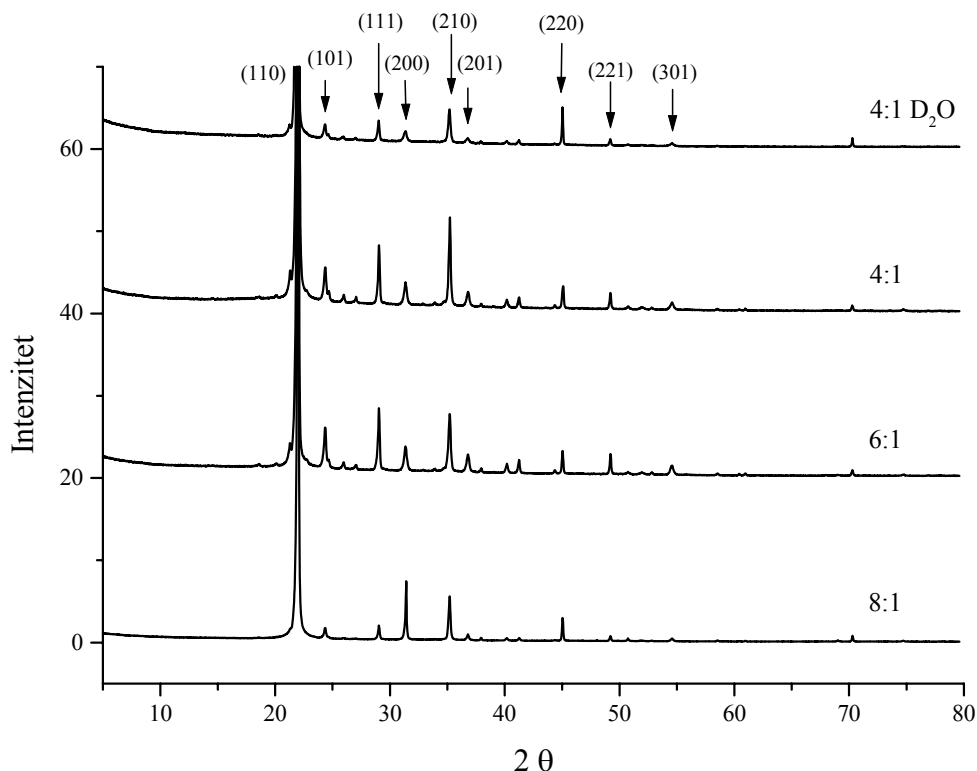
a)



b)

Slika 68 Difraktogram uree (a) i rešetkastog inkluzionog kompleksa urea-alicin 4:1 (b)

Izvršeno je indiciranje pikova polazeći od podataka za ureu (JCPDS 28-2015). Na slici 69 prikazani su difraktogrami serije uzoraka rešetkastih inkluzionih kompleksa urea-alicin.



Slika 69 Difraktogrami uzoraka rešetkastih inkluzionih kompleksa urea-alicin različitih molskih odnosa domaćina i gosta, 8:1, 6:1, 4:1 dobijeni kristalizacijom iz vode i 4:1 kristalizacijom iz D₂O

Analiza difraktograma uree i serije rešetkastih inkluzionih jedinjenja urea-alicin, pokazuje prisustvo amornog pika, promenu intenziteta, kao i neznatno pomeranje položaja pikova karakterističnih za ureu. Promena intenziteta indiciranih pikova može da ukaže na prisustvo alicina u određenoj ravni kristalne rešetke uree, dok je na osnovu pomeranja pikova određena promena parametara elementarne ćelije kristalne rešetke inkluzionog kompleksa u odnosu na ureu (tabela 20).

S obzirom da urea kristališe u tetragonalnom kristalnom sistemu u prostornoj grupi $P\bar{4}2_1m$, parametri jedinične ćelije kristala zadovoljavaju relacije $a=b \neq c$ i $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Na osnovu određivanja tačnog položaja pikova poznatog indeksa (200) i (101) određene su vrednosti međjuravanskih rastojanja koja su direktno povezana sa parametrom **a** i **c** elementarne ćelije kristala. Izračunate vrednosti su date u tabeli 20. Ujedno je izračunata i zapremina elementarne ćelije kristala kao i rendgenska gustina. Može se

zaključiti da povećana količina alicina dovodi do povećanja zapremine ćelije i ujedno do smanjenja rendgenske gustine.

Tabela 20 Parametri elementarnih ćelija uree i serije kompleksa urea-alicin određeni na sobnoj temperaturi

Jedinjenje	a (Å)	c (Å)	D_x (mg/cm ³)	V (Å ³)
CO(NH ₂) ₂ , urea 28-2015	5,645	4,704	1,331	149,90
urea-alicin, 4:1, D ₂ O	5,713	4,644	1,326	151,57
urea-alicin, 4:1	5,686	4,739	1,317	151,12
urea-alicin, 6:1	5,667	4,717	1,329	151,48
urea-alicin, 8:1	5,665	4,718	1,331	151,41
urea na Pt-nosaču	5,663	4,700	1,334	150,73

Rešavanje kristalne strukture kompleksa urea-alicin metodom monokristala. Snimljeni su intenziteti difraktovanih refleksa sa monokristalnog uzorka urea+alicin (4:1) korišćenjem automatskog četvorokružnog difraktometra za monokristale STOE IPDS (Image Plate Detecting System). Snimanje je izvršeno na temperaturi tečnog azota (T=173(2)K) a korišćeno je MoK α zračenje sa grafitnim monohromatorom. Uslovi rada generatora su bili U=50 kV, I=40 mA. Osnovni kristalografski podaci kao i podaci za snimanje i utičnjavanje strukture dati su u tabeli 21.

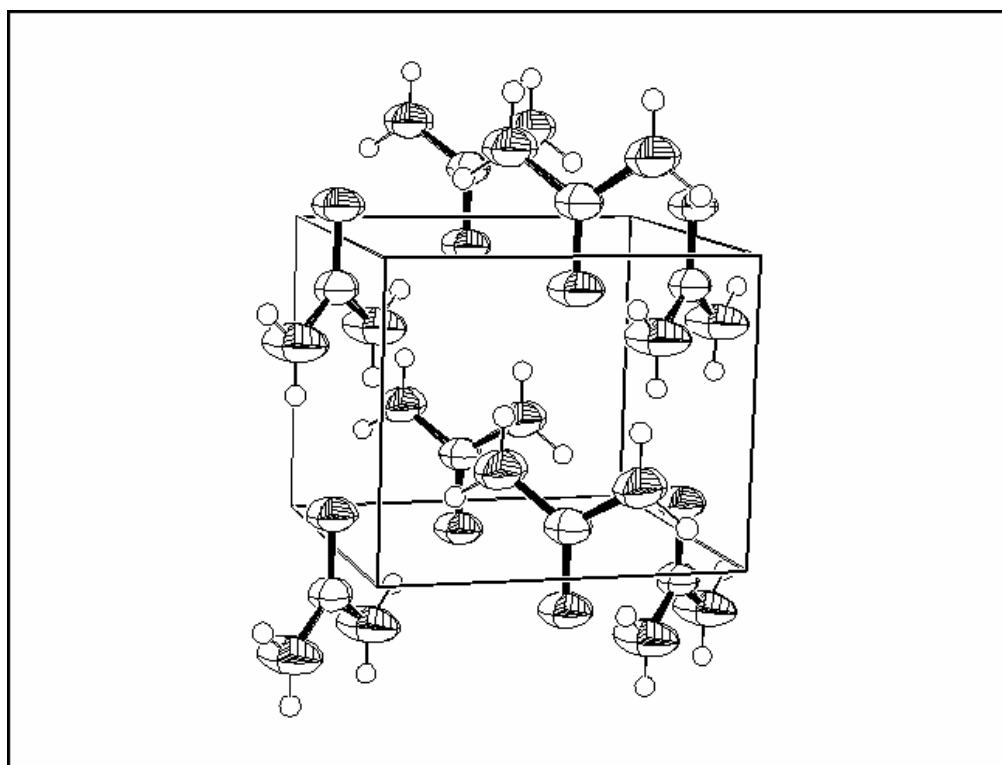
Tabela 21 Kristalografski podaci i utičnjavanje strukture kompleksa urea-alicin.

Empirijska formula	C H ₄ N ₂ O +alicin
Molekulska težina	60,06
Temperatura snimanja	173(2) K
Talasna dužina X-zračenja	0,71073 Å
Kristalni sistem, prostorna grupa	tetragonalni, P $\bar{4}2_1$ m
Parametri jedinične ćelije	a=5,6577(11)Å $\alpha=90^\circ$ b=5,6577(11) Å $\beta=90^\circ$ c=4,7042(8) Å $\gamma=90^\circ$
Zapremina el.ćelije kristala	150,58(5) Å ³
Z, Rendgenska gustina	2, 1,325 Mg/m ³
Koeficijent apsorpcije	0,114 mm ⁻¹
F(000)	64

Nastavak tabele 21

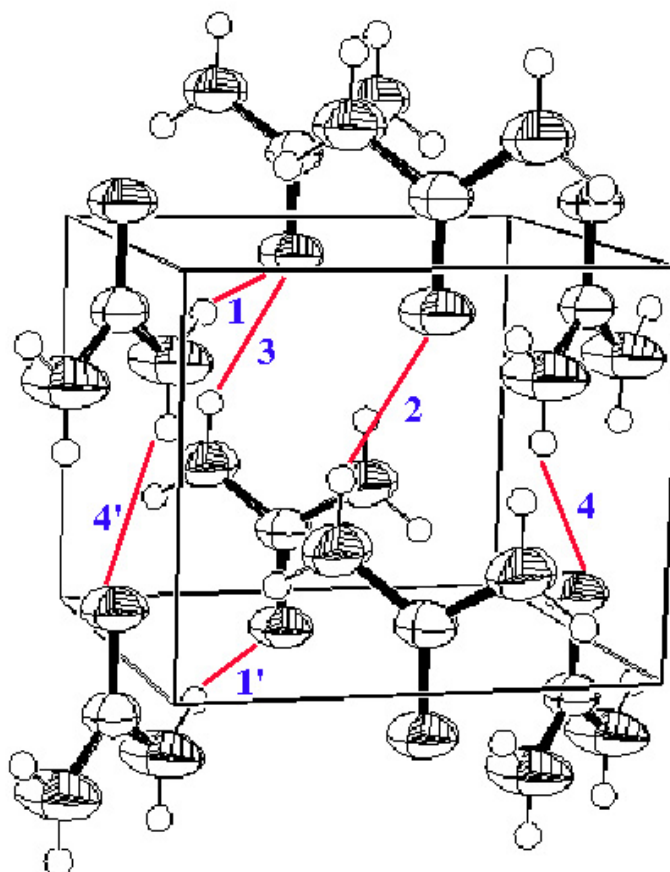
θ -opseg za skupljanje podataka	4,33 do 27,98°
Oblast Milerovih indeksa	-7 ≤ h ≤ 7, -7 ≤ k ≤ 7, -5 ≤ l ≤ 5
Refleksi-sakupljeni / jedinstveni	2623 / 205 [R(int) = 0,0432]
Metod utajavanja	Full-matrix least-squares on F ²
Podaci / ograničenja / parametri	205 / 0 / 22
Faktor dobrote za F ²	1,185
Konačni R faktor [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0339; wR2 = 0,0798
R faktor (svi podaci)	R1 = 0,0394; wR2 = 0,0837
Parametar za apsolutnu strukturu	-1(4)
Najveći pik i dolja u dif. Furijeu	0,120 and -0,111 e/Å ³

Rešena kristalna struktura kompleksa urea-alicin dobijena metodom monokristala, potvrdila je da se radi o kristalografskim podacima koji odgovaraju kristalnoj strukturi uree. Na osnovu rešenih položaja atoma nađeno je da je kristalno pakovanje molekula uree u jediničnoj ćeliji uree kao na slici 70.



Slika 70 Pakovanje molekula uree u jediničnoj ćeliji kristalne rešetke uree

Pakovanje molekula uree u jediničnoj ćeliji kristalne rešetke uree dirigovano je vodoničnim vezama koje se uspostavljaju između kiseonika iz CO-grupe i H (1) i H (2) protona NH₂-grupe u molekulima uree. Na slici 71 su prikazane moguće vodonične veze u jediničnoj ćeliji uree, kao i vrednosti dužina nađenih vodoničnih veza.



Slika 71 Jedinična ćelija kristalne rešetke uree sa nađenim vodoničnim vezama između molekula uree; — vodonična veza i dužine veza: 1 i 1' 2,182 Å; 2 2,256 Å; 3 2,256 Å; 4 i 4' 2,256 Å.

Nađene atomske koordinate i ekvivalentni izotropni parametri uree i kompleksa urea-alicin (4:1) ne pokazuju razlike u odnosu na ureu i dati su u tabeli 22.

Tabela 22 Atomske koordinate ($\times 10^4$) i ekvivalentni izotropni parametri ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) za rešeni kompleks urea-alicin

Atom	x	y	z	U(eq)
O	5000	0	9021(3)	53(1)
C	5000	0	11664(4)	42(1)
N	3588(2)	1412(2)	13162(4)	69(1)
H(1)	3620(20)	1380(20)	14840(70)	55(8)
H(2)	2650(40)	2350(40)	12110(50)	83(8)

Određene su dužine veza i uglova u urei i u rešetkastom inkluzionom kompleksu urea-alicin (4:1) (tabela 23) i upoređene sa istim vrednostima za čistu ureu koje su nađene u literaturi i utvrđeno je da se ove vrednosti ne menjaju značajno.

Tabela 23 Dužina veza (\AA) i uglova ($^\circ$) za ureu

Veza	Dužina veze (\AA)
O - C	1,244 (3)
C - N#1	1,331 (2)
C - N	1,331 (2)
N - H (1)	0,79 (3)
N - H (2)	0,90 (3)
Ugao	Vrednost ugla ($^\circ$)
O - C - N#1	121,95 (12)
O - C - N	121,95 (12)
N#1 - C - N	116,1 (2)
C - N - H (1)	120,0 (14)
C - N - H (2)	114,7 (16)
H (1) - N - H (2)	125 (2)

#1- ekvivalentni azotov atom sa koordinatama $-x+1, -y, z$

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u rešetkastom inkluzionom kompleksu urea-alicin nije došlo do bitnih izmena dužina veza i uglova, pa se može reći da je ugrađivanje molekula alicina u kristalnu rešetku domaćina moguće u ograničenom molaskom odnosu kao i to da je nestehiometrijsko i neuređeno i da ne menja kristalnu rešetku uree.

4.5. ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKE AKTIVNOSTI ALICINA, INKLuzionIH KOMPLEKSA I NJEGOVIH DERIVATA

Ispitana su fungicidna i baktericidna svojstva vodenih rastvora sintetičkog alicina, inkluzionih kompleksa i njegovih derivata u momentu sinteze i nakon određenih vremenskih intervala (8, 23, 40, 52 i 62 dana) posle sinteze, s obzirom da je poznato da je alicin nepostojan tj. nestabilno jedinjenje i da tokom stajanja dolazi do njegove degradacije i gubitka mikrobiološke aktivnosti. Rezultati mikrobiološke aktivnosti sveže sintetisanog alicina i sveže sintetisanih inkluzionih kompleksa: β -ciklodekstrin-alicin i urea-alicin prikazani su u tabeli 24.

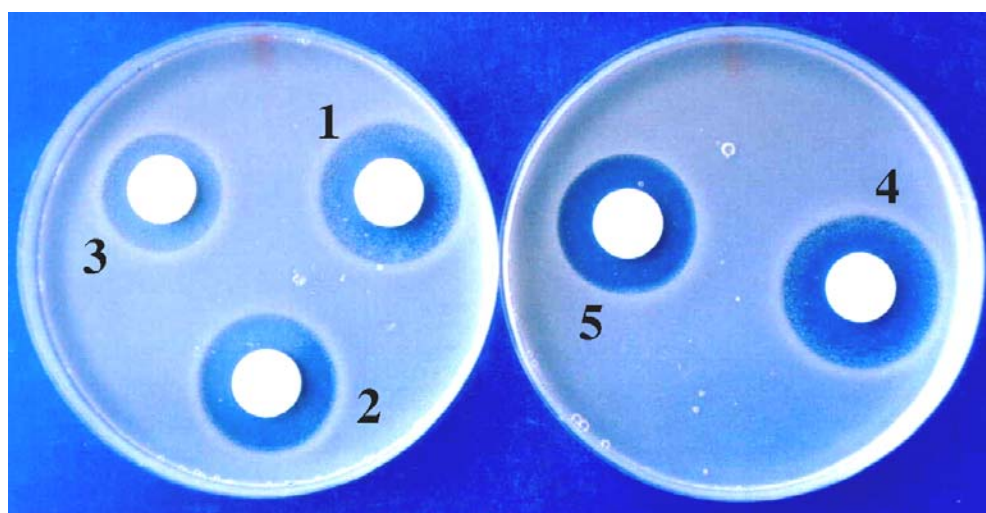
Tabela 24 Mikrobiološka aktivnost vodenih rastvora sintetičkog alicina i inkluzionih kompleksa alicina u momentu sinteze

Vrsta mikroorganizma	U Z O R A K				
	1	2	3	4	5
GLJIVE	z. inh.	z. inh.	z. inh.	z. inh.	z. inh.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	35,7	35,4	34,1	36,3	37,1
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	29,0	28,8	27,6	29,0	30,0
BAKTERIJE	z. inh.	z. inh.	z. inh.	z. inh.	z. inh.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	29,5	28,5	27,9	30,0	31,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	30,0	29,5	30,0	31,0	32,0
<i>Pseudomonas aeruginose</i> ATCC 9027	14,9	15	14,5	15	15,5

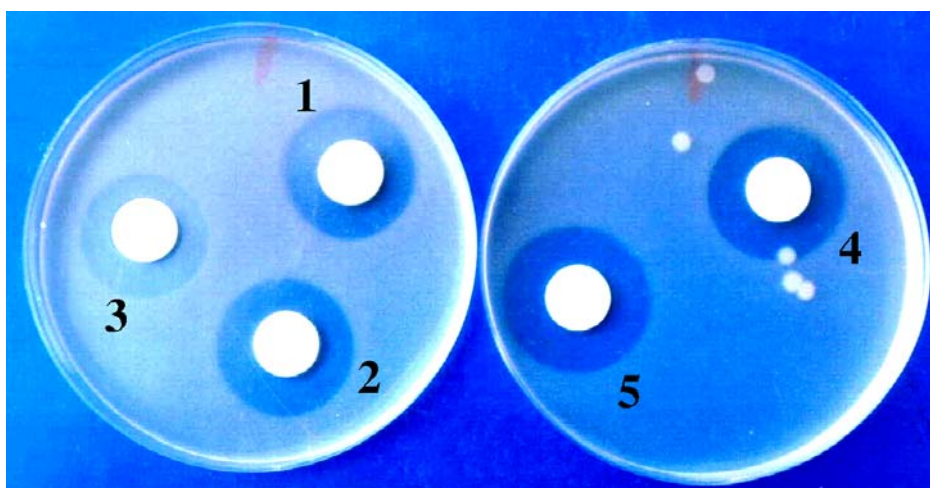
z. inh. - zona inhibicije izražena u mm;

1. Vodeni rastvor sveže sintetisanog alicina
2. Vodeni rastvor sveže sintetisanog molekuskog inkluzionog kompleksa β -ciklodekstrin-alicin sa dodatkom α -amilaze
3. Molekulski inkluzioni kompleks β -ciklodekstrin-alicin ekstrahovan etrom i nakon odstranjivanja etra rastvoren u vodi
4. Molekulski inkluzioni kompleks β -ciklodekstrin-alicin rastvoren u vodi
5. Kanalski inkluzioni kompleks urea-alicin

Vodeni rastvori sveže sintetisanog alicina i inkluzionih kompleksa alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom pokazuju dobru i vrlo sličnu mikrobiološku aktivnost na sve ispitivane mikroorganizme. Najmanje osetljiva bakterija je *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, dok je najosetljivija gljiva *Candida albicans* ATCC 10231, što je posebno značajno, jer su se postojeći komercijalni preparati za lečenje gljivičnih oboljenja izazvanih ovom gljivom, pokazali malo uspešnim. Inkluzioni molekulski kompleks β -ciklodekstrin-alicin ima manju rastvorljivost od β -ciklodekstrina, pa se smatralo da se alicin u vodenom rastvoru neće maksimalno osloboditi iz kompleksa (uzorak 5). Iz tog razloga urađena je jedna proba ovog kompleksa sa dodatkom enzima α -amilaze (uzorak 2) koji bi razgradnjom prstena β -ciklodekstrina omogućio potpuno oslobađanje alicina iz kompleksa i uzorka 3, koji je dobijen ekstrakcijom kompleksa etrom u kome je alicin dobro rastvoran. Rezultati pokazuju da najbolju mikrobiološku aktivnost ima uzorak 4, a najmanju uzorak 3. To je verovatno posledica gubitka alicina pri ekstrakciji kompleksa etrom i gubitaka alicina u toku otparavanja etra. Zbog toga je u daljem praćenju mikrobiološke aktivnosti u različitim vremenskim intervalima od momenta sinteze, kada je u pitanju kompleks β -ciklodekstrin-alicin, korišćen uzorak 5. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slikama 72 i 73.



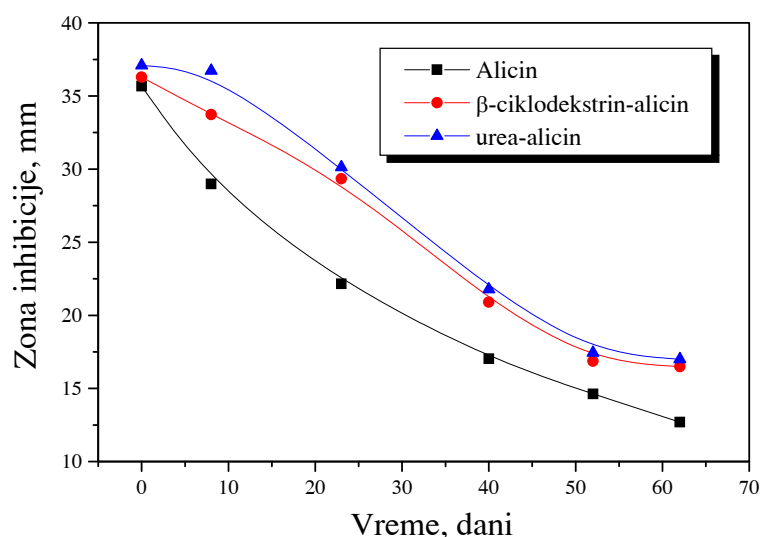
Slika 72 Dejstvo alicina u slobodnom i kompleksiranom stanju u momentu sinteze kompleksa na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; (1) slobodni alicin, (2) β -ciklodekstrin-alicin sa α -amilazom, (3) β -ciklodekstrin-alicin ekstrahovan etrom, (4) urea-alicin, (5) β -ciklodekstrin-alicin.



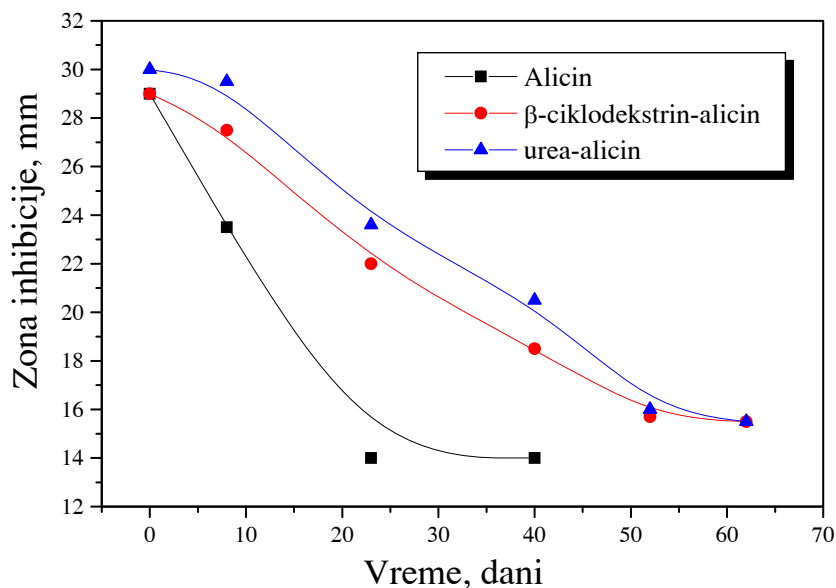
Slika 73 Dejstvo alicina u slobodnom i kompleksiranom stanju u momentu sinteze kompleksa na *Candidu albicans* ATCC 10231; (1) slobodni alicin, (2) β -ciklodekstrin-alicin sa α -amilazom, (3) β -ciklodekstrin-alicin ekstrahovan etrom, (4) urea-alicin, (5) β -ciklodekstrin-alicin.

U prilogu P3 su date slike ovih ispitivanja za ostale testirane mikroorganizme.

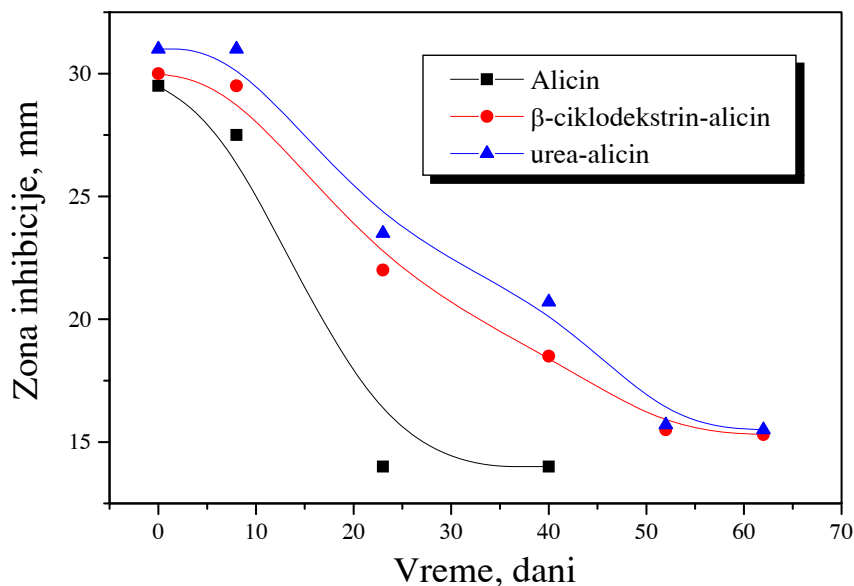
Rezultati koji pokazuju promenu mikrobiološke aktivnosti, odnosno promenu zone inhibicije sintetisanog alicina i inkluzionih kompleksa alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom u različitim vremenskim periodima od momenta sinteze kompleksa za svaki ispitivani mikrob prikazani su na slikama 74-78.



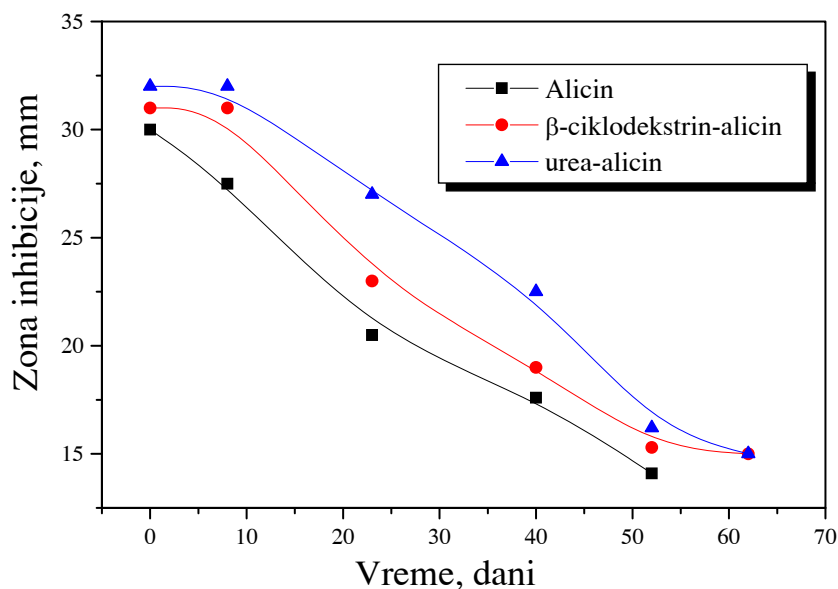
Slika 74 Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina i kompleksa sa β -ciklodekstrinom i ureom, u različitim vremenskim periodima posle sinteze kompleksa na *Candidu albicans* ATCC 10231



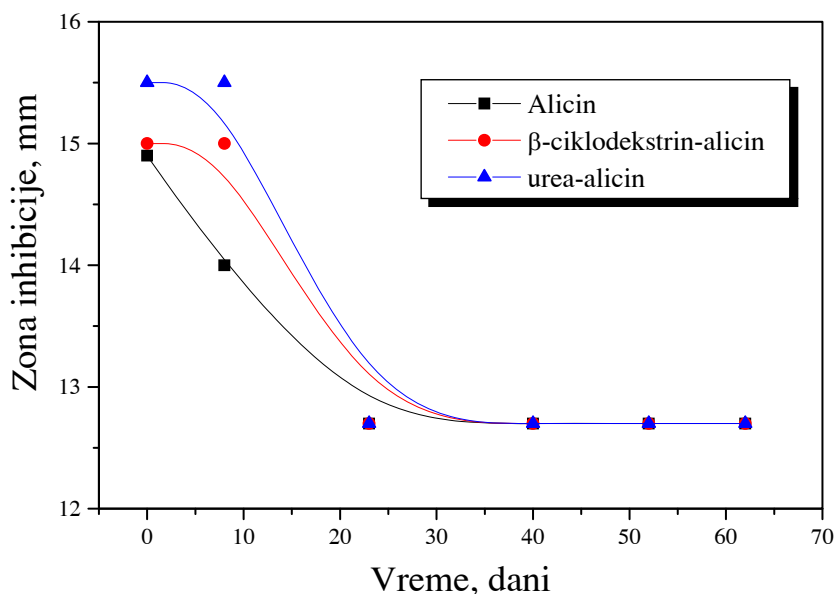
Slika 75 Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina i kompleksa sa β -ciklodekstrinom i ureom, u različitim vremenskim periodima posle sinteze na *Aspergillus niger* ATCC 16404



Slika 76 Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina i kompleksa sa β -ciklodekstrinom i ureom, u različitim vremenskim periodima posle sinteze na *Escherichia coli* ATCC 25922



Slika 77 Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina i kompleksa sa β -ciklodekstrinom i ureom, u različitim vremenskim periodima posle sinteze na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



Slika 78 Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina i kompleksa sa β -ciklodekstrinom i ureom, u različitim vremenskim periodima posle sinteze na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Iz prikazanih dijagrama (74-78) vidi se da inkluzioni kanalski kompleksi, β -ciklodekstrin-alicin i urea-alicin pokazuju veću mikrobiološku aktivnost na sve ispitivane mikrobe od čistog sintetisanog alicina. Što se tiče inkluzionih kanalskih kompleksa, kompleks urea-alicin ima nešto veće mikrobiološko

dejstvo na ispitivane mikroorganizme od kompleksa β -ciklodekstrin-alicin. Intenzitet mikrobiološkog dejstva opada sa vremenom kod obadva kompleksa ali znatno sporije nego kada je u pitanju čist alicin. Minimalno mikrobiološko dejstvo obadva kompleksa alicina zadržano je i posle 62 dana od momenta sinteze kompleksa. Kod slobodnog alicina intenzitet mikrobiološkog dejstva brže slabi i potpuno izčezava posle 52 dana od sinteze, a zone inhibicija rasta mikroorganizama su jedva merljive nakon 30 dana posle sinteze alicina. Slobodni alicin i inkluzioni kompleksi alicina najveću aktivnost pokazuju na *Candida albicans* ATCC 10231, zatim na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a nešto manju na *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Aspergillus niger* ATCC 16404. Najmanje osetljiv mikroorganizam na sve ispitivane uzorke je *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, kod koga se mikrobiološka aktivnost ovih preparata javlja samo kada su u sveže pripremljenom stanju. U prilogu P4 prikazane su i slike Petrijevih šolja koje demonstriraju rezultate mikrobiološke aktivnosti slobodnog i vezanog alicina u kompleksima sa β -ciklodekstrinom i ureom u različitim vremenskim periodima od momenta sinteze.

Mikrobiološkom ispitivanju podvrgnuti su i derivati alicina: ajoeni i vinilditiini u sveže sintetisanom stanju (tabela 25) i u različitim vremenskim periodima od momenta sinteze. S obzirom da se radi o jedinjenjima koja nisu rastvorna u vodi korišćeni su organski rastvarači i to za ajoene aceton, a za vinilditiine n-heksan pri čemu ovi rastvarači ne pokazuju mikrobiološku aktivnost na ispitivane mikroorganizme. Rezultati mikrobiološke aktivnosti sveže sintetisanih ajoena i vinilditiina dati su u tabeli 25, a u prilogu P5 date su slike Petrijevih šolja koje demonstriraju mikrobiološku aktivnost derivata alicina, ajoena i vinilditiina.

Tabela 25 Mikrobiološka aktivnost organskih rastvora sintetisanih ajoena i vinilditiina

Uzorci	V r s t a m i k r o o r g a n i z m a				
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	Zona inhibicije (mm)				
Ajoeni	51	50	51	33	42
Vinilditiini	50	49	42	25	27

Vidi se da su ajoeni jači antimikrobni agensi od vinilditiina. Najjače deluju na *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Aspergillus niger* ATCC 16404, dok je najmanja aktivnost izražena kod mikroba *Escherichia coli* ATCC 25922. Ovakav redosled mikrobiološke aktivnosti zadržan je i kod vinilditiina ali sa nešto slabijim intenzitetom. Prednost ajoena i vinilditiina, a posebno ajoena je što pokazuju izraženu mikrobiološku aktivnost na mikrob *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, što nije bio slučaj sa alicinom kako u slobodnom stanju tako i u kompleksima sa β -ciklodekstrinom i ureom.

Mikrobiološka aktivnost ajoena i vinilditiina takođe je praćena u određenim vremenskim periodima posle sinteze. Uočeno je da su početne zone inhibicije rasta mikroba očuvane i posle osam meseci stajanja uzoraka na sobnoj temperaturi. Ovo pokazuje da su ajoeni i vinilditiini stabilni organski molekuli, što je prednost u odnosu na čist alicin, koji već posle mesec dana prestaje da bude mikrobiološki aktivan.

Na osnovu rezultata mikrobiološkog ispitivanja za slobodni alicin, kompleks alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom i njegove derivate može se zaključiti sledeće:

- sintetički alicin pokazuje mikrobiološku aktivnost na sve ispitivane mikroorganizme sem na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina opada, minimalna aktivnost ili potpuno gubljenje aktivnosti je nakon 52 dana od sinteze, što pokazuje da je alicin nestabilan organski molekul;
- kompleksi alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom ne gube mikrobiološku aktivnost istom brzinom kao slobodni alicin;
- mikrobiološka aktivnost kompleksiranog alicina u oba kompleksa pokazuje tendenciju opadanja sa vremenom, ali je ona sporija u odnosu na slobodni alicin tj. minimalna mikrobiološka aktivnost zadržana je i posle 62 dana od momenta sinteze kompleksa;
- mikrobiološka aktivnost ajoena i vinilditiina ostaje ne promenjena i posle osam meseci stajanja uzoraka na sobnoj temperaturi, što pokazuje da su stabilni organski molekuli sa stabilnim mikrobiološkim dejstvom na ispitivane mikroorganizme;
- prednost derivata alicina u odnosu na slobodni i kompleksirani alicin je što ispoljavaju jako mikrobiološko dejstvo na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- za ispitivana jedinjenja i komplekse važi sledeći niz za intenzitet mikrobiološkog dejstva u sveže sintetisanom stanju: ajoen > urea-alicin > β -ciklodekstrin-alicin > vinilditiin > alicin.

ZAKLJUČAK

1. **P**rimenom metode HPLC praćene su reakcije sinteze alicina, ajoena i vinilditiina u zavisnosti od reakcionih uslova. Na osnovu dobijenih rezultata odrećeni su kinetićki parametri, red (n) i konstante brzina hemijskih reakcija (k). Reakcija sinteze alicina pokorava se kinetićkoj jednaćini nultog reda i ima oblik prave: $C_A = C_{A0} - k \cdot t$. Nagib prave je konstanta brzine hemijske reakcije i ima vrednost $k=0,00126 \text{ mol/dm}^3\text{min}$ na temperaturi od $13 \text{ }^\circ\text{C}$ i $k=0,0236 \text{ mol/dm}^3\text{min}$ na $26 \text{ }^\circ\text{C}$. U Arrhenius-ovom obliku konstanta brzine reakcije je:

$$k = 2,338 \cdot 10^3 \cdot \exp\left(-\frac{34320}{R \cdot T}\right), \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3 \text{min}}$$

2. Jednaćina za brzinu reakcije sinteze ajoena pokorava se eksponencijalnoj zavisnosti i data je sledećom jednaćinom: $(-r_A)[\text{mol/dm}^3\text{min}] = 0,008787 \cdot C_A^{0,405}$, vrednost za konstantu brzine reakcije je $k=0,008787(\text{mol/dm}^3)^{0,595}\text{min}^{-1}$, a red reakcije $n=0,405$. Kinetićki parametri za brzinu reakcije sinteze vinilditiina imaju sledeće vrednosti, $k=0,01678 (\text{mol/dm}^3)^{0,34}\text{min}^{-1}$ i $n=0,66$, a jednaćina kojoj se pokorava kinetika sinteze vinilditiina data je kao eksponencijalna zavisnost:

$$(-r_A)[\text{mol/dm}^3\text{min}] = 0,01678 \cdot C_A^{0,66}$$

3. Primenom ESR spin trap metode i spin trap jedinjenja 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksida, utvrćeno je prisustvo hidroksi radikala u reakcioni sistem za sintezu alicina na osnovu ćega je definisan radikalni mehanizam sinteze alicina.
4. Definisani su postupci sinteze alicina i njegovih derivata ajoena i vinilditiina. Alicin je dobijen oksidacijom alil-disulfida, vodonik

peroksidom, u kiseloj sredini, tzv. peracidom. Prečišćavanjem ekstrakcijom sa etrom dobija se alicin čistoće od 73%.

5. Transformacijom alicina u acetonu dobijaju se ajoeni. Mehanizam reakcije sinteze ajoena je složen i sastoji se iz više faza: tioalilizacija, eliminacija i kondenzacija alilsulfenske kiseline uz stvaranje jednog molekula *cis*- i jednog molekula *trans*-ajoena.
6. Vinilditiini (2-vinil-4H-1,3-ditiin i 3-vinil-4H-1,2-ditiin) se dobijaju transformacijom alicina u n-heksanu. U prvoj fazi stvaraju se međuproizvodi alilsulfenska kiselina i tioakrolein, a zatim se kondenzacijom dva molekula tioakroleina dobijaju vinilditiini.
7. Definisani su uslovi i razvijeni postupci tankoslojne i tečne hromatografije izdvajanja ajoena i vinilditiina iz sirovih reakcionih smeša. Određene su R_f -vrednosti za sve izomere ($R_{f(E-ajoena)} = 0,49$, $R_{f(Z-ajoena)} = 0,529$, $R_{f(1,3-vinilditiina)} = 0,190$, $R_{f(1,2-vinilditiina)} = 0,432$), i retenciona vremena, R_t , ($R_{t(E-ajoena)} = 36,68$ min, $R_{t(Z-ajoena)} = 35,38$ min, $R_{t(1,2-vinilditiina)} = 17,7$ min, $R_{t(1,3-vinilditiina)} = 25$ min, kada je mobilna faza acetonitril.
8. Definisani su uslovi i razvijene metode GH-MS kvantitativne i kvalitativne analize sirovih reakcionih smeša ajoena i vinilditiina. Gasnom hromatografijom izdvojeno je iz sirove reakcione smeše vinilditiina dvanaest komponenata, a identifikovano osam (66,67 %): metil-alil-sulfid, alil-sulfid, ajoeni, propil-alil-disulfid, 3-vinil-4H-1,2-ditiin, 2-vinil-4H-1,3-ditiin, dialil-trisulfid, dialil-disulfid. U sirovoj reakcionoj smeši ajoena registrovano je devetnaest komponenata, a identifikovano devet (47,9 %): metil-alil-sulfid, alil-sulfid, ajoeni, propil-alil-disulfid, 3-vinil-4H-1,2-ditiin, 2-vinil-4H-1,3-ditiin, alil-trisulfid, izobutil-izotiocijanat, alil-disulfid. Identifikacija razdvojenih komponenata gasnom hromatografijom izvršena je na osnovu masenih spekara svake razdvojene komponente.
9. Razvijeni su originalni postupci sinteze inkluzionih kanalskih kompleksa alicina sa β -cikodekstrinom i ureom. Primenom spektroskopskih metoda (UV, FT-IC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR i X-R) pokazano je da je došlo do ugrađivanja alicina u kanale β -cikodekstrina i uree. Takođe je pokazano da je alicin u vezanom stanju u inkluzionim kompleksima stabilniji nego u slobodnom obliku.

10. Primenom termogravimetrijske metode određena je termostabilnost slobodnog alicina i inkluzionih kompleksa alicina sa β -cikodekstrinom i ureom. Režim destrukcije slobodnog alicina se znatno razlikuje od molekulskih inkluzionih kompleksa, što ukazuje na povezanost jedinjenja gosta i domaćina odgovarajućim vezama u jednu celinu. Matematičkom obradom TG i DTG krivih i uz primenu metoda Freeman-Carroll-a i Vachuska-Voboril-a određeni su kinetički parametri (n , E_a i A) termičke destrukcije slobodnog i vezanog alicina.
11. Difrakcijom X-zraka analizirani su inkluzioni kompleksi alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom i došlo se do zaključka da je u obadva slučaja došlo do interakcije molekula gosta i domaćina po tipu međumolekulskih vodoničnih veza, da je ugrađivanje gosta nestehiometrijsko i neuređeno i da je uglavnom određeno kapacitetom kanala molekula domaćina.
12. Alicin, inkluzioni kompleksi alicina sa β -cikodekstrinom i ureom i njegovi derivati (ajoeni i vinilditiini) su mikrobiološki aktivna jedinjenja. Od ispitivanih mikroorganizama najosetljivija je *Candida albicans* ATCC 10231, a najmanje osetljiv *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Za sintetisana jedinjenja utvrđen je sledeći niz mikrobiološke aktivnosti:
ajoen > urea-alicin > β -ciklodekstrin-alicin > vinilditiin > alicin.
13. Kod ajoena i vinilditiina utvrđena je visoka stabilnost mikrobiološke aktivnosti u dužem vremenskom periodu (osam meseci na sobnoj temperaturi). Kod inkluzionih kompleksa alicina sa β -cikodekstrinom i ureom mikrobiološka aktivnost posle tri meseca pokazuje tendenciju opadanja. Alicin je najmanje stabilan i njegova mikrobiološka aktivnost zadržava se samo mesec dana od momenta sinteze.

L I T E R A T U R A

1. G. Blania, B. Spangenberg, *Planta Med.*, 57 (1991) 371.
2. A. Sendl, H. Wagner, *Planta Med.*, 57 (1991) 361.
3. J. Koch, L. Berger und C. V. Reiter, *Planta Med.*, 55 (1989) 327-331.
4. F. Freeman, Y. Koderu, *J. Agric. Food. Chem.*, 43 (1995) 2332-2338.
5. E. Calvey, J. Matusik, K. White, R. DeOrazio, D. Sha, E. Block, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 4406.
6. O. Sticher, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 131 (1991) 403-413.
7. J. Vučetić, M. Jaredić i M. Ćirović, *Hemijski pregled*, 3 (1986) 45.
8. M.A. Adetumbi, B.H. Lau, *Med. Hypothesis* 12 (1983) 227-264
9. H.P.Koch, *Phytother. Res.*, 7 (1993) 278-358.
10. B.G.Hughes, L.Lavson, *Phytother. Res.*, 5 (1991) 154-162.
11. J.Taucher, A. Hansel, A.Jordan, J. Lindinger, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 3778-3782.
12. W. Briggs, H. Xiao, K. Parkin, C. Shen, I. Goldman, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 5731-5735.
13. N.D. Weber, *Planta Med.* 58 (1992) 417-440.
14. B.O. Bever and G.R. Zahnd, *Quart J Crude Drug Res* 17 (1979) 139-235.
15. L. D. Lawson, S. G. Wood, B. G. Hughers, *Planta Med.* 57 (1991) 263-270.
16. E. Sprecher, *Z. Phytotherapie*, 11 (1991) 103-112.
17. E. Dorant, *Br J Cancer* 67 (1993) 424-433.
18. N. Gupta, T. Porter, *J. Nutr.*, 131 (2001) 1662-1667.
19. H. D. Reuter, Symposium, 23.-25.2.1989. in Lüneburg, *Z. Phytotherapie*, 10 (1989) 124.
20. L. D. Lawson, Z. J. Wang and B. G. Hughes, *Planta Med.*, 57 (1991) 363-370.

21. A. Stool, and E. Seebeck; *Hel. Chem. Acta*, 32 (1949) 197.
22. C. J. Cavallito and J. H. Bailey, *J. Amer. Chem. Soc.*, 66 (1944) 1950-1951.
23. C. J. Cavallito, J.S. Buck, C.M. Suter, *J. Amer. Chem. Soc.*, 66 (1944) 1952-1954.
24. E. Vedjes, T.H. Eberlein, D.L. Varie, *J. Amer. Chem. Soc.*, 104 (1982) 1445-1447.
25. B. Iberl, G. Winkler, K. Knobloch, *Planta Med.*, 56 (1990) 320-326.
26. H. Jansen, B. Müller, K. Knobloch, *Planta Med.*, 53 (1987) 559-562.
27. G. Cruz-Villalon, *Analytical Biochemistry*, 290 (2001) 376-378.
28. M. Messegue, *Healts Secrets of Plants and Herbs*, Collins, St Jame's Place, London, 1977.
29. I.F.Huddleson, *J. Am. Vet Med. Assoc.* 105 (1944) 394-401.
30. M.Amer, M.Taha, Z. Tosson, *Int. J. Dermatol* 19 (1980) 285-292.
31. G.S. Moore, R.D. Atkins, *Mycologia* 69 (1977) 341-349.
32. D. K. Sandhu, M.K. Warraich, S. Singh, *Mykosen* 23 (1980) 691-699.
33. G.Prasad, V.D. Sharma, *Br. Vet J.* 136 (1980)448-499.
34. R. Fromtling, G. Bulmer, *Mycologia* 70 (1978) 397-405.
35. K.Nagai, *Jpn. J. Infect Dis* 47 (1973) 321.
36. H.P. Koch, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 27 (1992) 1419-1426.
37. Kamanna and N. C. Chandrasakhara, *Fette Seifen und Anstrichmittel*, 4 (1986) 136-139.
38. T. H. Yu, C. M. Wu and Y. C. Liou, *J. Agric. Food. Chem.*, 37 (1989) 725-730.
39. G. Vernin, J. Metzger, D. Fraisse and C. Scharff, *Planta Med.*, 2 (1986) 96-101.
40. E. Block, S. Ahmad, J. L. Catalfamo, M.K. Jain, R. Apitz-Castro, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 7045-7055.
41. C. Egen-Schwind, R. Eckard, F. W. Jekat and H. Winterhoff, *Planta Med.*, 58 (1992) 8-12.
42. P. Beslin, *J. Heterocyclic Chem.* 20 (1983) 1753-1754.
43. M. Lj. Mihailović, *Osnovi teorijske organske hemije i stereochemije*, Građevinska knjiga, Beograd, 1990.
44. Lj. Tasić, *Ciklodekstrini u savremenoj farmaceutskoj tehnologiji*, Zadužbina Andrejević, Beograd, 1999.
45. M. M. Meier, M.T. B. Luiz, P.J. Farmer, B. Szpoganicz, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 40 (2001) 291-295.
46. A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre, A. Baszkin, *Journal of Collod and Interface Science*, 212 (1999) 275-279.

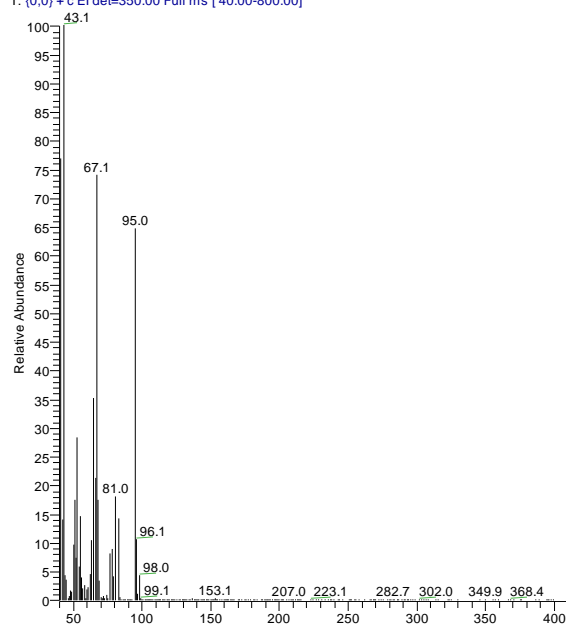
47. G. Torri, A. Naggi, G. B. Fregnan, A. Trebbi, *Pharmazi*, 45 (1990) 193-195.
48. P. Berthault, D. Duchesne, H. Desvaux, B. Gilquin, *Carbohydrate Research*, 276 (1995) 267-287.
49. G.R. Desiraju, T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond In Structural Chemistry and Biology*, IUC, Oxford science publications, 1998.
50. H.O.Ammar, S.A. El-Nahhas, M.M. Ghorab, *Pharmazi*, 51 (1996) 568-570.
51. S.T. Stankov, N. Lambov, E. Minkov, *Pharmazi*, 47 (1992) 125-128.
52. N. Celebi, M. Iscanoglu, T. Degim, *Pharmazi*, 46 (1991) 863-865.
53. K. Krážíová, J. Čížmárik, J. Szejtli, *Pharmazi*, 47 (1992) 460-461.
54. M. Berićević, R. Senjković, *Pharmazi*, 47 (1992) 202-204.
55. J. Mielcarek, *Pharmazi*, 51 (1996) 477-479.
56. A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre, A. Baszkin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 212 (1999) 280-285.
57. C. R. Noller, *Kemija organskih spojeva*, Tehnička knjiga, Zagreb, 1967.
58. V. Zavodnik, A. Stash, V. Tsirelson, R. de Vries, D. Feil, *Acta Crist.*, B55 (1999) 45-54.
59. By S. Swaminathan, B.M. Craven, R. K. McMullan, *Acta Crist.*, B40 (1984) 300-306.
60. By D. Mullen, E. Hellner, *Acta Crist.*, B34 (1978) 1624-1627.
61. By N. Sklar M. E. Senko, B. Post, *Acta Crist.*, 14 (1961) 716-720.
62. C. W. Bunn, *Hemijska kristalografija*, TMF Beograd, 1979.
63. By J.E. Worsham, H. A. Levy, S. W. Peterson, *Acta Crist.*, 10 (1957) 319-323.
64. K.A. Bell, G. L. Hoatson, R. L. Vold, *J. Magn. Reson.*, A108 (1994) 238-243.
65. K. D. M. Harris, *J. Solid State Chem.*, 106 (1993) 83-98.
66. S. C. Mayo, T. R. Welberry, M. Bown, A. Tarr, *J. Solid State Chem.*, 141 (1998) 437 - 451.
67. L. Yeo, Kenneth D. M. Harris, F. Guillaumes, *J. Solid State Chem.*, 128 (1997) 273 - 281 .
68. J. F. Carson, F. F. Wong, *Nature*, 183 (1959) 1673.
69. J.Č. Brunet, *Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti*, Zadužbina Andrejević, Beograd (1998).
70. V. D. Nikolić, *magistarski teza*, Leskovac, 1997.
71. D. K. Das, W. B. Essman, *Oxygen Radicals: Systematic Events and Diseases* (1991) Processes Karger.
72. B.J. Bolann, R.J. Ulvik, *Biochem. J.*, 55 (1987) 243-247.

73. M. Symons, *Chemical and Biochemical Aspects of ESR Spectroscopy*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, (1978).
74. B.H.J. Bielski, *Free Rad. Res. Comms.* 12-13 (1991) 469-472.
75. G. M. Rosen, M. J. Turner, *J. Med. Chem.*, 31 (1988) 428-431.
76. С. Оаэ, *Химия органических соединений серы*, Издательство "Химия", Москва (1975).
77. B. Halliwell, *Nutr. Reviews*, 52 (1994) 251-255.
78. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Biochem J.*, 1 (1984) 219-220.
79. B. Halliwell, *FEBS Lett.* 96 (1978) 238-241.
80. J.M.C. Gutteridge, L. Maitt, L. Poyer, *Biochem J.*, 169 (1990) 269-272.
81. S. E. Freeman, B. Carroll, *J. Phys. Chem.*, 62 (1958) 394.
82. J. Vachuska, M. Voboril, *Thermochim. Acta*, 2 (1971) 379.
83. M. E. Cortés, R.D. Sinisterra, M. J. Avilacampos, N. Tortamano, R. G. Rocha, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 40 (2001) 297.

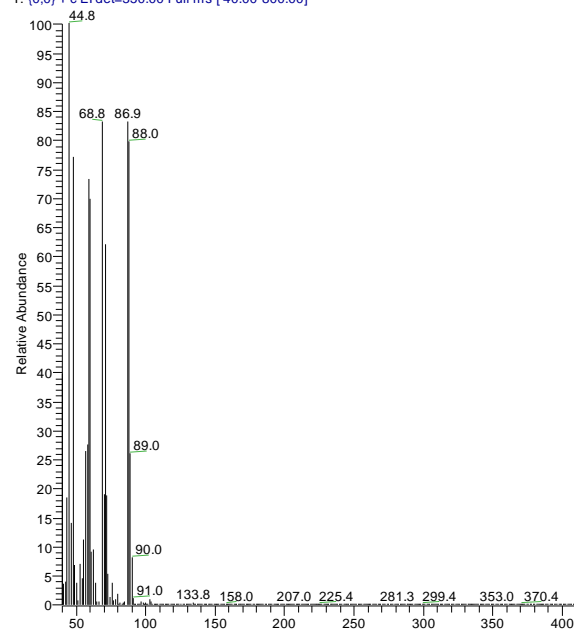
PRILOG

P1. U prilogu P1 prikazani su MS-spektri komponeneta razdvojenih gasnom hromatografijom iz sirove reakcione smeše pri sintezi ajoena sa retencionim vremenima na kojima se javljaju komponente u GH hromatogramu

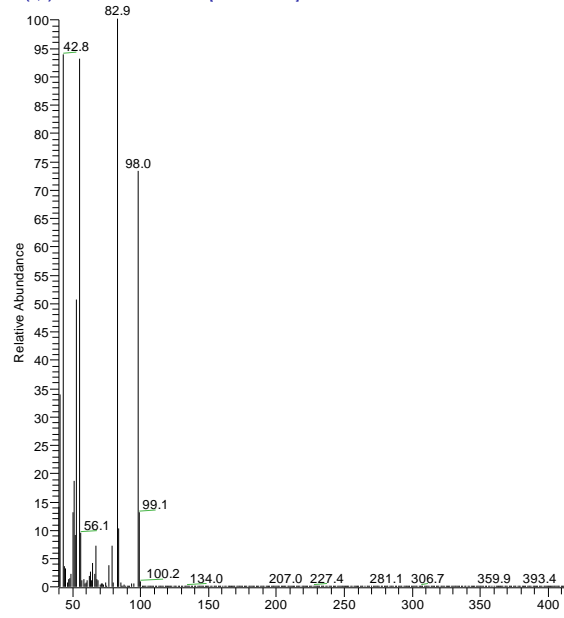
Sample 2-2 Acetone #13 RT: 2.15 AV: 1 NL: 1.21E6
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



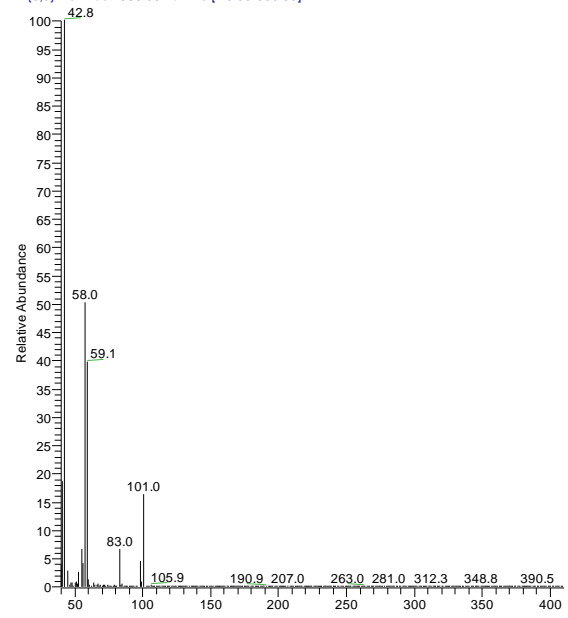
Sample 2-2 Acetone #32 RT: 2.37 AV: 1 NL: 5.19E6
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



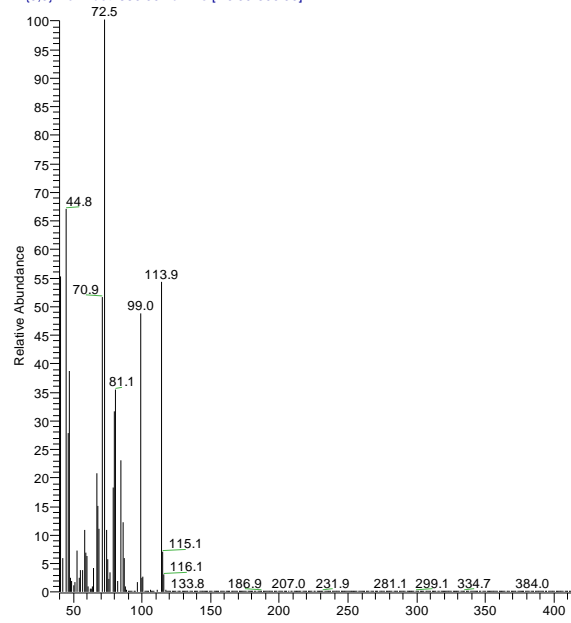
Sample 2-2 Acetone #56 RT: 2.64 AV: 1 NL: 5.83E6
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



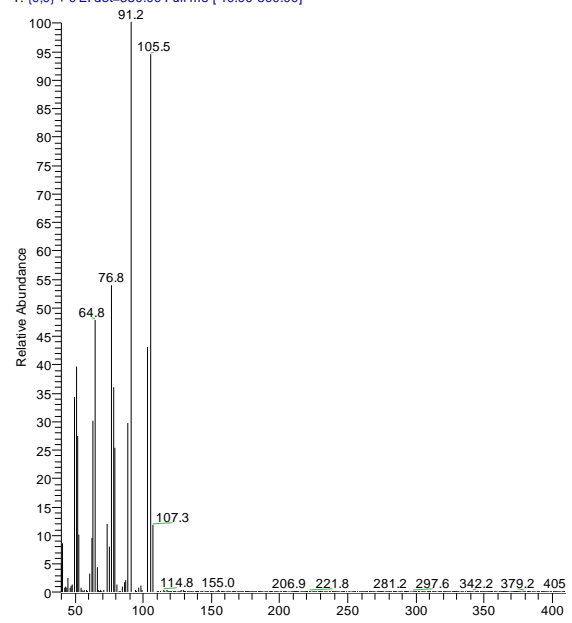
Sample 2-2 Acetone #110 RT: 3.26 AV: 1 NL: 8.17E6
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



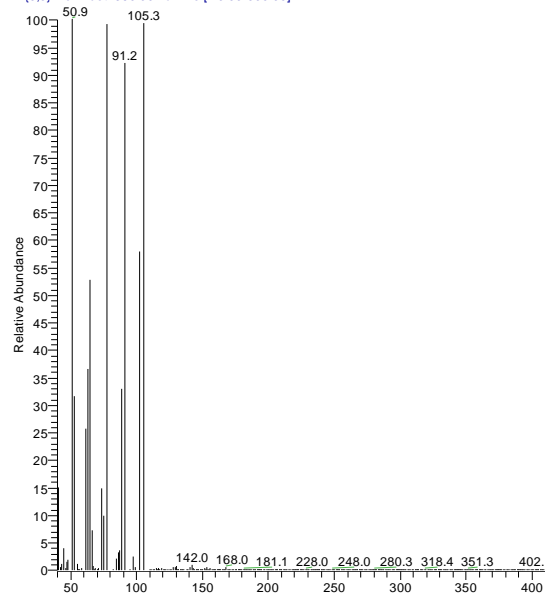
Sample 2-2 Acetone #138 RT: 3.58 AV: 1 NL: 8.66E6
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



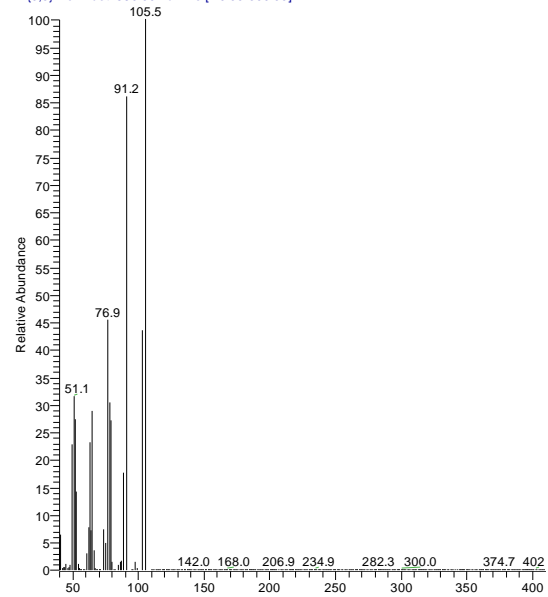
Sample 2-2 Acetone #144 RT: 3.66 AV: 1 NL: 1.11E7
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



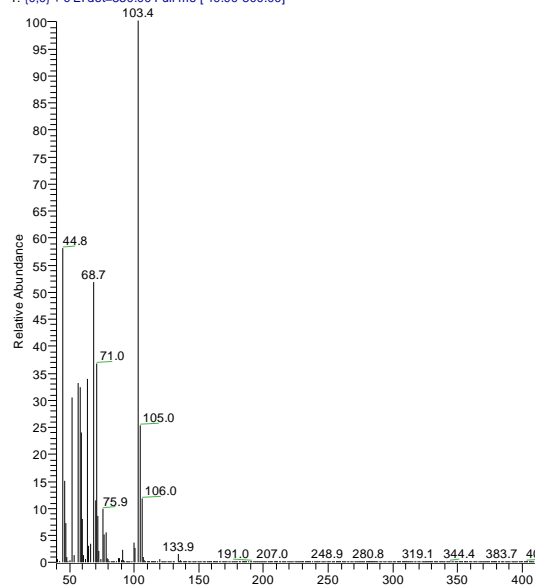
Sample 2-2 Acetone #159 RT: 3.83 AV: 1 NL: 1.32E7
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



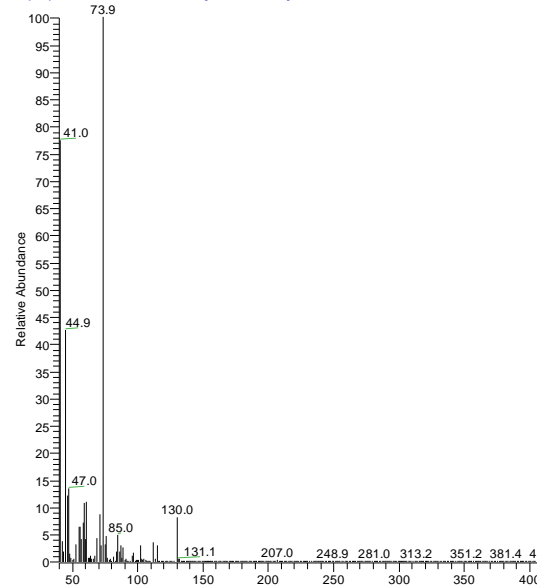
Sample 2-2 Acetone #201 RT: 4.32 AV: 1 NL: 1.22E7
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



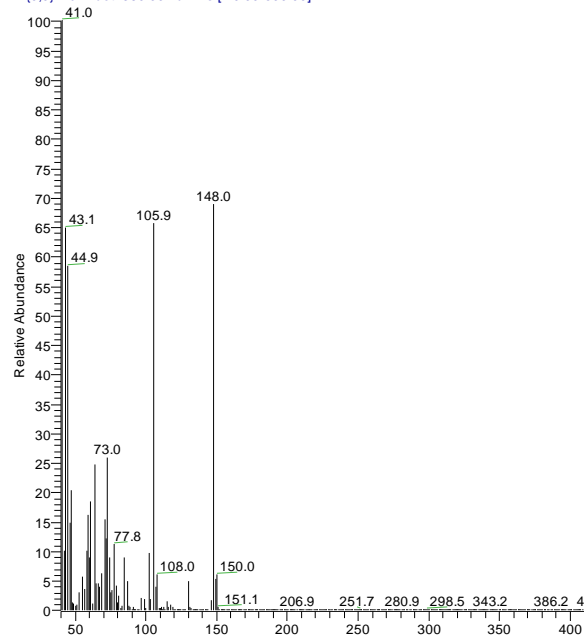
Sample 2-2 Acetone #344 RT: 5.97 AV: 1 NL: 9.79E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



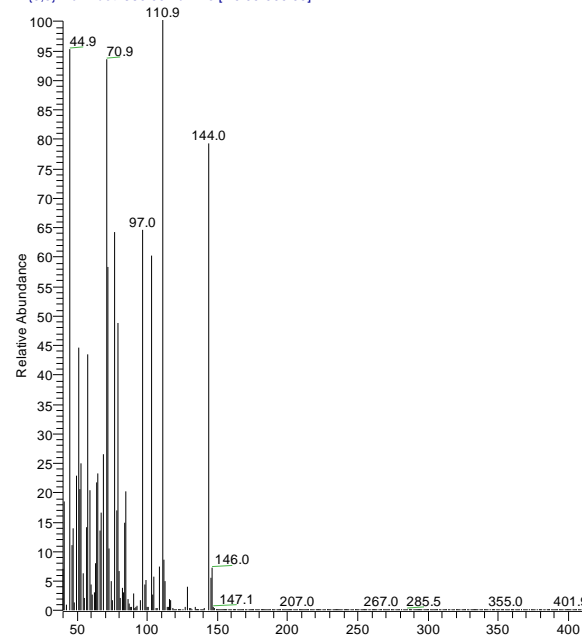
Sample 2-2 Acetone #738 RT: 10.51 AV: 1 NL: 1.73E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



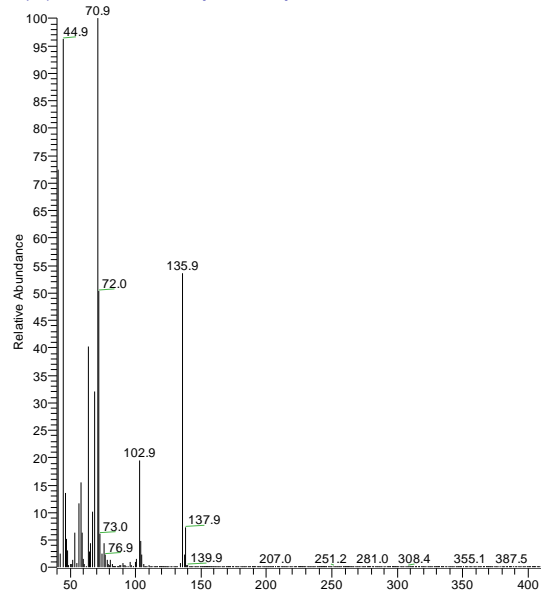
Sample 2-2 Acetone #850 RT: 11.81 AV: 1 NL: 4.92E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



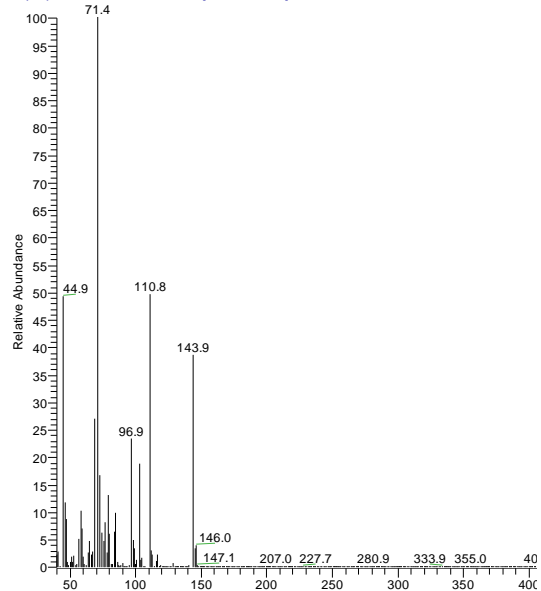
Sample 2-2 Acetone #1263 RT: 16.56 AV: 1 NL: 4.60E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



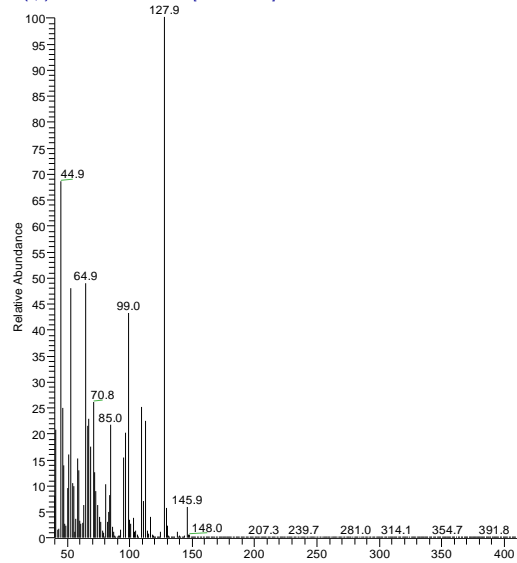
Sample 2-2 Acetone #1291 RT: 16.89 AV: 1 NL: 3.48E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



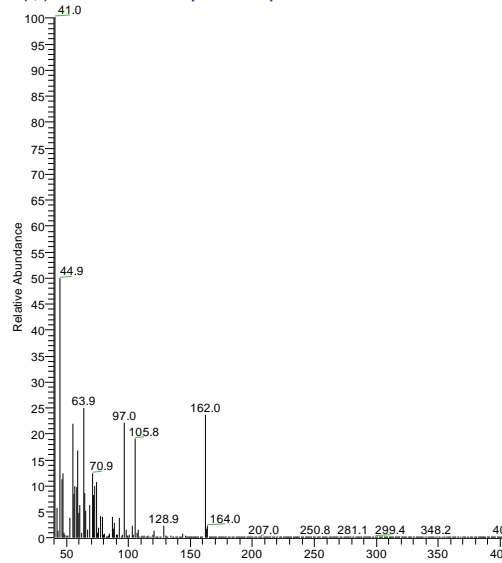
Sample 2-2 Acetone #1393 RT: 18.07 AV: 1 NL: 1.03E7
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



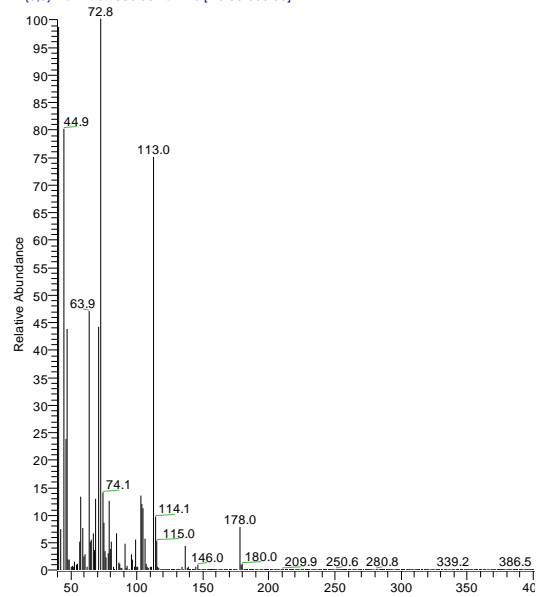
Sample 2-2 Acetone #1417 RT: 18.34 AV: 1 NL: 1.37E6
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



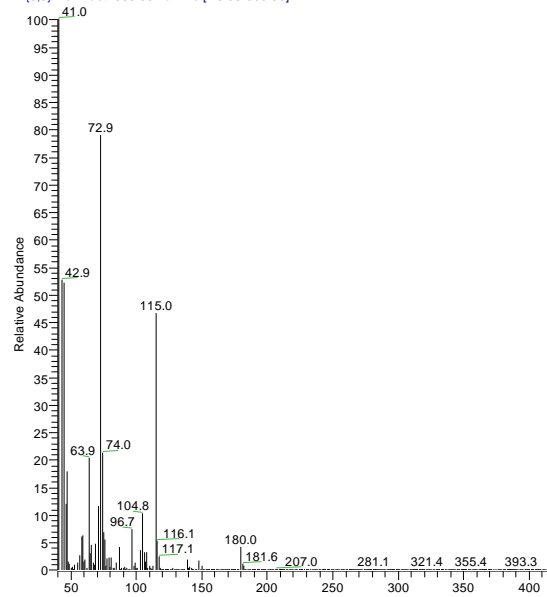
Sample 2-2 Acetone #1779 RT: 22.50 AV: 1 NL: 4.22E6
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



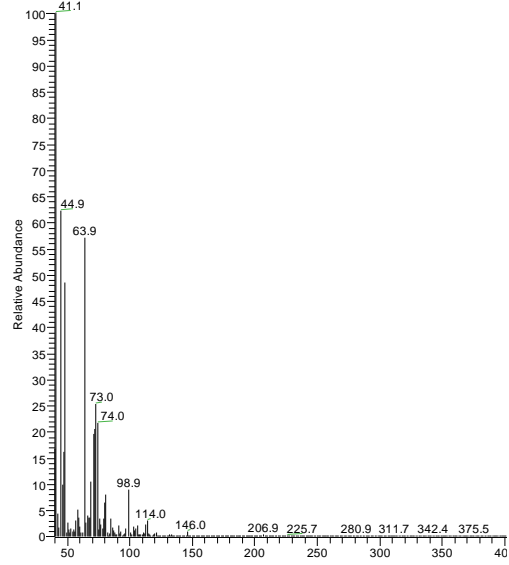
Sample 2-2 Acetone #1862 RT: 23.46 AV: 1 NL: 5.81E6
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



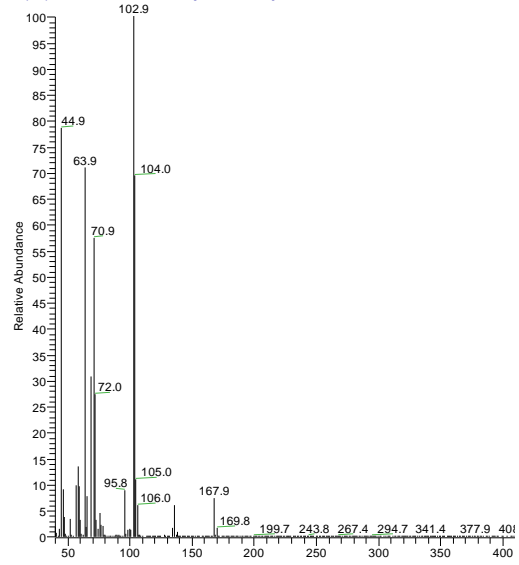
Sample 2-2 Acetone #1916 RT: 24.08 AV: 1 NL: 2.08E6
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



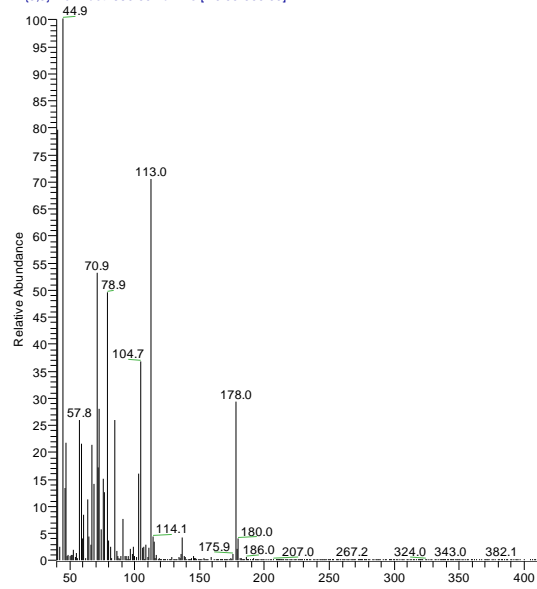
Sample 2-2 Acetone #2097 RT: 26.17 AV: 1 NL: 1.00E6
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



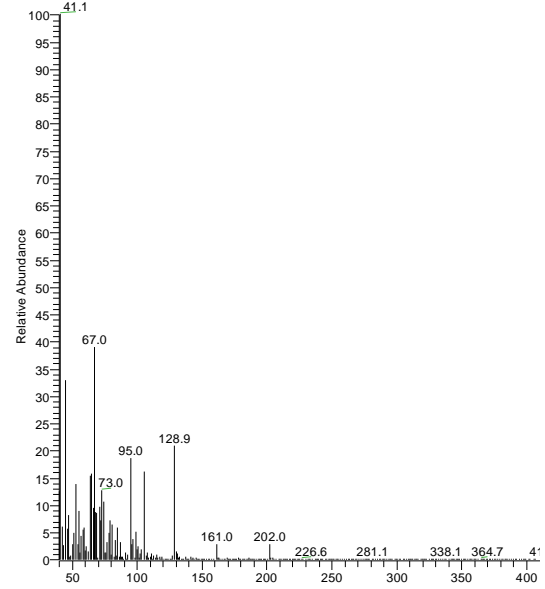
Sample 2-2 Acetone #2339 RT: 28.94 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 8.56E5
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



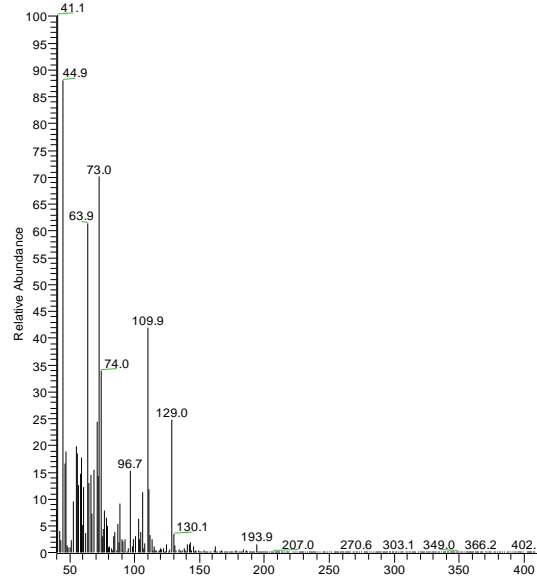
Sample 2-2 Acetone #2723 RT: 33.34 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 5.00E5
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



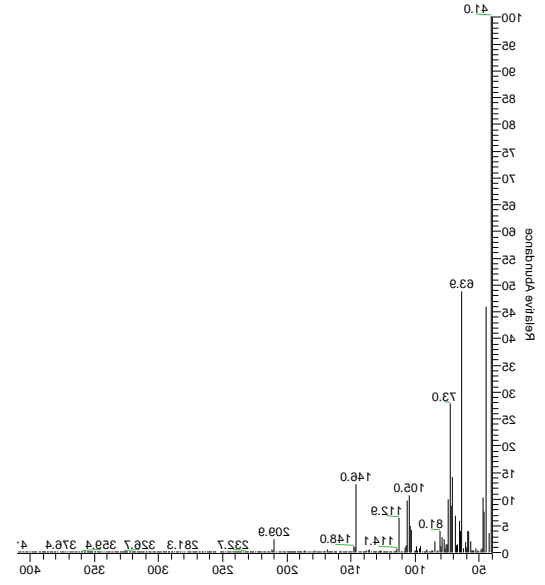
Sample 2-2 Acetone #2861 RT: 34.92 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 5.23E5
T: (0,0) + c El det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



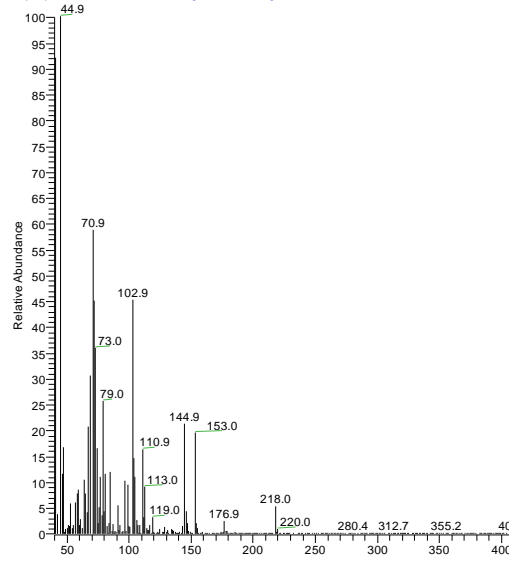
Sample 2-2 Acetone #2941 RT: 35.83 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 4.01E5
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



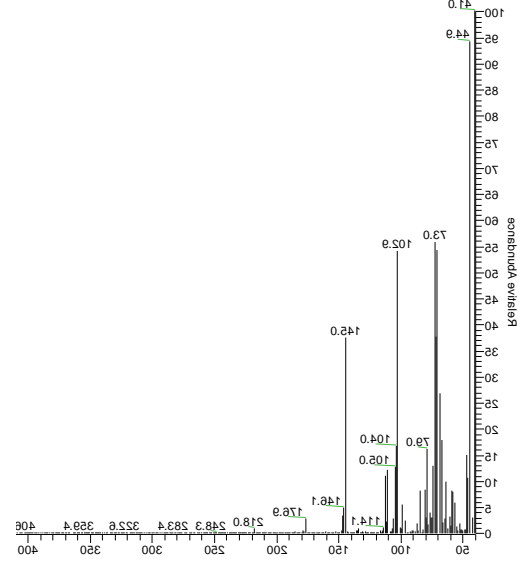
Sample 2-2 Acetone #3084 RT: 37.33 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 3.31E5
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



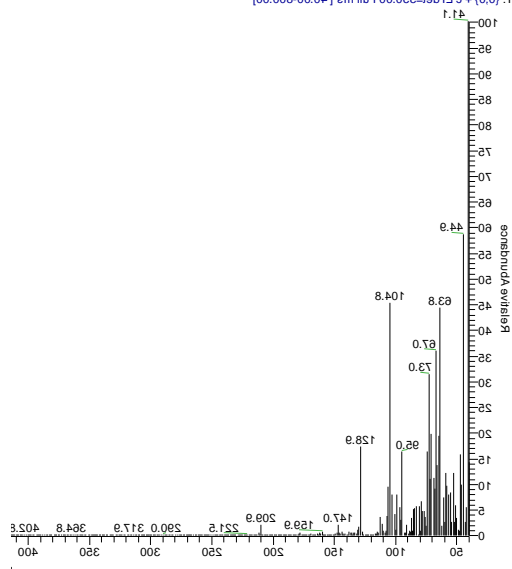
Sample 2-2 Acetone #3659 RT: 44.04 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 3.50E5
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



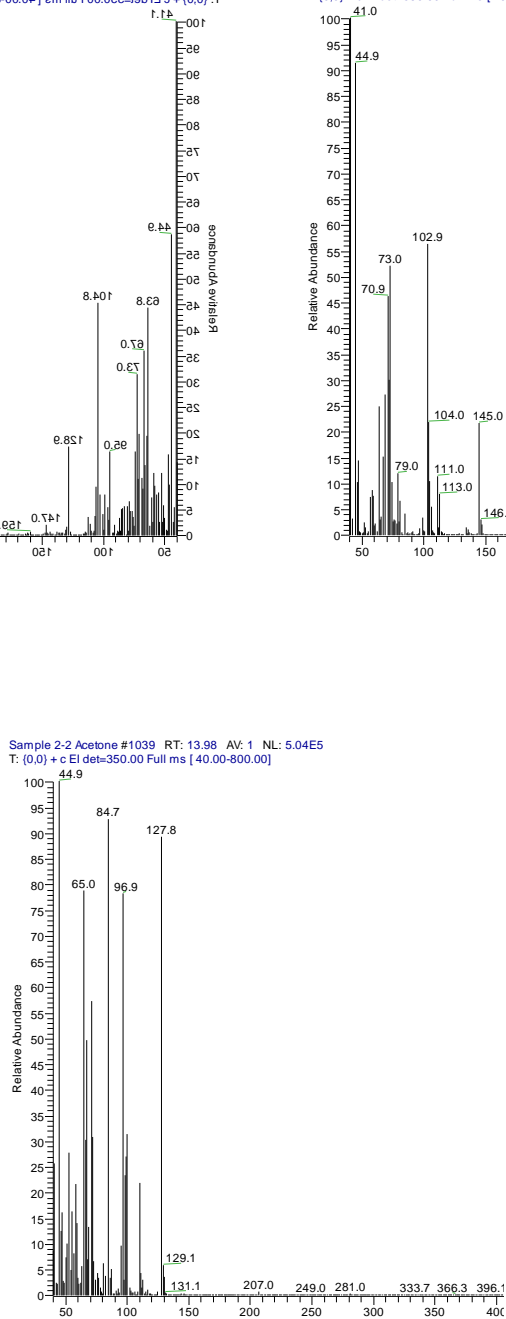
Sample 2-2 Acetone #3869 RT: 44.43 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 1.06E5
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



Sample 2-2 Acetone #4712 RT: 56.07 AV: 1 SB: 55 29.28-29.89 NL: 3.40E6
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]

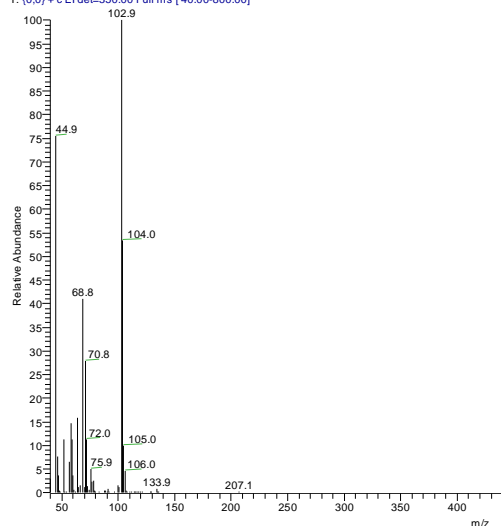


Sample 2-2 Acetone #1039 RT: 13.98 AV: 1 NL: 5.04E5
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]

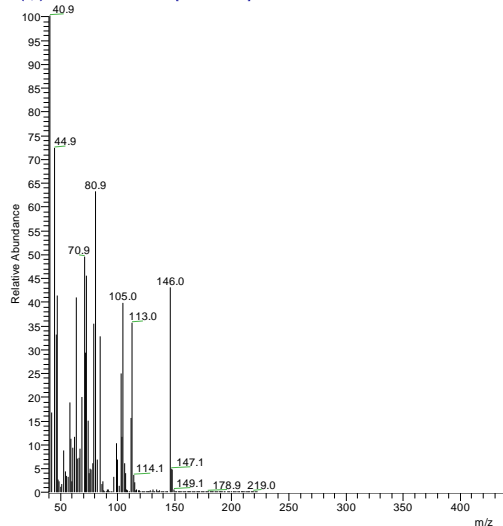


P2. U prilogu P2 prikazani su maseni spektri jedinjenja razdvojenih gasnom hromatografijom iz sirove reakcione smeše vinilditiina

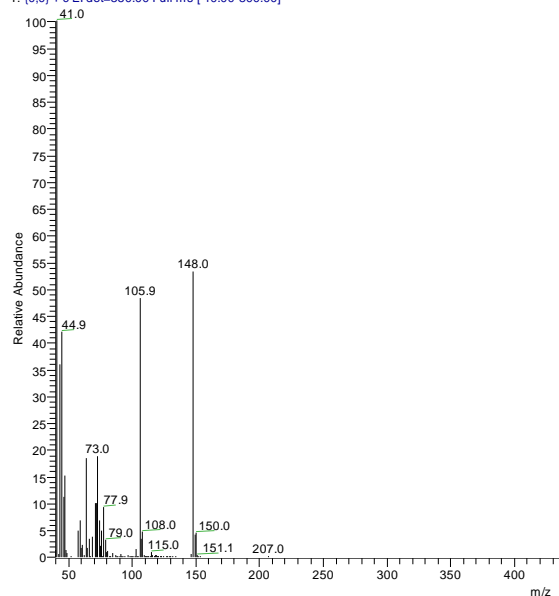
Sample 1-2 Hexane #337-345 RT: 5.84-5.93 AV: 9 SB: 18 2.08-2.27 NL: 1.88E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



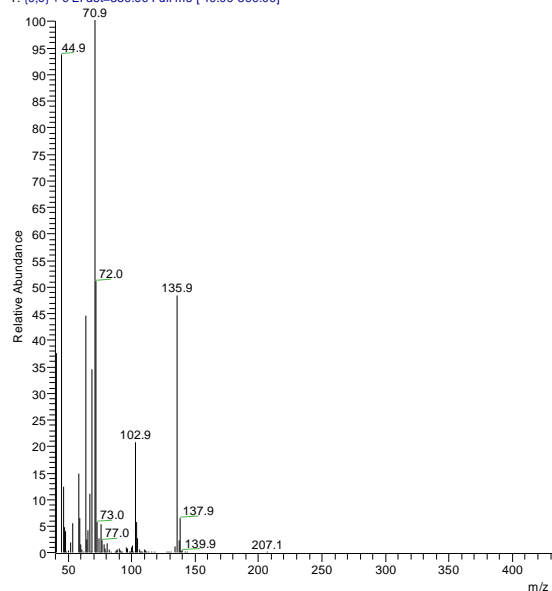
Sample 1-2 Hexane #776-821 RT: 10.83-11.35 AV: 46 SB: 18 2.08-2.27 NL: 6.49E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



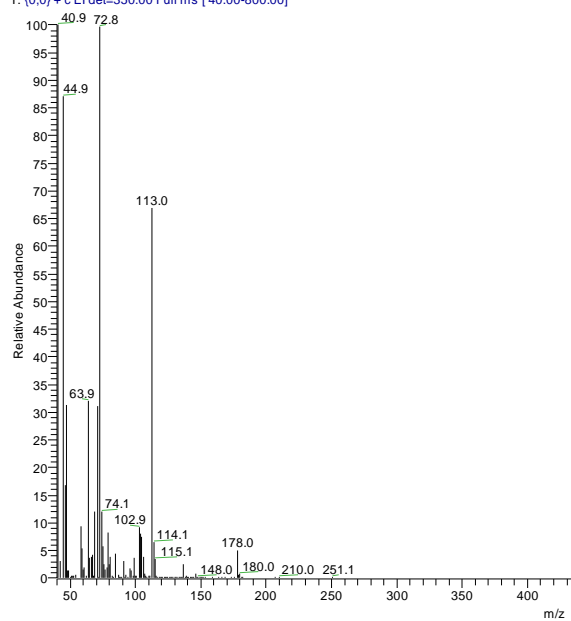
Sample 1-2 Hexane #844-861 RT: 11.61-11.80 AV: 18 SB: 18 2.08-2.27 NL: 1.08E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



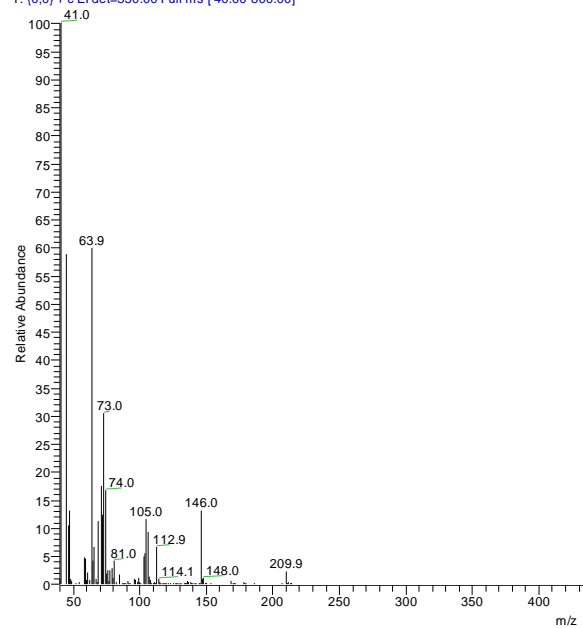
Sample 1-2 Hexane #1298-1311 RT: 16.78-16.93 AV: 14 SB: 18 2.08-2.27 NL: 1.04E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



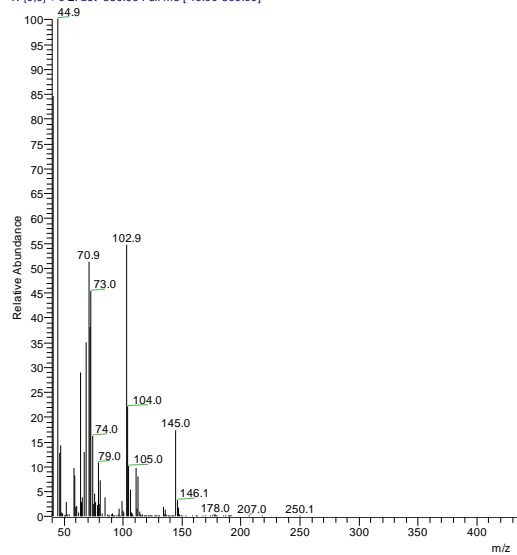
Sample 1-2 Hexane #1856-1884 RT: 23.13-23.45 AV: 29 SB: 18 2.08-2.27 NL: 3.39E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



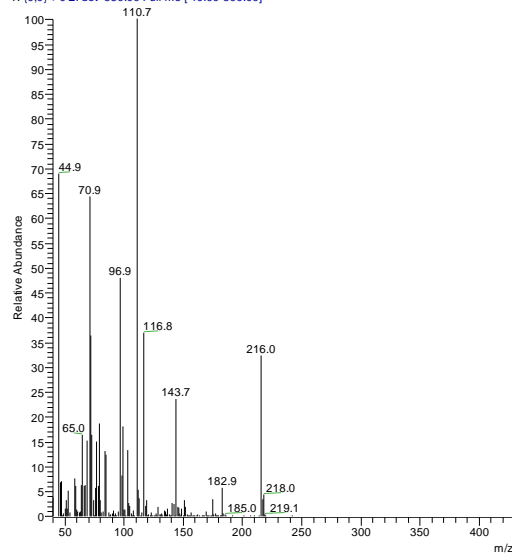
Sample 1-2 Hexane #3088-3103 RT: 37.16-37.33 AV: 16 SB: 18 2.08-2.27 NL: 1.53E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



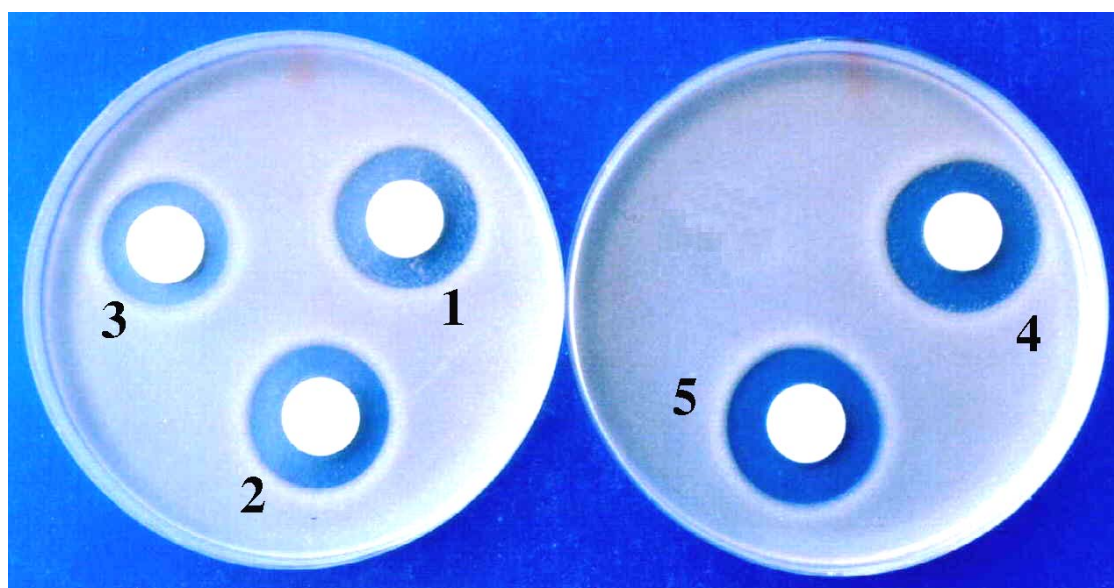
Sample 1-2 Hexane #4737-4756 RT: 55.93-56.15 AV: 20 SB: 18 2.08-2.27 NL: 1.52E6
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



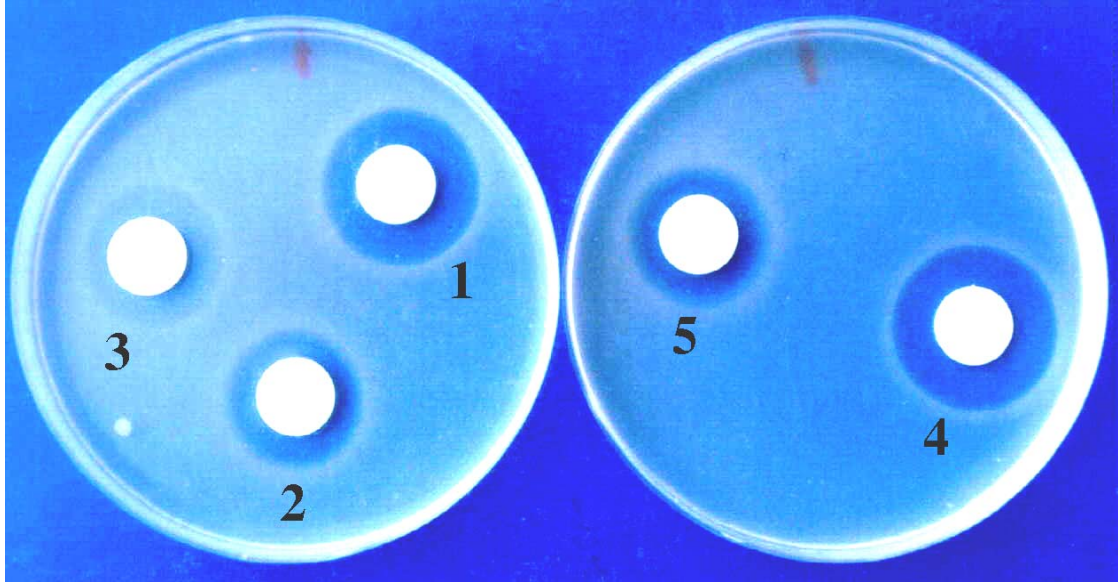
Sample 1-2 Hexane #4899-4926 RT: 57.77-58.08 AV: 28 SB: 18 2.08-2.27 NL: 9.28E5
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [40.00-800.00]



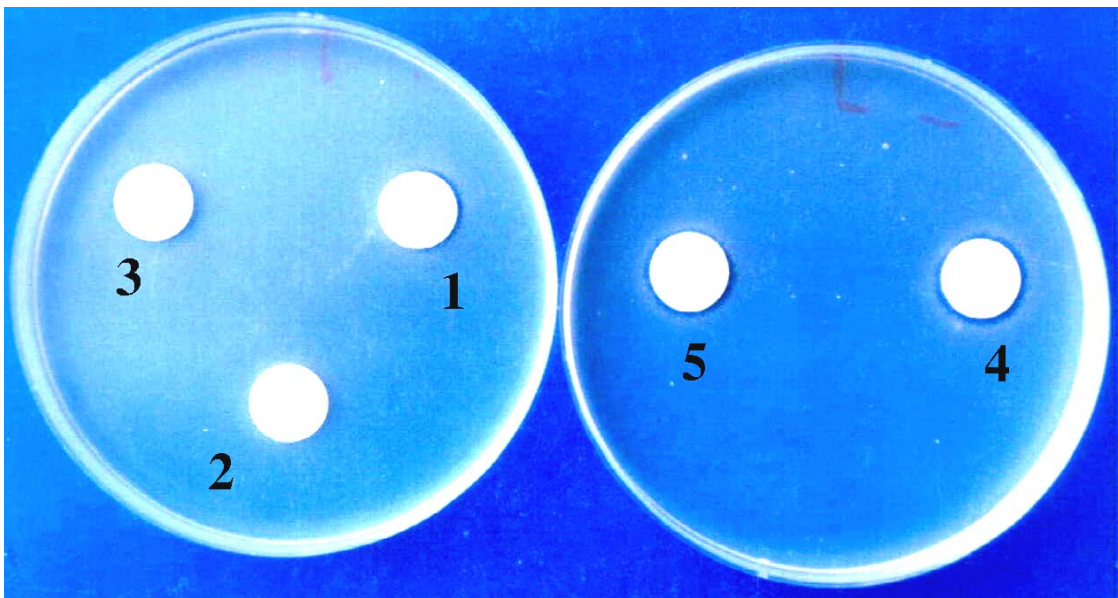
P3. Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina (1), kompleksa β -ciklodekstrin-alicin sa dodatkom α -alilaze (2), kompleksa β -ciklodekstrin-alicin ekstrahovan etrom (3), kompleksa urea-alicin (4), kompleksa β -ciklodekstrin-alicin (5) u momentu sinteze na a) *Aspergillus niger* ATCC 16404; b) *Escherichia coli* ATCC 25922 i c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



a) *Aspergillus niger* ATCC 16404



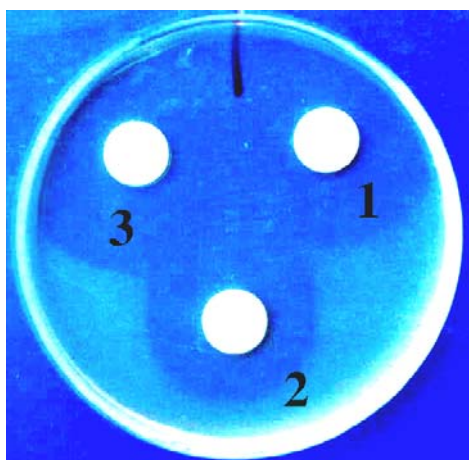
b) *Escherichia coli* ATCC 25922



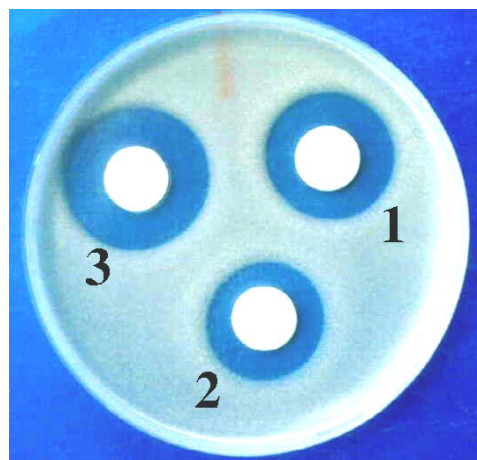
c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

P4. Mikrobiološka aktivnost slobodnog alicina (1), kompleksa β -ciklodekstrin-alicin (2) i kompleksa urea-alicin (3) za različite vremenske periode od momenta sinteze na ispitivane mikroorganizme

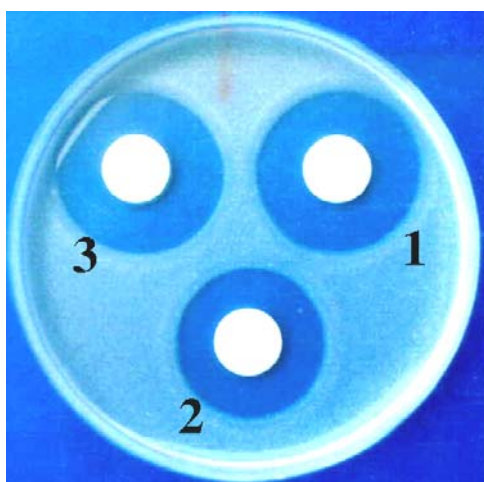
a) 23 dana nakon sinteze



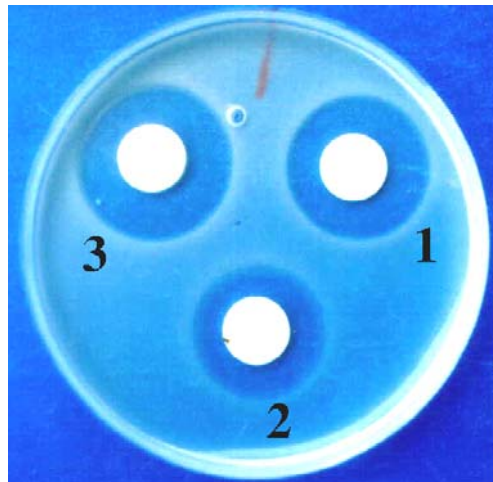
Candida albicans ATCC 10231



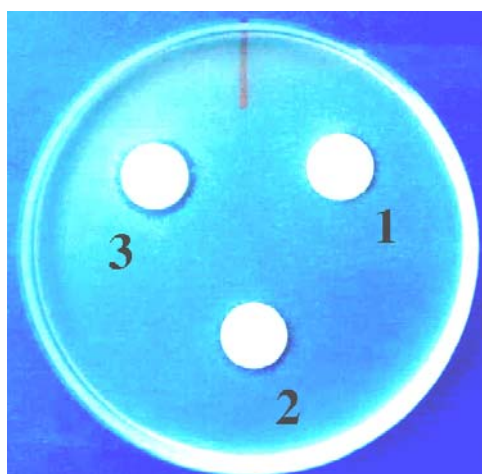
Aspergillus niger ATCC 16404



Staphylococcus aureus ATCC 6538

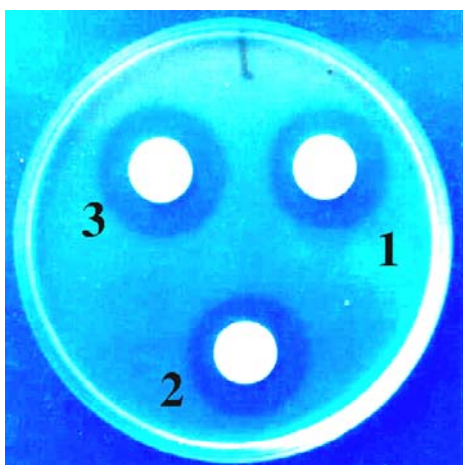


Escherichia coli ATCC 25922

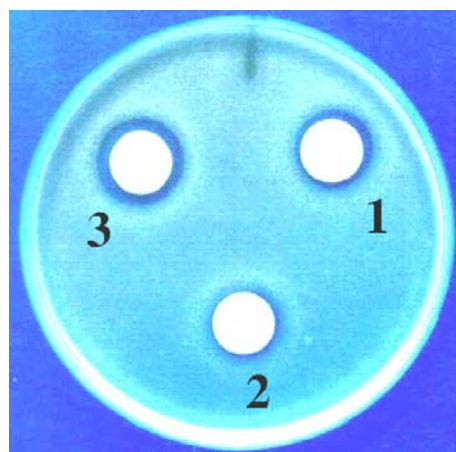


Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

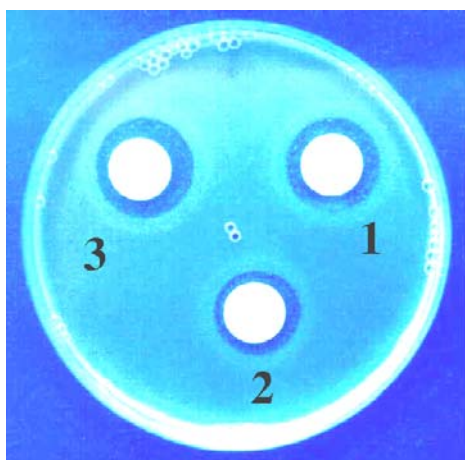
b) 40 dana od početka sinteze



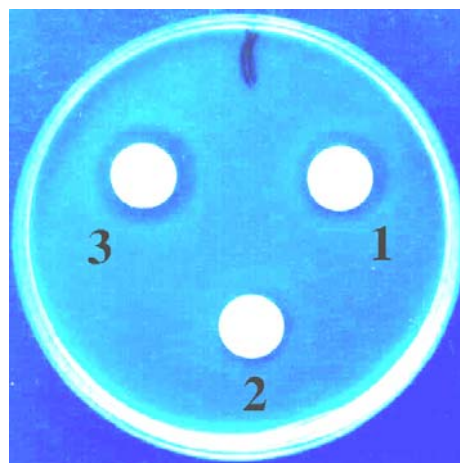
Candida albicans ATCC 10231



Aspergillus niger ATCC 16404

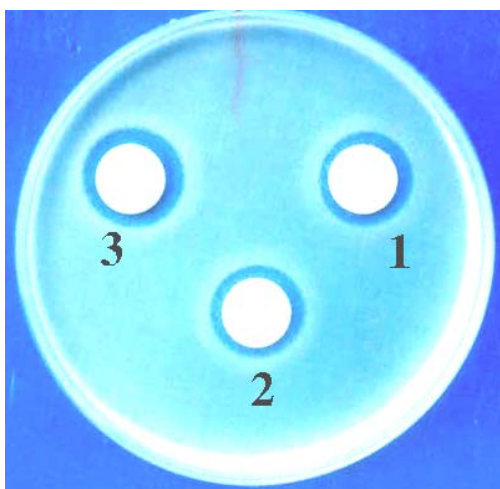


Staphylococcus aureus ATCC 6538

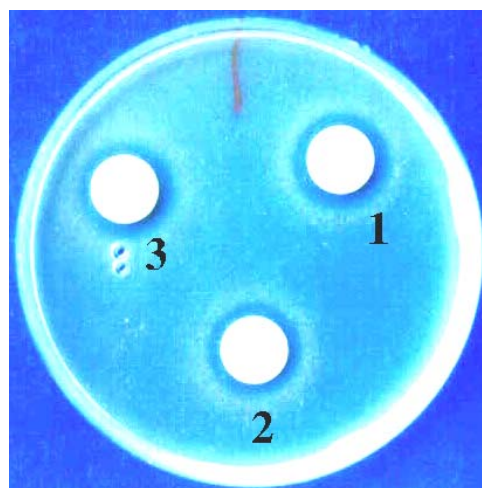


Escherichia coli ATCC 25922

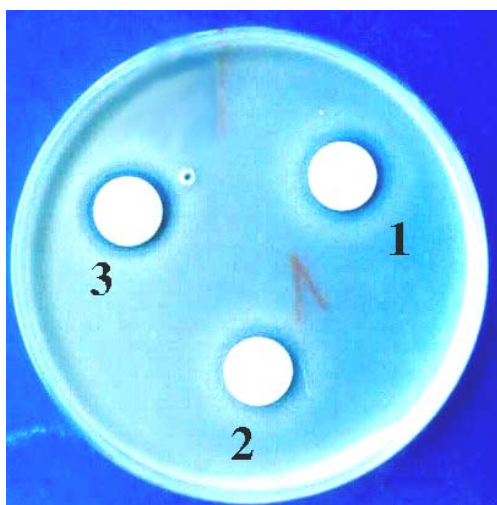
c) 52 dana od početka sinteze



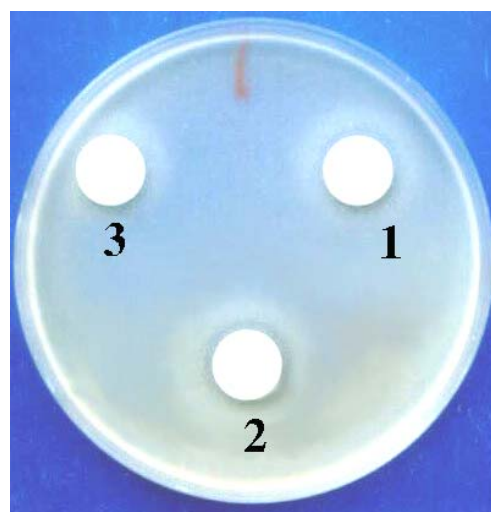
Candida albicans ATCC 10321



Aspergillus niger ATCC 16404

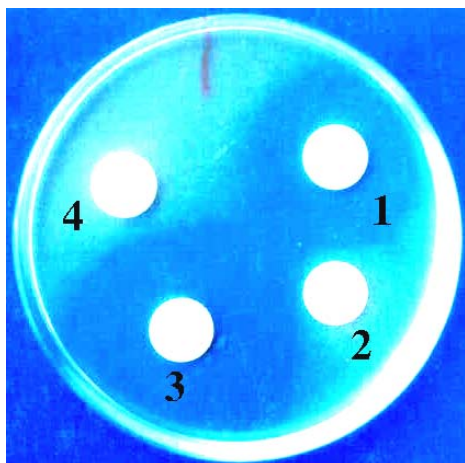


Staphylococcus aureus ATCC 6538

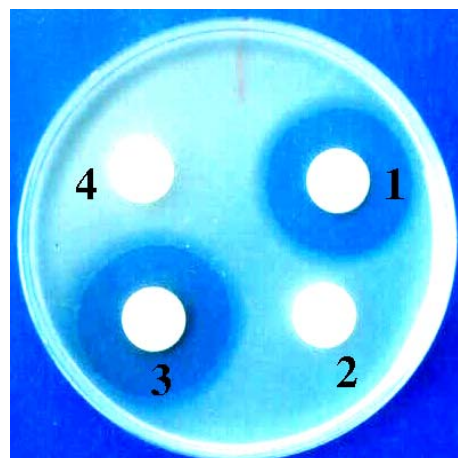


Escherichia coli ATCC 25922

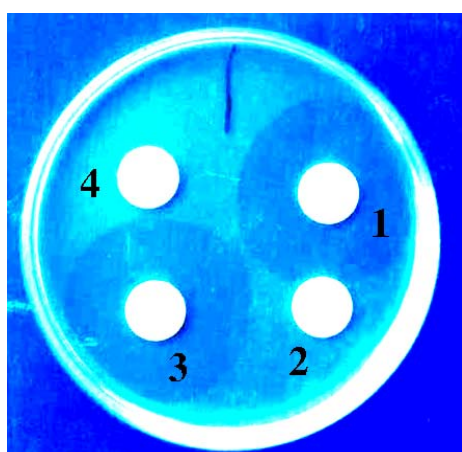
P5. Mikrobiološka aktivnost vinilditiina (1), n-heksana (2), ajoena (3) i acetona (4) na ispitivane mikroorganizme



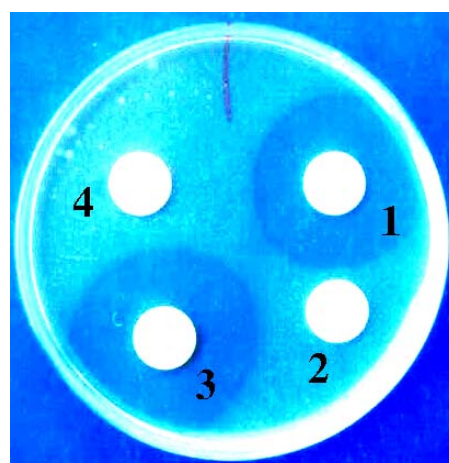
Candida albicans ATCC10231



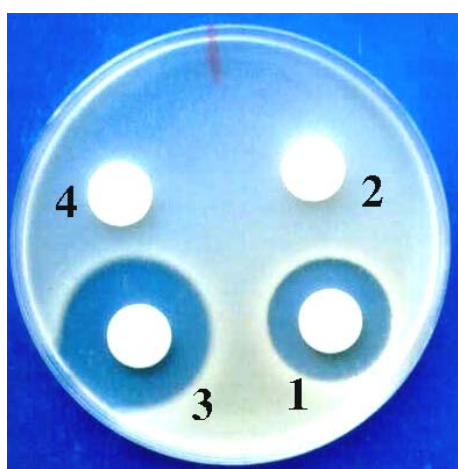
Aspergillus niger ATCC 16404



Staphylococcus aureus ATCC6538



Escherichia coli ATCC25922



Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

PUBLIKOVANI NAUČNI RADOVI IZ OBLASTI DOKTORSKE DISERTACIJE

R₃₂: Monografija nacionalnog značaja

Mihajlo Stanković, Vesna Nikolić, "Beli luk (*Allium sativum* L.): Bioaktivni sastojci i izolati", Tehnološki fakultet, Leskovac, u štampi

R₅₂: Rad u časopisu međunarodnog značaja

1. V. Nikolić, M. Stanković, Lj. Nikolić, D. Cvetković, Mechanism and kinetics of synthesis of allicin as a pharmacologically active compound, **Die Pharmazie**, in press (Reference-No P-2631)
2. Vesna D. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Dragan M. Cvetković, Ljubiša B. Nikolić, Dejan U. Skala; Kinetics of yield and GC analysis of essential and thermal oil from garlic (*Allium sativum* L.), scientific paper, **Chem. Ind.** 51 (12) (1997) 521 - 524.
3. Dejan Skala, Radmila Kužić, Irena Živković, Vesna Nikolić, Dušan Jovanović, Etheric oil from garlic (*Allium sativum* L.) obtained by CO₂-SFE: comparison with steam distillation, scientific paper, **Chem. Ind.** 54 (12) (2000) 539 - 545.
4. Vesna D. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Ljubiša B. Nikolić, Dejan U. Skala, HPLC analysis of thiosulphinates in aqueous extracts from garlic (*Allium sativum* L.), **Chem. Ind.** 55 (3) (2001) 120 - 124.

R₅₂: Rad u časopisu nacionalnog značaja

1. M. Stanković, V. Nikolić i Lj. Nikolić; Bioaktivni ekstrakti iz lukovica crnog (*Allium cepa* L.) i belog (*Allium sativum* L.) luka, **Hem. ind.** 51 (4) (1997) 153 - 157.
2. Vesna D. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Dragan M. Cvetković, Ljubiša B. Nikolić, Dejan U. Skala; Razdvajanje i identifikacija aminokiselina i tiosulfinata u ekstraktima belog luka (*Allium sativum* L.), naučni rad, **Hem. ind.** 52 (4) (1998) 156 - 160.
3. V. Nikolić, M. Stanković, Spektrofotometrijsko određivanje sumpora u belom (*Allium sativum* L.) i crnom (*Allium cepa* L.) luku (Originalni naučni rad) **Glasnik hemičara i tehnologa Republike Srpske**, 37 (1995) 25 - 29.

R₅₃ : Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u celini u stručnom časopisu

1. Vesna D. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Dragan M. Cvetković, Ljubiša B. Nikolić, GH analiza etarskog ulja belog luka (*Allium sativum* L.), *Lekovite sirovine* 17 (1998) 81 - 84
2. Vesna D. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Dragan M. Cvetković, Ljubiša B. Nilokić, Kinetika dobijanja etarskog ulja belog luka (*Allium sativum* L.), *Lekovite sirovine* 17 (1998) 85 - 87
3. Nikolić V. , Stanković M., Todorović S., Nikolić Lj., Izolacija lipida iz lukovice crnog luka (*Allium cepa* L.), *Lekovite sirovine* 18 (1998) 129 - 134

R₈₁: Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu

1. Nikolić Vesna, Mihajlo Stanković, Dragan Cvetković, Ljubiša Nikolić, Kinetics of yield essential and thermal oil from garlic (*Allium sativum* L.). First Balkan Botanical Congress, Aristotle University of Thessaloniki, from 19th to 22nd September 1997. Book of abstract 138, p 70.
2. Nikolić Vesna, Mihajlo Stanković, Dragan Cvetković, Ljubiša Nikolić, GC Analysis of the essential and thermal oil from the garlic (*Allium sativum* L.). First Balkan Botanical Congress, Aristotle University of Thessaloniki, from 19th to 22nd September 1997. Book of abstract 150, p 76.
3. Vesna Nikolić, Mihajlo Stanković, Ljubiša Nikolić and Milovan Dimić, The effect of garlic (*Allium sativum* L.) preparation on pathogenic microorganisms. 1st Congress of Biologists of Macedonia (with international participation) 18 - 21 september 1996, Ohrid, Macedonia. Book of abstract, p. 112.
4. Stanković M., Nikolić V., Cakić M., Skala D., Nikolić Lj., Spectroscopic analysis of thermal oil obtained from garlic (*Allium sativum* L.), 1 st International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, June 1 - 4, 1998, Halkidiki, Greece, Book of Abstracts, vol I, PO 439.
5. Stanković M., Nikolić V., Cvetković D., Nikolić Lj., Antimicrobe powder activity of garlic and commercial antibiotics, 1st International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, June 1 - 4, 1998, Halkidiki, Greece, Book of Abstracts, vol II, PO 691.
6. Nikolić V., Stanković M., Cvetković D., Skala D., Influence of heating time on yield and content of bioactive components in thermal oil obtained from garlic (*Allium sativum* L.), 1 st International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, June 1 - 4, 1998, Halkidiki, Greece, Book of Abstracts, vol II, PO 696.

7. Nikolić V., Stanković M., Kapor A., Nikolić Lj., Cvetković D., Dimić M., Allicin and inclusion complexes allicens as antimicrobial agents, 2nd Congress of the Macedonian Microbiologists, Ohrid, 28-31. 05. 2002., Book of abstracts, 129 - 130
8. Nikolić V., Stanković M., Nikolić Lj., Cvetković D., Vinilditiini farmakološki aktivna jedinjenja: sinteza i GC-MS analiza, Treći Kongres farmaceuta Jugoslavije, Beograd, 29. 10. do 02. 11. 2002., Arhiv za farmaciju, 460 - 461.
9. Nikolić V., Stanković M., Nikolić Lj., Cvetković D., Ajoeni farmakološki aktivna jedinjenja: sinteza i GC-MS analiza, Treći Kongres farmaceuta Jugoslavije, Beograd, 29. 10. do 02. 11. 2002., Arhiv za farmaciju, 458 - 459.
10. Nikolić V., Stanković M., Nikolić Lj., Antimicrobial activity synthesis allicin and their derivatives, 2nd Conference On Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Chalkidiki-Greece, 29. 09. do 03. 10. 2002., Book of abstracts, 205

R₈₂: Radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu

1. M. Stanković, M. Cakić, V. Veljković, V. Nikolić, Spektrofotometrijsko određivanje sumpora belog (*Allium sativum* L.) i crnog (*Allium cepa* L.) luka, XXXVI Simpozijum srpskog hemijskog društva sa međunarodnim učešćem, Beograd, 1994, Izvodi radova, AH-13, str. 87.
2. V. Nikolić, M. Stanković, Analiza tiosulfinata u uljima belog luka (*Allium sativum* L.), XXXVII Savetovanje srpskog hemijskog društva sa međunarodnim učešćem, Novi Sad, 1995, Izvodi radova, BH-10, str. 153.
3. M. Stanković, V. Nikolić, HPLC analiza tiosulfinata u homogenatu, prahu i ulju belog luka (*Allium sativum* L.). Savetovanje o lekovitom i aromatičnom bilju sa međunarodnim učešćem, Donji Milanovac, 10-15. 09. 1995., Izvodi radova, str. 328 - 329.
4. V. Nikolić, M. Stanković, Lj. Nikolić, Razdvajanje i identifikacija aminokiselina i tiosulfinata belog luka (*Allium sativum* L.), II simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" Leskovac 24 - 25 oktobar 1996., Izvodi radova, OHT-12, str. 89.
5. M. Stanković, V. Nikolić, D. Cvetković, Lj. Nikolić, Stabilnost tiosulfinata u prahu belog luka (*Allium sativum* L.), XXXVIII Savetovanje srpskog hemijskog društva sa međunarodnim učešćem, Beograd, 6 - 8 jun 1996., Izvodi radova, BH-10, str. 118.
6. M. Stanković, V. Nikolić, D. Cvetković, Lj. Nikolić, Mikrobiološka aktivnost praha belog luka (*Allium sativum* L.). XXXVIII Savetovanje srpskog hemijskog društva sa međunarodnim učešćem Beograd, 6 - 8 jun 1996., Izvodi radova, BH-11, str. 119.
7. V. Nikolić, M. Stanković, LJ. Nikolić, Razdvajanje i identifikacija aminokiselina i tiosulfinata belog luka (*Allium sativum* L.), II simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" Leskovac 24 - 25 oktobar 1996., Izvodi radova, OHT-12, str. 89.

8. V. Nikolić, M. Stanković, LJ. Nikolić, D. Cvetković, Kinetika dobijanja ulja belog luka (*Allium sativum* L.). "Dani lekovitog bilja '97" IV manifestacija sa međunarodnim učešćem, Brezovica, 16-20. 09. 1997, Izvodi radova, P-08, str. 52 - 53.
9. V. Nikolić, M. Stanković, LJ. Nikolić, D. Cvetković, GH-analiza etarskog ulja belog luka (*Allium sativum* L.). "Dani lekovitog bilja '97" IV manifestacija sa međunarodnim učešćem, Brezovica, 16-20. 09. 1997., Izvodi radova, P-09, str. 53.
10. A. Kapor, M. Vučinić, S. Rakić, V. Nikolić, Strukturna karakterizacija kompleksa alicina sa β -ciklodekstrinom i ureom, 50 - 51. IX Konferencija srpskog kristalografskog društva, 20. - 22. septembar 2001. Novi Sad, Izvodi radova, str. 50 - 51.
11. V. Nikolić, M. Stanković, D. Skala, Lj. Nikolić, D. Cvetković, Kinetika sinteze alicina, IV Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", 11-12 oktobar 2001. Leskovac, Izvodi radova, OHT-22, str. 33.
12. V. Nikolić, M. Stanković, D. Skala, Lj. Nikolić, D. Cvetković, Kinetika sinteze ajoena i vinilditiina, OHT-23. IV Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", 11-12 oktobar 2001. Leskovac, Izvodi radova, OHT-23, str. 34.

BIOGRAFIJA

Vesna Nikolić rođena je 18. 10. 1965. godine u Leskovcu. Osnovnu školu i srednju hemijsku školu završila je u Leskovcu. Upisala je Tehnološki fakultet u Leskovcu, biohemijski odsek, smer farmaceutsko-kozmetički, školske 1984/85 godine. Završila je studije u roku (31. 05. 1990. godine) sa prosečnom ocenom 8,5. Diplomski rad odbranila je sa ocenom 10 i time stekla zvanje diplomiranog inženjera hemijske tehnologije. Kao studentu godine dodeljene su joj diplome Srpskog hemijskog društva 1985. i 1986. godine za izuzetan uspeh u oblasti hemijskih nauka.

Od 01. 10. 1992. godine u zvanju asistenta pripravnika na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu drži eksperimentalne vežbe iz predmeta Organska hemija II, a angažovana je i na izvođenju vežbi iz Organske hemije I i Hemije i tehnologije prirodnih organskih jedinjenja. Na istom fakultetu 1992. godine upisuje poslediplomske studije na smeru Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo. U izboru za asistenta od 01. 09. 1998. god. izabrana je za predmet Organska hemija II.

Učestvuje u realizaciji tri naučnoistraživačka projekta. Autor je monografije nacionalnog značaja, "Beli luk (*Allium sativum* L.): Bioaktivni sastojci i izolati. Ima objavljena 4 rada u časopisima međunarodnog značaja sa recenzijom, 3 rada u časopisu nacionalnog značaja, 3 rada saopštena na skupu nacionalnog značaja štampana u celini u stručnom časopisu, 10 radova sopštena na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu i 12 radova sopštena na skupu nacionalnog značaja štampana u izvodu.



Универзитет у Нишу
Универзитетска библиотека

University of Niš
University Library

Овај текст је део Дигиталног репозиторијума, јавно је доступан, и може се слободно користити за личне потребе, у образовне и научне сврхе. Ако користите текст, наведите извор.

Комерцијална употреба текста није дозвољена.

This text is a part of the Digital repository of public domain. Permission is granted for personal, educational and scientific use. If you do use the document, indicate the source.

No permission is granted for commercial use.

