

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA PEULIČ

**SINTEZA DERIVATOV EVGENOLA IN IZOEVGENOLA TER
VREDNOTENJE NJIHOVIH ORGANOLEPTIČNIH LASTNOSTI**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016



ALEKSANDRA PEULIČ

**SINTEZA DERIVATOV EVGENOL A IN IZOEVGENOLA TER
VREDNOTENJE NJIHOVIH ORGANOLEPTIČNIH LASTNOSTI**

**SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF EUGENOL AND ISOEUGENOL
AND EVALUATION OF THEIR ORGANOLEPTIC PROPERTIES**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo, na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za prijaznost, potrpežljivost, strokovno pomoč in za ves trud. Zahvala gre tudi celi Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo, predvsem tehniški sodelavki ge. Damjani Zalar, ki mi je priskotila na pomoč pri vseh nejasnostih in zapletih v laboratoriju. Hvala tudi moji družini in prijateljem za vso podporo tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Aleksandra Peulič

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

I. POVZETEK.....	III
II. ABSTRACT	VII
III. SEZNAM OKRAJČAV	VIII
1. UVOD.....	1
1. 1. DEFINICIJA DIČAV	1
1. 2. KAKO ZAZNAVAMO DIČAVE.....	1
1. 3. DELITEV DIČAV.....	2
1.3.1. Naravne dičave	2
1.3.2. Polsintezne in sintezne dičave	3
1. 4. OZNAČEVANJE DIČAV V KOZMETIČNEM IZDELKU	4
1. 5. VARNOST DIČAV	5
1.5.1. Toksičnost dičav	5
1. 6. UPORABA ESTROV KOT DIČAV	6
1. 7. EVGENOL	8
1.7.1. Uporaba evgenola	8
1.7.2. Toksičnost evgenola	9
1.7.3. Biološki učinki estrov evgenola	10
1. 8. IZOEVGENOL	13
1.8.1. Uporaba izoevgenola	14
1.8.2. Toksičnost izoevgenola.....	14
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE.....	17
3. 1. Materiali.....	17
3. 2. Metode.....	17
4. EKSPERIMENTALNI DEL	20
4. 1. Sinteza 4-alil-2-metoksifenilbenzoata (1)	20
4. 2. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilbenzoata (2)	21
4. 3. Poskus sinteze 4-alil-2-metoksifenilheksanoata (3).....	22
4. 4. Sinteza 4-alil-2-metoksifenilheksanoata (3).....	23
4. 5. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilheksanoata (4).....	24
4. 6. Sinteza 4-alil-2-metoksifenilundek-10-enoata (5)	25

4. 7. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilundek-10-enoata (6).....	26
4. 8. Sinteza 4-alil-2-metoksifenildekanoata (7)	27
4. 9. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenildekanoata (8)	28
4. 10. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-(klorometil)benzoata (9)	29
4. 11. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-(klorometil)benzoata (10)	30
4. 12. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-4-(klorometil)benzoata (11).....	31
4. 13. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-(klorometil)benzoata (12)	33
4. 14. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-2-acetoksietanoata (13)	34
4. 15. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-2-acetoksietanoata (14).....	35
4. 16. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-4-cianobenzoata (15).....	36
4. 17. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-cianobenzoata (16)	37
4. 18. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-((4-alil-2-metoksifenoksi)sulfonil)benzoata (17)	39
4. 19. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-((2-metoksi-4-prop-1-en-1-il)fenoksi)sulfonil)benzoata (18)	40
4. 20. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-bromobenzoata (19).....	41
4. 21. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-bromobenzoata (20).....	43
4. 22. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-nitrobenzoata (21).....	44
4. 23. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-nitrobenzoata (22)	45
4. 24. Rezultati organoleptičnega vrednotenja	47
5. RAZPRAVA	49
5.1. Sinteza estrov evgenola in izoevgenola.....	49
5. 1. 1. Nukleofilna acilna substitucija z evgenolom oziroma izoevgenolom in ustreznimi kisljinami ali njihovimi kislinskimi kloridi	49
5. 1. 2. Aktivacija karboksilne kisline	52
5. 2. Vrednotenje organoleptičnih lastnosti.....	56
5. 2. 1. Izgled, talilne in topnost.....	57
5. 2. 2. Vonj.....	58
5. 2. 3. SAR glede na vonj	60
6. SKLEPI.....	61
7. LITERATURA.....	62

I. POVZETEK

Danes si brez raznovrstnih dišav skoraj ne moremo predstavljati življenja. Za zagotavljanje prijetnega vonja izdelka in prekritja neprijetnega vonja ostalih sestavin niso prisotne le v parfumi in toaletnih vodicih, ampak tudi v negovalni kozmetiki. Po razcvetu organske sintezne kemije so se na trgu kmalu pojavile nove sintetične vonjave, ki izpodrinjajo prvotne oblike dišav, predvsem različne izvlečke rastlin, zaradi svoje nizke cene in velike produkcije. Dve izmed znanih dišav, ki se uporabljata pri sintetični produkciji novih dišav, sta tudi evgenol in izoevgenol (izomer evgenola). Predstavljata aromatski komponenti v klinčkah (nageljnovih žbicah) in v drugih začimbah (na primer v muškarnem oreščku). Iz teh dveh dišavih spojin sintetizirajo različne estre, ki predstavljajo sestavni del arom in dišav. Namen magistrske naloge je bil sinteza in njena optimizacija različnih, v literaturi še neopisanih estrov evgenola in izoevgenola. Želeli smo ugotoviti, kako kislini del v estrih vpliva na fizikalno - kemijske in organoleptične lastnosti izhodnih dišav. Za pripravljene estre prišakujemo tudi veliko oksidativno stabilnost. Uspešno smo tako sintetizirali, izolirali in očistili 20 novih estrov evgenola in izoevgenola.

Končne estre smo fizikalno - kemijsko okarakterizirali in organoleptično ovrednotili. Pripravili smo 4-alil-2-metoksifenilbenzoat (**1**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilbenzoat (**2**), 4-alil-2-metoksifenilheksanoat (**3**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilheksanoat (**4**), 4-alil-2-metoksifenilundek-10-enoat (**5**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilundek-10-enoat (**6**), 4-alil-2-metoksifenildekanoat (**7**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenildekanoat (**8**), 4-alil-2-metoksifenil-3-(klorometil)benzoat (**9**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-(klorometil)benzoat (**10**), 4-alil-2-metoksifenil-4-(klorometil)benzoat (**11**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-(klorometil)benzoat (**12**), 4-alil-2-metoksifenil-2-acetoksietanoat (**13**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-2-acetoksietanoat (**14**), 4-alil-2-metoksifenil-4-cianobenzoat (**15**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-cianobenzoat (**16**), 4-alil-2-metoksifenil-3-((4-alil-2-metoksifenoksi)sulfonil)benzoat (**17**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-((2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenoksi)sulfonil)benzoat (**18**), 4-alil-2-metoksifenil-3-bromobenzoat (**19**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-bromobenzoat (**20**), 4-alil-2-metoksifenil-3-nitrobenzoat (**21**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-nitrobenzoat (**22**). Prijeten, vendar blag vonj evgenola se je obdržal pri estrih **1**, **7**, **9** in **21** (oster vonj). Vonj izoevgenola pa ohrani le ester **14**. Pri estrih **3**, **4**, **5**, **6**, **11**, **15**, **17** ter **19** vonja ne zaznamo več. Najvišji izkoristek smo dobili pri sintezi estra **1** (91,9 %), najprijetnejši vonj pa smo zaznali pri estri **2** in **12**, ki imata izrazit vonj po vaniliji.

Ključne besede: dišave v kozmetičnih izdelkih, sintetične dišave, zmanjšanje neželenih učinkov, evgenol, izoevgenol

II. ABSTRACT

Today, without a variety of fragrances we can hardly imagine life. They are present not only in perfumes and toilet waters, but also in cosmetics for skin care to provide pleasant smell and cover up unpleasant odor of other ingredients. After the boom of organic synthetic chemistry some new synthetic scents appeared on the market, which nowadays supplant the original forms of fragrances, especially various plant extracts, due to its low prices and higher production. Two of the most famous fragrances, which are also used in the production of new synthetic fragrances, are eugenol and isoeugenol (isomer of eugenol). They represent an aromatic component in cloves and other spices (nutmeg). Out of these aromatic components there is synthesized a variety of esters, which form an integral part of the flavors and fragrances. The purpose of the master's thesis was the synthesis and optimization of different, not yet been described in the literature, esters of eugenol and isoeugenol. We wanted to determine how does ester's acid part affects the physico-chemical and organoleptic characteristics of primary fragrances. For the prepared esters we also expect a higher oxidative stability. Therefore, we successfully synthesized, isolated and purified 20 new esters of eugenol and isoeugenol.

For the final esters we did physico-chemical characterization and organoleptic evaluation. We prepared 4-allyl-2-methoxyphenylbenzoate (**1**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenylbenzoate (**2**), 4-allyl-2-methoxyphenylhexanoate (**3**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenylhexanoate (**4**), 4-allyl-2-methoxyphenylundec-10-enoate (**5**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenylundec-10-enoate (**6**), 4-allyl-2-methoxyphenyldecanoate (**7**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyldecanoate (**8**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-3-(chloromethyl)benzoate, (**9**) 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-3-(chloromethyl)benzoate (**10**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-4-(chloromethyl)benzoate (**11**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-4-(chloromethyl)benzoate (**12**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-2-acetoksietanoata (**13**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-2-acetoksietanoata (**14**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-4-cyanobenzoate (**15**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-4-cyanobenzoate (**16**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-3-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)sulfonyl)benzoate (**17**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-3-((2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenoxy)sulfonyl)benzoate (**18**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-3-bromobenzoate (**19**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-3-bromobenzoate (**20**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-3-nitrobenzoate (**21**), 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl-3-nitrobenzoate (**22**). Esters **1**, **7**, **9** and **21** (sharp smell) kept pleasant but mild odor of eugenol.

Smell of isoeugenol retains only ester **14**. With esters **3**, **4**, **5**, **6**, **11**, **15**, **17** and **19** we can't detect odor anymore. The highest yield was obtained in the synthesis of ester **1** (91,9 %), but the most pleasant odor we noticed at esters **2** and **12** with the smell of vanilla.

Keywords: fragrances in cosmetic products, synthetic fragrance, reduce side effects, eugenol, isoeugenol

III. SEZNAM OKRAJČAV

CDCl₃	devteriran kloroform
CHN	elementna analiza
C¹H¹S	centralnoživčni sistem
d	dublet
dd	dublet dubleta
DKM	diklorometan
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
EC₅₀	koncentracija, ki ima biološki učinek pri 50 % v preizkušani skupini
ESI	elektrozpršilna ionizacija
FDA	Ameriški vladni urad za prehrano in zdravila
FTIR	infrardeča spektroskopija
GIT	gastrointestinalni trakt
GRAS	splošno priznано kot varno
HLO	humana lipooksigenaza
HR-MS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
IARC	Mednarodna agencija za raziskovanje raka
IC₅₀	koncentracija, ki povzroči 50 % zaviranje danega parametra, npr. rasti
IFRA	Mednarodna zveza za dišave
J	sklopitvena konstanta
m	multiplet
MAO	zaviralci monoaminooksidaze, antidepresiv
MF	mobilna faza
MOE	stopnja izpostavljenosti
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
NOA(E)L	najvišji testni odmerek, pri katerem ni opaženih nobenih neželjenih učinkov

NTP	nacionalni toksikološki program
q	kvartet
QSAR	kvantitavno razmerje med strukturo in delovanjem
Rf	retencijski faktor
s	singlet
SCCS	Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov
SLO	encim 15-lipooksigenaza iz sojinega fičola
T	temperatura
t	triplet
TBTU	O-[benzotriazol-1-il]-N,N,N',N'-tetrametiluraniumtetrafluoroborat
TCT	2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin
TEA	triethylamin
TLC	tankoplastna kromatografija
μ	kemijski premik
15-LO	encim 15-lipooksigenaza

1. UVOD

Odišavljena olja, parfumi in ostali dišavni izdelki so bili človeški okrasni elementi iz začetkov civilizacije. V obdobju zgodnjega Egipta so dišave balzame uporabljali kot del verskih obredov in pozneje tudi kot del poročnih ceremonij. Kadilna smola bosvelija in mira se še tisočletja redno uporabljata pri meditacijah in molitvah, saj vonj obuja višjo zavest, poudarja duhovnost in spodbuja mentalno doživetje (1, 2).

Dišave močno vplivajo na različna področja psihološkega delovanja ljudi, od percepcije do kognitivnih procesov in vedenja. Vendar pa je njihov glavni namen uporabe prav ta, da dišave maskirajo telesni vonj posameznika oziroma ga naredijo prijetnejši (3).

Danes lahko dišave najdemo praktično vsepovsod, predvsem pa predstavljajo enega izmed podpornih stebrov močno razvite kozmetične industrije.

1. 1. DEFINICIJA DIŠAV

Dišave in aromatične substance so razmeroma močno dišave organske snovi s karakterističnim, ponavadi za večino ljudi, prijetnim vonjem. Zaradi te lastnosti se jih tako široko uporablja v industriji parfumov in parfumiranih produktov kot tudi v prehrabeni industriji za odišavljanje hrane in pijače. Pri negovalni kozmetiki je njihova vloga zagotovitev prijetnega vonja izdelka ali maskiranje neprijetnega vonja ostalih sestavin.

Ali se bo posamezni produkt imenoval kot dišava ali aroma, je odvisno od njegove uporabe kot parfuma (v kozmetičnih izdelkih) oziroma arome (predvsem v prehranskih izdelkih) (4).

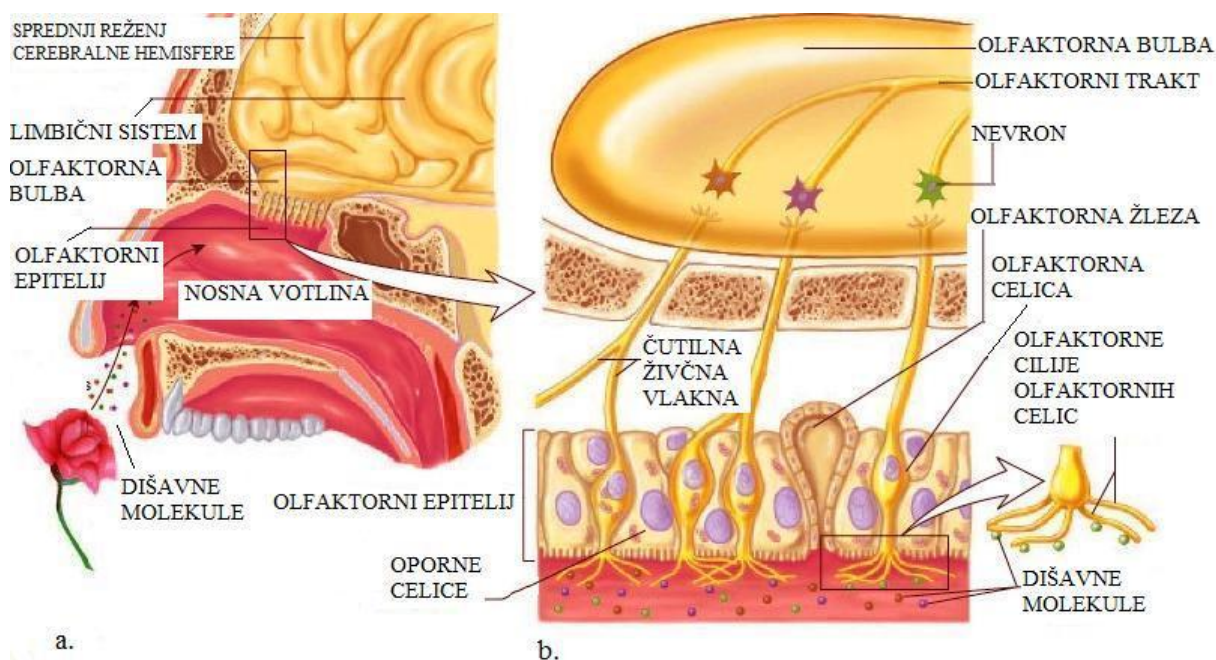
1. 2. KAKO ZAZNAVAMO DIŠAVE

Da ima lahko neka spojina vonj, mora biti hlapna in imeti mora dovolj visok parni tlak pri sobni temperaturi. Tipična dišavna molekula ima ponavadi molekulsko maso pod 300 g/mol, kakor ima večina komponent v eteričnih oljih. Glede na to, da imamo množico analitičnih orodij za detekcijo spojin v eteričnih oljih, lahko rečemo, da je naš nos prav takšno orodje.

Dišave in arome imajo svoje receptorje ali olfaktorne celice v nosu. Nos je človeški organ, ki zaznava vonj. Nosna votlina je s pretnom razdeljena v levo in desno votlino. Nosni votlini sta obloženi z mukozno membrano, ki je navlažena preko izločenega mukusa. Kemikalije v zraku, ki vstopijo v nos, se morajo najprej raztopiti v mukusu, preden jih lahko zaznamo. V zgornjem delu nosne votline se nahaja olfaktorni epitelij z olfaktornimi celicami, ki so občutljive na raztopljene kemikalije v mukusni raztopini, kot je razvidno na sliki 1.

Da lahko detektiramo molekulo, se mora le ta specifično vezati na občutljivo celico, ki se obnaša kot senzorni receptor. Ti so locirani v olfaktornem epiteliju, kjer naj bi se specifično vezali z molekulo, torej je vezava odvisna od strukture same molekule (5).

Ko se molekula veže na receptorsko mesto, se olfaktorne celice vzdražijo in pošljejo električne signale po olfaktornem živcu, prvem kranialnem živcu, ki prenese senzorno informacijo v možgane. Možganske olfaktorne regije potem interpretirajo informacijo in prepoznajo in razločijo različne vonje. Strukture možganov, ki so povezane z zaznavo vonja, se nahajajo v prednjem korteksu, bolj natančno v rinencefalonu. Informacija tam vstopi v olfaktorni bulbus preko olfaktornega živca. Nato se olfaktorni trakt poveže z drugim področjem korteksa, imenovanim neokorteks, kar omogoči na koncu zavestno zaznavo in prepoznavo vonja (5).



Slika 1: Lokacija olfaktornih celic in njihova anatomija; a) olfaktorni epitelij v nosni votlini, b) konec olfaktornih celic v cilijih, kjer so receptorji za specifičen vonj (6).

1. 3. DELITEV DIŠAV

Dišave lahko razdelimo na tri velike skupine, in sicer na naravne, polysintezne in sintezne.

1.3.1. Naravne dišave

Naravne dišave se pridobivajo iz rastlin in živalskih izločkov. Za pridobivanje eteričnih olj se uporabljajo različni rastlinski deli, npr. cvetovi (jasmin, neroli), listje (geranija, palčuli),

plodovi in lupine plodov (različni citrusi), koren (iris, angelika), deblo (cedar), nadzemni deli rastline (kadulja) ter nazadnje iglice iglavcev (bor, smreka). Od živalskih izločkov so pomembni mošus (pridobljeno iz izločkov mošusovega jelena, ki živi v gorah centralne Azije), ambra (nastaja pri patološki sekreciji v prevesju kita glavača), kastoreum (bobrov žlezni izloček) in ciber (pridobljen iz izločkov žlez cibetovke). Njihov vonj traja dalj časa in so zato pomembni za fiksacijo vonja. Zaradi varstva živali in visoke cene se danes uporablja zelo malo dišav živalskega izvora. Te nadomestijo sintetične substance, npr. ambra se zamenjuje s sintetičnim vanilinom. Namesto mošusa je dovoljeno, da se za kozmetične pripravke uporabljata ketonski in ksilenski mošus (7, 8). Ker dišave naravnega izvora vsebujejo veliko sestavin, katerih sestava in vpliv na organizem nista povsem znana, ne moremo zagotovo trditi, da so bolj varne za uporabo kot sintezne dišave. Najpogostejše naravne dišave so predvsem eterična olja (npr. sivkino, jasminovo, Ylang-ylang), ki pa lahko predstavljajo potencialno tveganje z vidika zdravja zaradi vsebnosti posameznih dišavnih komponent (9).

Za pridobitev dišav rastlinskega izvora se uporabljajo različne metode, kot so destilacija z vodno paro, ekstrakcija s topili (npr. perkolacija ali hidro-difuzija, maceracija), enflerača, hladno stiskanje, ekstrakcija s superkritičnim ogljikovim dioksidom ter druge metode (10).

1.3.2. Polsintezne in sintezne dišave

Skozi čas je organska kemija napredovala in kmalu so se na trgu pojavile sintezne dišave, ki so zaradi svoje nizke cene in možnosti produkcije velikih količin hitro izpodrinile prvotne oblike dišav. Iz naravnih dišav so uspeli izolirati ogljikovodike, aldehide, ketone, laktone, fenole, okside, acetale, dušikove spojine, estre, alkohole idr. Mednje sodijo na primer geraniol, citronelal, citral, eugenol in mentol. Polsintezne substance predstavljajo v prvi vrsti derivate izoliranih spojin, kot so acetati, propionati, formati in ostali estri citronelola, linalola, geraniola (npr. geraniolacetat in linalilacetat in hidroksilirane spojine npr. hidroksicitronelal). Med sintetične dišave uvrščamo tiste, ki posnemajo vonj naravnih dišav ali pa so popolnoma nove spojine brez naravnega izvora (7, 9). Značilnost sintetičnih dišav je v tem, da se lahko nahajajo v dveh izomernih oblikah, kar lahko povzroči spremenjen, različen in karakterističen vonj za vsako od obeh spojin. Druga oblika spojine ima včasih celo neprijeten vonj. S pomočjo kiralne sinteze lahko tako pripravljamo le tisto, ki ima prijeten vonj. Za izdelavo kozmetičnih izdelkov uporabljajo predvsem mešanice naravnih ekstraktov in posameznih dišav, kar na koncu poimenujejo kot parfum ali dišavna sestavina. Kozmetični izdelek pa se razlikuje od drugih ne le po sestavi, ampak tudi po deležu dišav, ki jih vsebuje (10, 11).

Diigave se lahko spremenijo zaradi vpliva kisika, svetlobe, temperature in vlage. Lahko pride do procesa oksidacije, polimerizacije, kondenzacije, hidrolize in drugih procesov, zato moramo zagotoviti ustrezne pogoje shranjevanja tako samih diigav kot tudi izdelkov, v katerih se nahajajo. Veliko izdelkov, ki jih vsakodnevno uporabljamo, vsebujejo diigave. Vendar je največja uporaba diigav prav v kozmetičnih izdelkih, kar prikazuje preglednica 1. Tudi neodigavljeni izdelki lahko zgolj za prekritje naravnega vonja ostalih sestavin v izdelku vsebujejo manjše količine diigav. V ta namen je evropska in kozmetična zakonodaja določila pravilno označevanje sestavin v kozmetičnih izdelkih, kjer je eden izmed ključnih segmentov zagotavljanje varnosti posameznih sestavin oziroma diigav (12).

Preglednica 1: Vsebnost diigav v kozmetičnih izdelkih (13).

Kozmetični izdelek	Delež diigav v %	Kozmetični izdelek	Delež diigav v %
Kreme, losjoni	0,3-0,8	Parfum	12-18
Mila	1-4	Toaletna vodica	5-18
Pudri	0,5-1	Parfumska vodica	8-12
Deodoranti	0,4-5	Dekoratívna kozmetika	0,02-0,5
šamponi	0,4-1		
Obrazna voda	0,2-0,4		
Preparati za tuširanje	4-5		

1. 4. OZNAČEVANJE DIIGAV V KOZMETIČNEM IZDELKU

Ovojnina vsakega kozmetičnega izdelka mora po določilih Evropske zakonodaje imeti navedeno seznam sestavin, varnostna opozorila in minimalni rok trajanja oziroma čas uporabe po odprtju izdelka. Za označevanje sestavin so do leta 2009 veljale smernice iz Direktive 76/768/EC, ki jih je zamenjala Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta o kozmetičnih izdelkih, ki je stopila v polno veljavo z 11. 7. 2013. Seznam sestavin je lahko naveden samo na sekundarni ovojnini, ni nujno, da je ta podatek tudi na primarni ovojnini. Mora pa se začeti z besedo »sestavine« ali »ingredients« (ang.). Vse sestavine morajo biti navedene po padajočem vrstnem redu glede na maso.

Sestavine s končno koncentracijo manjšo od 1 % so lahko navedene v poljubnem vrstnem redu, vendar za sestavinami s koncentracijo nad 1 % (8, 14).

1. 5. VARNOST DIŠAV

Varnost kozmetičnih izdelkov je bistvenega pomena, ki jo določamo s potrjevanjem varnosti posameznih sestavin, ki jih vsebuje določen izdelek. Tako kot vse kozmetične sestavine in izdelki so tudi dišave regulirane s strani specifične kozmetične zakonodaje, ki zagotavlja njihovo varnost (15).

Za dišave se uporablja izraz »parfum« ali »aroma«, razen za 26 izjem, ki jih označujemo po navodilih iz Priloge III Uredbe (ES) št. 1223/2009. Na podlagi številnih raziskav je Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (SCCS) izpostavil 26 dišav, ker naj bi povzročale preobčutljivostne reakcije. Pri seznamu sestavin mora biti njihova prisotnost posebej označena, če koncentracija posamezne dišave presega 0,001 % v izdelkih, ki se ne sperejo ali 0,01 % v izdelkih, ki se s kožo sperejo. Ta ukrep velja tako za dišave, prisotne v eteričnih oljih kot tudi za dišave sinteznega izvora (16).

Mednarodna zveza za dišave (IFRA), ustanovljena leta 1973 v Ženevi, je ena izmed institucij, ki se ukvarja z varnostjo dišav. Razvila je obsežen dokument z imenom »Kodeks izvajanja« (ang. Code of practice), ki daje priporočila za dobro delovno prakso in smernice za oceno varnosti dišav. S tem dokumentom je podprta zavezanost IFRA, tako da se zagotovijo varni izdelki za njihove potrošnike in za okolje. Vsebuje tudi standarde za varnost dišav, ki omejujejo ali prepovedujejo uporabo nekaterih dišav (17).

1.5.1. Toksičnost dišav

Ne glede na izvor (naravni ali sintetični) lahko dišave povzročijo zdravstvene ali okoljske probleme. Rezultati različnih študij kažejo, da nekatere dišave sprožijo astmatična poslabšanja pri posameznikih, predvsem pri bolnikih s hudo ali atopijsko astmo. Močne vonjave lahko sprožijo astmatično poslabšanje, ne morejo pa povzročiti nastanka astme. Za močus ksilen (nitro-močus) obstajajo znanstveni dokazi za karcinogenost. Študije so bile opravljene s testi na hišinskih modelih, ki jih je ocenil Znanstveni odbor EU za varstvo potrošnikov (SCCS). IFRA kodeks dovoljuje uporabo močus ketona le, če ta vsebuje manj kot 0,1 % močus ksilena. Končni sklepi so potrdili, da je močus vseeno dovolj varen za nadaljnjo uporabo v kozmetičnih izdelkih (18, 19).

Ugotovili so tudi, da nekatere dišave delujejo kot hormonski motilci ter tako spremenijo hormonske signale s posledičnim vplivom na človeško telo (npr. razvojne spremembe reprodukcijskega in živčnega sistema). Med tovrstne spojine spadajo *sintezni* mošusi, ki lahko delujejo gibko estrogeno (20).

Veliko dišavnih sestavin so povezali z glavoboli, slabostjo ali preobčutljivostnimi reakcijami kože. Znani so razni prehapteni in prohapteni, ki niso direktno reaktivni, vendar lahko to postanejo s predhodno aktivacijo. Prehapteni se lahko brez encimske pomoči pretvorijo v haptene s preprosto kemijsko reakcijo (oksidacija na zraku, fotoaktivacija) in povzročijo preobčutljivostne reakcije.

Oksidirani produkti pogosto uporabljenih terpenov (npr. limonen, linalol, geraniol) so v človeških testih pokazali močno senzitivizacijo.

Pri prohaptenu gre za bioaktivacijo (aktivacija z encimsko katalizo) v koži, kar povzroči nastanek haptena. Ni lahko določiti ali nek alergen deluje kot hapten ali se posredno obnaša kot hapten oziroma hapten. Z oksidacijo na zraku ali bioaktivacijo pogosto dobimo isti produkt.

Mednje spadata tudi dišavi evgenol in izoevgenol, ki se aktivirata z bioaktivacijo (oksidacijo). Odbor SCCS ju je na podlagi kliničnih študij uvrstil v seznam uveljavljenih alergenov, ki povzročajo preobčutljivostne reakcije pri ljudeh (21).

1. 6. UPORABA ESTROV KOT DIŠAV

Estri človeku od nekdaj predstavljajo razširjeno skupino spojin v rastlinskih izvlečkih in dišavah. Predstavljajo sestavni del večine aromatičnih in dišavih spojin. V kozmetični industriji se uporabljajo pri razvoju novih izvlečkov in dopolnitvi človeku znanih vonjav zaradi svojega sladkega in cvetličnega vonja. Uporaba je velika tudi v prehranski industriji, kjer se uporabljajo estri za doseganje bolj aromatičnega okusa. Estri so odgovorni za aromo velikega deleža sadja, kot na primer jabolk, banan, ananasa in jagod (22).

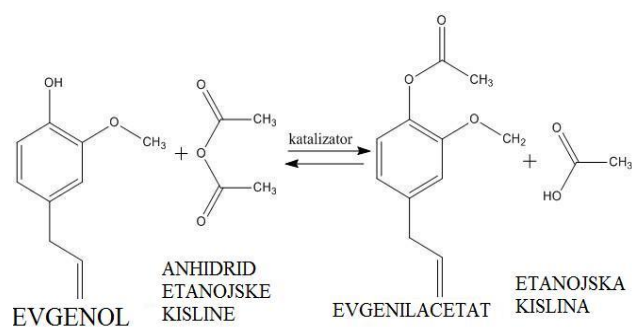
Pripravimo jih lahko zelo enostavno. Esterifikacija je splošen izraz za kemično reakcijo, v kateri dva reaktanta (v glavnem alkohol in kislina) tvorita kot reakcijski produkt ester. Ker je reakcija reverzibilna, se izkoristek estra lahko izboljša po Le Chatelierjevem principu, in sicer s spremembo koncentracije reaktantov (povečanje količine alkohola), dodatkom sušilnega sredstva (H_2SO_4 ali molekularno sito) ali s sprotnim odstranjevanjem vode, na primer z destilacijo azeotropa s toluenom. Z večanjem molekule estra se karakteristika in intenziteta vonja manjša.

Poleg aromatične in dišne lastnosti pa imajo tudi vlogo kot fiksativi, surfaktanti, spazmolitiki, sedativi, imajo protivnetno delovanje in antifungicidno delovanje. So nizko toksični in so v splošnem varni za uporabo. Znani so predvsem naslednji estri, in sicer benzilacetat (jasmin, Ylang-Ylang, neroli), linalilacetat (bergamotka, sivka), geranilacetat (geranija, citronela) in citronelilformat (geranija) (5, 22, 23). Z razvijanjem kozmetične in farmacevtske industrije se je potreba po sintetičnih estrih povečala. Z estri so hoteli spremeniti termo-oksidativno stabilnost, indeks viskoznosti, lipofilnost, biorazgradljivost in predvsem zmanjšati neželene učinke izhodnih spojin (alkoholov oziroma kislin). V kozmetični industriji so z uporabo estrov stremeli tudi k razvoju novih in izboljšavo že znanih dišav. Tako se je zgodilo tudi z evgenolom in izoevgenolom, kjer so začeli množično uporabljati že njihove znane estre in sintetizirali že neznane estre.

Takšni estri bi lahko imeli boljše lastnosti, večjo permeabilnost in manjšo prooksidativno aktivnost za razliko od evgenola, ki ima v visokih koncentracijah lahko stranske učinke (vnetje, alergijske reakcije) zaradi produkcije fenoksi radikalov in kinonskih intermediatov. Pri tem so raziskovalci odkrili že biološke učinke estrov, ki bi lahko bili potencialne učinkovine proti različnim boleznim (24).

Pri proizvodnji parfumov in dišavljenih kozmetičnih izdelkov se poleg estrov največ uporabljajo naslednji estri *evgenilacetat*, *izoevgenilacetat*, *evgenilbenzoat*, *izoevgenilbenzoat*, *evgenilfenilacetat*, *izoevgenilfenilacetat*. Evgenilacetat se uporablja v parfumih, obogatenimi z nageljnovimi dišavicami. Obstaja v dveh oblikah, in sicer kot tekoča bleda rumena tekočina ali kot beli kristali. Reakcijska shema nastanka je prikazana na sliki 2.

Za razliko od evgenola ima bolj blag, sladko-balzamičen in rahlo pikanten vonj z noto klinčkov. Izevgenilacetat se pojavlja v dišavi, cvetličnih parfumih in v parfumih z vonjem po nageljnovih dišavicah. Je v obliki belih granuliranih kristalov z balzamičnim, toplim in rahlo pekočim vonjem, obogatenim z noto klinčkov (25).



Slika 2: Sinteza evgenilacetata; acetiliranje evgenola z acetanhidridom v prisotnosti katalizatorja (npr. PMA in fosfomolibdenska kislina), (26).

1. 7. EVGENOL

Klinčiki ali nageljnovi cvetovi so že v 16. stoletju veljali za najbolj dragoceno začimbo na svetu. Uveljavili so se kot močno aromatično, dišeče sredstvo tako pri pripravi hrane kot tudi kot zdravilo pri različnih tegobah. Drogo predstavljajo posušeni cvetni popki, ki po obliki spominjajo na kline, češpičke. Veljajo za drogo, ki vsebuje največ eteričnega olja (do 20 %). Tega pridobivajo iz posušenih cvetnih popkov, listov in stebel drevesa *Syzygium aromaticum* (sinonim. *Caryophyllata aromatica*).

Eterično olje klinčkov vsebuje v glavnem fitokemikalijo evgenol (49–87 %), ki je substituiran gvajakol z alilno verigo ali 2-metoksi-4-(2-propenil) fenol z molekulsko maso 164,2 g/mol. Poleg evgenola vsebuje eterično olje tudi α -kariofilen (4–21 %) in evgenilacetat (0,5–21 %), (27, 28).

Evgenol ima fenilpropanoidni skelet (velikina komponent ostalih eteričnih olj so monoterpeni in seskviterpeni) in je težji od vode. Zato dobra droga, ki vsebuje veliko eteričnega olja, potone na dno ali pa iz vode gleda le popek. Eterično olje v nageljniovih cvetovih je v shizogenih kanalčkih, zato ga je težje ekstrahirati kot npr. iz površinskih žlez na listih poprove mete. Najdemo ga tudi v eteričnih oljih lista cimeta (lahko ga ima >90 %), pimenta, ylang-ylang in vrtnice. Ta eterična olja vsebujejo praviloma manj evgenola, zato imajo bolj ostro lesno aromo in so tudi na trgu takšna eterična olja težje dostopna (28, 29). V vodi je netopen, dobro pa se topi v 70–100 % etanolu, ledocetu (brezvodna očetna kislina), etru, kloroformu, maščobah in vodni raztopini NaOH. Je viskozna tekočina brezbarvne do blede rumene barve. Pod normalnimi pogoji je stabilen, pri izpostavitvi svetlobi in na zraku pa spremeni barvo. Ima intenziven, pekoč, slahek vonj po klinčkih (30).

Danes ga velikoma pridobivajo z izolacijo iz cenejših eteričnih olj, zato industrija ne izkazuje potreb po sintetični produkciji. Evgenol že zmeraj prednostno izolirajo iz listov ali klinčkov dišečega klinčevca s postopkom hidrodestilacije (31). Pridobivajo ga tudi iz listov cimetovca z ekstrakcijo z raztopino NaOH. Nefenolne preostanke nato odstranijo s parno destilacijo. Alkalno raztopino nakisajo pri nizki temperaturi in po postopku destilacije z vodno paro pridobijo isti evgenol. Shranjevati ga je potrebno v dobro zatesnjeni embalaži in v suhem prostoru pri nizki temperaturi (4, 31).

1.7.1. Uporaba evgenola

Svetovna produkcija evgenola je ocenjena na približno 22000 kilogramov. Znan je po svoji raznoliki uporabi, lahko ga najdemo tako v parfumeriji, živilski industriji (kot pekoča aroma) kot tudi v medicini in veterini.

V Združenih državah Amerike že od leta 1900 na veliko uporabljajo olje nageljnovih hrbic in evgenol kot aromatično in dišavno sredstvo. Prevsim se ju na široko uporablja v proizvodnji mil in detergentov, kjer se evgenol večinoma uporablja v koncentracijah od 0,05–0,1 % (v/v). V podatkovni bazi Delovne skupine za okolje in kozmetiko je uvrščeno 278 kozmetičnih proizvodov in proizvodov za osebno nego, dovoljenih za uporabo, ki vsebujejo evgenol v nizkih koncentracijah (29, 31). V raziskavah, kjer so opazovali delovanje evgenola na miši, psih in podganah, so ugotovili učinke evgenola na centralni živčni sistem in kardiovaskularni sistem (po intravenozni aplikaciji je prišlo do padca arterijskega krvnega tlaka).

Kot analgetik in anestetik se uporablja v stomatologiji. V kombinaciji s cinkovim oksidom se uporablja kot kirurška obveza, kot sredstvo za izdelavo kron, votliniski vložek ali začasni dentalni cement v endodontiki. Poleg tega ima še antipiretično, antiseptično, antioksidantno, virustatično, antitumorno, insekticidno, evpektično (povečanje izločanja prebavnih sokov) ter celo antidepresivno delovanje. FDA je odobrila uporabo olja nageljnovih hrbic (GRAS oznaka) v hrani kot aromatično sredstvo, v zobozdravstvu kot analgetično sredstvo in v dentalnem cementu ter v kozmetični industriji kot dišavo v proizvodih za osebno nego, v aromaterapiji in nenazadnje v transdermalnih dostavnih sistemih zdravilnih učinkovin (31).

1.7.2. Toksičnost evgenola

Evgenol velja za varnega, če se ga kot živilski aditiv (npr. v pijačah, sladoledih, želatinskih desertih, žvečilnih gumijih) uporablja v majhnih količinah (< 1,500 ppm). Vendar je lahko olje nageljnovih hrbic tudi toksično za človeške celice. Ob zaužitju ali injiciranju velikih količin (več kot 8 mL) so se pokazali znaki življenjsko ogrožujočih učinkov, ki vključujejo akutni respiratorni sindrom, oslabitev delovanja jeter (poškodbe hepatocitov) in zaviranje CNS (22). Letalni odmerek *per os* je bil ocenjen na 3,75 g/kg telesne mase. Pri zaužitju so se pojavili tudi znaki bruhanja, slabosti in iritacije GIT trakta. Poškodba hepatocitov pri miši se je pokazala pri *per os* odmerku 600 mg/kg, kjer so predhodno eksperimentalno izločili zalogo glutaciona iz jeter miši. Navkljub temu so odkrili hepatoprotektivno delovanje evgenola v nizkih (terapevtskih) odmerkih. V zobozdravstvu so včasih pogosto uporabljali nerazredčeno olje nageljnovih hrbic za preprečevanje zobnih bolečin in vnetij obzobnih tkiv. Pri tem so ga vmasirali v dlesni. Takratne študije so prikazale evgenol kot kontaktni alergen pri uporabi v dentalni medicini. Čeprav je evgenol znan kot senzitizer, povzročitelj alergijskih kožnih reakcij in dermatitisa, je to predvsem odvisno od koncentracije apliciranega evgenola in predispozicij posameznikov (nagnjenost k preobčutljivosti).

Pri testih z oblihi na ljudeh z dermatitisom so uporabili različne koncentracije evgenola in dobili so 59 pozitivnih reakcij (0,63 %) od 9,356 pacientov. Študije pri sesalcih so pokazale nizko akutno, dermalno in respiratorno toksičnost. Akutna peroralna toksičnost (LD_{50}) pri podganah je 2680 mg/kg, medtem ko je bila vrednost NOA(E)L = 250 mg/kg/dan. Akutni toksični učinki pri visokih odmerkih so vključevali poškodbo gastrilne mukoze, kapilarno hemoragijo (pri psih), spremembo barve in pojav lis v podganjih jetrih, gastrilno vnetje in jetrno kongestijo pri psih. Dokazov za teratogenost in genotoksičnost niso našli. Kancerogeno delovanje pri podganah niso našli, vendar je bilo opaženo signifikantno povečanje mase jetrnega tumorja pri miših ob tem, ko so jih izpostavili že evgenolu (32).

Na podlagi omejenih dokazov kancerogenosti niti IARC (Mednarodna agencija za raziskovanje raka) niti NTP (Nacionalni toksikološki program) nista razvrstila evgenola kot kancerogenega. Ker evgenol inhibira encim monoamino oksidazo, je priporočljiva previdnost pri jemanju eterilnega olja z visoko vsebnostjo evgenola pri vseh, ki jemljejo določene antidepresive in opioide (MAOIs, SSRI, petidin) ter indirektno simpatikomimetike. Zaradi svojega antiagregatornega učinka se uporaba odsvetuje tudi pacientom na antikoagulatni terapiji in pacientih s peptičnim ulkusom, hemofilijo ali pri ljudeh z drugimi motnjami krvavitve (29, 32).

1.7.3. Biološki učinki estrov evgenola

Delovanje zoper lišmanioze

Za acetilevgenol in benzoilevgenol so opravili študijo v primerjavi s timolnimi derivati o možnem delovanju zoper lišmanioze. Glavni cilj študije je bil raziskati naravno aktivne spojine in poiskati nove z visoko aktivnostjo in nizko toksičnostjo zoper *Leishmania infantum chagasi*. Timol in evgenol so kemijsko modificirali v ustrezne estre z očetno in benzojsko kislino. Acetil in benzoil derivate so testirali na njihovo anti-lišmaniozno aktivnost *in vitro* in *in vivo* zoper *L. i. chagasi*. Pri poskusu *in vivo* so derivate timola in evgenola aplicirali 100 mg/kg/dan intraperitonealno v BALB/c miši 30 dni. Ko so primerjali učinke acetilevgenola in benzoilevgenola, so ugotovili, da ima slednji večjo anti-lišmaniozno aktivnost proti promastigotam z maksimalno efektivno koncentracijo $EC_{50} = 10,58 \mu\text{g/mL}$, ki mu sledi acetilevgenol z maksimalno efektivno koncentracijo $EC_{50} = 23,21 \mu\text{g/mL}$. Vse spojine so pokazale podoben inhibitoren učinek za amastigotno obliko. S pomočjo drugih raziskav so ovrednotili in primerjali aktivnosti inhibicije med eterilnimi olji, bogatimi z evgenolom, istim evgenolom in njegovimi derivati. Ugotovili so neprimerljivo večji inhibitorni učinek acetilevgenola in benzoilevgenola kot pri ostalih eterilnih oljih in istem evgenolu.

Zoper promastigote so testirane spojine primerjali s pentamidinom (zdravilo proti parazitom) kot kontrolno učinkovino, medtem ko so zoper amastigote uporabili za kontrolo amfotericin B (antimikotik). Rezultati inhibitornega učinka zoper amastigote so bili statistično podobni, kar je razvidno na sliki 3. Prišli so do sklepov, da te učinkovine delujejo tako v intracelularni kot v ekstracelularni parazitski fazi (33).

Spojine	Promastigot LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Amastigot ($\mu\text{g/mL}$)	Toksičnost % RAW 264.7 celicno preživetje pri 100 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm\text{SD}$)
Acetilevgenol	23.21 $\pm$ 3.46	18.53 $\pm$ 4.79	>100
Acetiltimol	9.07 $\pm$ 0.06	10.95 $\pm$ 3.00	>100
Benzoilevgenol	10.58 $\pm$ 0.18	14.93 $\pm$ 4.50	97.7 $\pm$ 5.6
Benzoiltimol	8.67 $\pm$ 0.28	15.09 $\pm$ 3.65	63.6 $\pm$ 5.3
Evgenol	56.13 $\pm$ 2.09	20.81 $\pm$ 1.59	29 $\pm$ 1.3
Timol	12.85 $\pm$ 1.61	23.93 $\pm$ 6.29	36.5 $\pm$ 0.5
Amfotericin B	nedoločeno	20.44 $\pm$ 0.98	98.5 $\pm$ 7.5
Pentamidin	5.30 $\pm$ 0.81	nedoločeno	85.6 $\pm$ 6.9

Slika 3: Lignanična aktivnost timolnih in evgenolnih derivatov in toksičnost proti *L. i. Chagasi* in RAW 264.7 celicam (33).

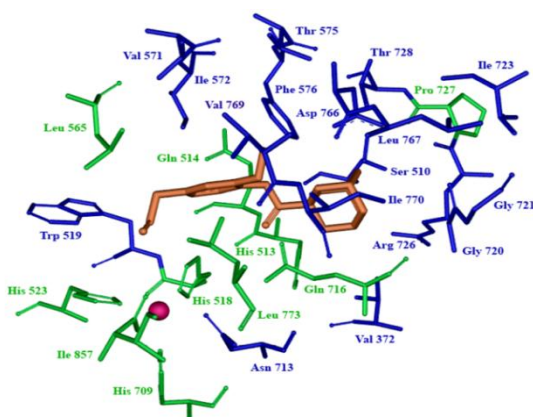
Inhibicija encima 15-lipooksigenaze

S sintezo 17 različnih estrov evgenola so raziskovali področje inhibicije encima 15 α lipooksigenaze, ki pretvarja arahidonsko kislino v 15 α hidroperoksieikosatetraenojsko kislino. Nedolgo nazaj so encim 15 α lipooksigenazo (15 α LO) razglasili kot potencialno tarčo za zdravljenje nekaterih bolezni oziroma patoloških stanj. Ugotovili so vpletenost omenjenega encima v napredovanje določenih rakavih tvorbo, kronične obstruktivne pljučne bolezni ter razvoja ateroskleroze zaradi oksidativne modifikacije LDL lipoproteinov nizke gostote.

V študiji so sintetizirali določeno število estrov evgenola in identificirali njihovo aktivnost kot povprečne inhibitorne koncentracije IC_{50} na encimu 15 α LO (SLO), iz sojinega fižola. Preučevali so vezavo modelnih spojin 4-alil-2-metoksi-fenilkarboksilatov (estri evgenola) v SLO aktivno mesto, QSAR študijo inhibitorjev za prepoznavo glavnih posebnosti tega razreda inhibitorjev in inhibicijo aktivnosti 15 α HLOa (humana lipooksigenaza) in 15 α HLOb z merjenjem inhibitorne koncentracije (IC_{50}). Lipooksigenazno aktivnost so merili v raztopini pufra (borat, 0,1 M, pH = 9) z meritvijo absorbance ($\lambda = 234$ nm) za 60 sekund po dodatku 15 α LO in substrata (linolna kislina) (34). Sintetizirane substance so dodali v DMSO raztopino (končna DMSO koncentracija 1 %), kjer so uporabili kot kontrolo DMSO raztopino brez inhibitorja. Spojine 4-alil-2-metoksifenil-nikotinat ($IC_{50} = 1,7$ μM), 4-alil-2-metoksifenil-izonikotinat ($IC_{50} = 2,3$ μM), 4-alil-2-metoksifenil-3-fluorobenzoat ($IC_{50} = 2,1$ μM), 4-alil-2-metoksifenil-1-cikloheksan karboksilat ($IC_{50} = 2,2$ μM) in 4-alil-2-metoksifenil-1-admantan karboksilat ($IC_{50} = 0,017$ μM) so pokazale najboljšo inhibicijo v SLO mestu.

Kot je lahko razvidno na sliki 4, so se vse spojine uspešno sidrale v aktivno SLO mesto, kjer je bila alilna skupina orientirana nasproti železovega atoma v aktivnem SLO mestu. Predvidevajo, da je lipofilna interakcija med ligandom in encimom odgovorna za inhibicijo encimske aktivnosti.

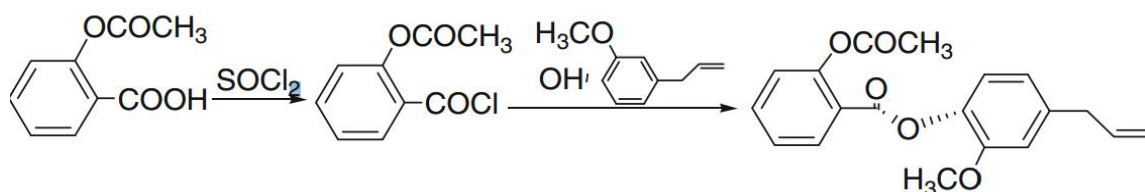
Ester 4-alil-2-metoksifenil-1-admantankarboksilat je bil edini, ki je izkazal SLO inhibicijo ($IC_{50} = 17 \text{ nM}$) in 15 μM HLOb selektivno inhibicijo v primerjavi z 15 μM HLOa (34).



Slika 4: Sidranje 4-alil-2-metoksifenil-1-admantankarboksilata v SLO mesto, aminokisline so obarvane z zeleno in modro barvo (34).

Aspirinevgenol ester

Kitajski raziskovalci so želeli s sintezo estra združiti terapevtske učinke acetilsalicilne kisline in evgenola in zmanjšati neželene učinke med tema dvema spojinama. Kemično reaktivna karboksilna skupina acetilsalicilne kisline in hidroksilna skupina evgenola sta odgovorni za strukturno nestabilnost ter pojav resnih neželenih učinkov. Ti neželeni učinki so gastrointestinalne poškodbe, iritabilnost in alergijske reakcije zaradi občutljivosti na oksidacijo. Takšen ester (AEE) bi tako lahko imel manj neželenih učinkov, večjo terapevtsko učinkovitost in kemijsko stabilnost. Reakcijska shema nastanka tega estra je prikazana na sliki 5 (35).



Slika 5: Sinteza aspirin evgenol estra (35).

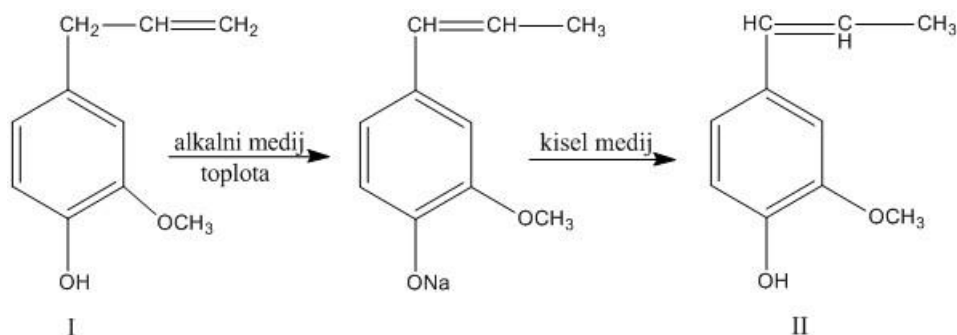
Za kontrolo so uporabili acetilsalicilno kislino in evgenol. Imeli so sedem skupin, v vsaki je bilo 10 miš. Pred terapijo je bila mišim predpisana absolutna 12 urna dieta brez dostopa do vode.

Odmerek ul'inkovine je bil razdeljen na dva dela in vsak apliciran s peroralno gavačo v miši na 6 ur. Določili so akutno toksičnost $LD_{50} = 10,937 \text{ g/kg}$ estra AEE v miših. Končni rezultati so pokazali, da je bila toksičnost AEE estra manjša od obeh kontrol, za 0,02x od acetilsalicilne kisline in 0,27x od evgenola. Ugotovili so, da ima ester podobne protivnetne, analgetične in antipiretične učinke kot kontroli acetilsalicilna kislina in evgenol. Razlika je bila v tem, da so ti terapevtski učinki v primerjavi s kontrolama trajali dalj časa (35).

1. 8. IZOEVGENOL

Poleg evgenola se v eteričnih oljih (npr. v ylang-ylangu, muškarnem oreščku, champaki) nahaja tudi njegov izomer izoevgenol, vendar ne kot glavna komponenta. Spojina je fenilpropen oziroma natančneje 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il) fenol. V molekularni strukturi se od evgenola razlikuje v poziciji dvojne vezi v alilni stranski verigi. Lahko se pojavlja v obliki cis (Z), trans (E) ali kot mešanica obeh izomerov. Komercialni izoevgenol je sicer v obliki mešanice izomerov, kjer prevladuje oblika trans zaradi boljše termodinamične stabilnosti (4, 32).

Je bistra, viskozna tekočina, rahlo rumene barve z vonjem po klinčkah. V primerjavi z evgenolom ima malo močnejši in bolj slahek vonj. Izjema je trans izomer, ki je kristalne oblike z bolj cvetličnim ter za nianso manj pekočim vonjem od cis izomera. Sintetično ga lahko pridobivamo iz evgenola s segrevanjem natrijeve ali kalijeve soli evgenola pri povišani temperaturi, kot je prikazano na sliki 6. Izomerizacijo lahko izvedemo tudi katalitično v prisotnosti rutenija ali rodija. Izvedene so bile še sinteze z gvajakolom kot izhodno spojino. Ker ima izoevgenol izjemno visok refraktivni indeks in specifično težo, lahko njegovo nastajanje zasledujemo v reakcijski zmesi z določanjem teh fizikalnih konstant (32).



Slika 6: Reakcija izomerizacije evgenola v alkalnem mediju pri segrevanju; I-evgenol, II-izoevgenol (32).

S katalitično hidrogenacijo izoevgenola lahko dobimo dihidroevgenol, ki ga pogosto dodajajo v parfumi zaradi osvežujočega in cvetličnega vonja. Z oksidacijo izoevgenola (kataliza s kobaltovim porfirinom) so včasih pridobivali komercialni vanilin, in sicer za potrebe izdelave slaščic pa tudi za uporabo v kozmetični industriji (4).

1.8.1. Uporaba izoevgenola

Kot evgenol se tudi izoevgenol in številni njegovi derivati nahajajo na GRAS seznamu. Veliko se ga uporablja v industriji parfumov (sintetična parfumska olja), predvsem v velikem številu parfumov s cvetličnim vonjem, ki temeljijo na uporabi klinčkov in nageljnov, najdemo pa ga tudi v orientalskih parfumi. V manjših količinah se ga dodaja v arome in prestrukturirana eterična olja (4).

1.8.2. Toksičnost izoevgenola

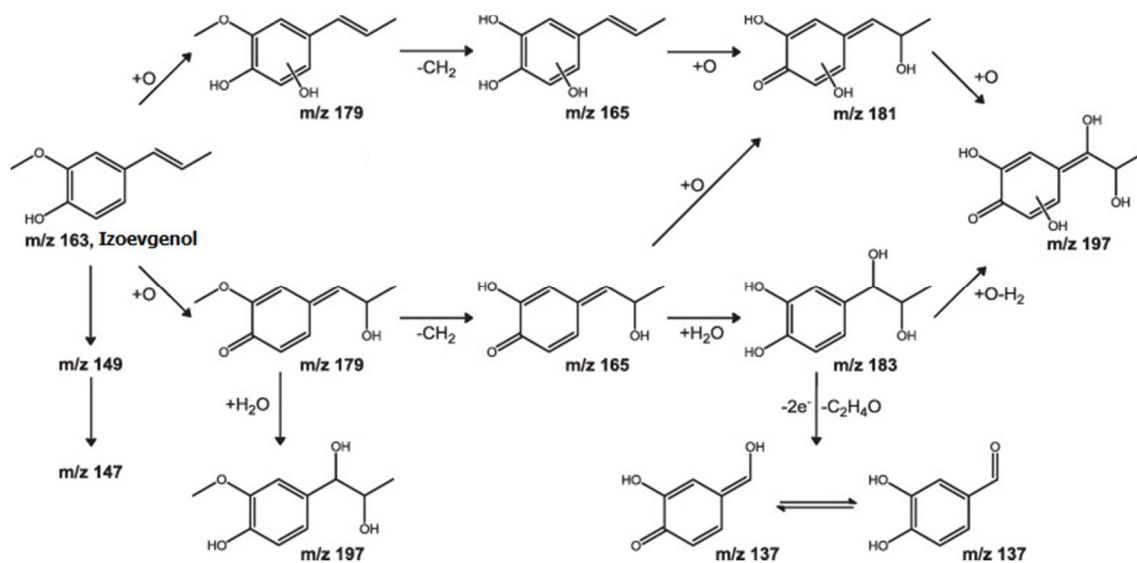
Evropska regulacija o klasifikaciji, označevanju in pakiranju kemijskih snovi in pripravkov (znana kot CLP regulacija No. 1272/2008) je izoevgenol uvrstila v 5 skupin. Je kožni senzitizer 1A ali 1B kategorije in škodljiv (H317), lahko povzroči preobčutljivostne reakcije; povzroči lahko akutno toksičnost 4. kategorije in nizka toksičnost (H302 in H312), škodljiv ob zaužitju ali ob prekomerni uporabi na koži; kožni iritant 2. kategorije in škodljiv (H315) in kot očesni iritant 2. kategorije in škodljiv (H319), lahko povzroči resne poškodbe (36). V različnih študijah so ocenjevali njegovo genotoksičnost, toksičnost ob ponovljivih odmerkih, razvojno toksičnost, reproduktivno toksičnost, lokalno respiratorno toksičnost, fototoksičnost ter njegovo okoljsko varnost. Na podlagi rezultatov so zaključili, da spojina ne izkazuje genotoksičnosti in fototoksičnosti/fotoalergenosti. Na miših so opravili 13-tedensko študijo subkronične toksičnosti s peroralno gavo. Opravili so preizkus toksičnosti pri ponavljajočih odmerkih, kjer so opazovali vsako fiziološko, anatomsko ali patološko spremembo. Določili so NOA(E)L odmerek 37,5 mg/kg/dan brez pojava neželjenih učinkov. Pri odmerku 75 mg/kg/dan in višje so opazili histopatološke spremembe jeter in razvoj jetrnega tumorja pri miših samčih (37). Preizkušali so tudi njegovo kožno senzitivizacijo preko »in chemico« evaluacije metabolizma preko kože s pomočjo instrumentalnih pristopov, vključujoč elektrokemijo združeno s tekočinsko kromatografijo in masno spektrometrijo.

Metodo elektrokemije so uporabili za elektrokemijsko tvorbo oksidativnih produktov (kinoni, kinon-metidi) evgenola in izoevgenola, medtem ko so s pomočjo masne spektrometrije potrdili takšne produkte. Z uporabo tekočinske kromatografije so, ob raziskovanju izoliranih aduktov, podali oceno o mehanizmu oksidacije, ki se lahko zgodi v koži.

Senzitizacijo naže kože povzroči modifikacija proteinov, lociranih v koži. Po oksidativni aktivaciji lahko tako evgenol in izoevgenol sprožita proces modifikacije in s tem proces senzitizacije. Ker je izoevgenol bolj elektrokemijsko reaktiven, tvori različne oksidativne produkte od evgenola. Evgenol je po O-demetilaciji tvoril kinonske in kinon-metidne produkte, prisoten pa je bil tudi oksidativni razpad stranske verige. Za razliko od evgenola so pri izoevgenolu identificirali še hidroksilirane O-demetilirane produkte.

Na sliki 7 je prikazan predpostavljen oksidativni metabolizem za izoevgenol. Kinoni in kinon-metidi so tisti reaktivni intermediati, ki najprej reagirajo s proteini kože (22, 38). Za ujetje teh reaktivnih produktov so uporabili glutation in protein •-laktoglobulin A. Slednji je uspešno prestregel nezaželene stranske produkte evgenola in izoevgenola po elektrokemijski oksidaciji.

V primerjavi z evgenolom pa je izoevgenol tvoril še dva dodatna adukta, ki sta kasneje reagirala z glutationom. Na podlagi tega so prišli do sklepa, da je izoevgenol tvoril več reaktivnih produktov kot evgenoli, ki so reagirali z glutationom in proteini. To je vzrok za njegovo večje tveganje pri razvoju senzitizacije na koži (38).



Slika 7: Oksidativni metabolizem izoevgenola na podlagi elektrokemijske tvorbe oksidativnih produktov (38).

2. NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo sintetizirali različne estre iz dveh dižav, evgenola in izoevgenola ter nabora naslednjih kislin ali njihovih kislinskih kloridov: heksanojska kislina, 10-undekenojska kislina, 3-klorosulfonilbenzojska kislina, 3-bromobenzojska kislina, 3-nitrobenzojska kislina, benzoil klorid, dekanol klorid, 3-(klorometil)benzoil klorid, 4-(klorometil)benzoil klorid, 4-cianobenzoil klorid in 2-acetoksiacetil klorid.

S pomočjo podatkovne zbirke znanstvenih člankov Pubmed in kemijske podatkovne baze SciFinder Scholar smo sestavili izbor še znanih, sintetiziranih in ovrednotenih estrov evgenola in izoevgenola. S pregledom kemikalij na Katedri za farmacevtsko kemijo smo pripravili seznam dosegljivih različnih kislinskih kloridov in aromatskih ter alifatskih karboksilnih kislin, s katerimi bi lahko tvorili nove, še neznane estre z obema alkoholoma.

Kot standardna in primerjalna estra smo izbrali 4-alil-2-metoksifenilbenzoat in 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilbenzoat, ki ju bomo najprej sintetizirali po še znanem predpisu, objavljenem v literaturi (33). Pripravo teh spojin bomo izvedli po postopku esterifikacije oziroma O-aciliranja evgenola in izoevgenola s kislinskim kloridom, in sicer benzoil kloridom v vodnem mediju z dodatkom baze. Nadaljevali bomo s sintezo estrov s heksanojsko kislino in 10-undekenojsko kislino. Karboksilne kisline pod običajnimi pogoji slabše reagirajo kot elektrofil, saj je OH skupina slabo izstopajoča skupina. Z dodatkom aktivatorjev karboksilnih kislin ali tako imenovanih sklopitvenih reagentov (coupling reagents) selektivno aktiviramo karboksilno kislino v intermediate, ki v nadaljevanju reagirajo z alkoholom ali aminom. Zaželi bomo s široko uporabnim TCT (2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin) sklopitvenim reagentom, ki se primarno bolj uporablja za tvorbo amidov, vendar je prav tako učinkovit za tvorbo estrov. V primeru slabše aktivacije karboksilne kisline s pomočjo tega sklopitvenega reagenta bomo namesto TCT uporabili TBTU (O-[benzotriazol-1-il]-N,N,N',N'-tetrametiluraniumtetrafluoroborat) metodo. Pri kislinskih kloridih bomo uporabili enak predpis kot za sintezo 4-alil-2-metoksifenilbenzoata. V nalogi bomo skušali najti optimalen postopek za pripravo estrov z izhodnima alkoholoma. V primeru slabše reaktivnosti pod izbranimi pogoji bomo poskusili izvesti reakcije v brezvodnem diklorometanu z dodatkom baze (TEA ali trietilamin). Za vsako kislino in kislinski klorid bomo sintetizirali dva estra, kjer bomo kot alkohol uporabili evgenol oziroma izoevgenol, tako da bomo lahko primerjali medsebojno reaktivnost in fizikalno kemijske lastnosti nastalih spojin. Na koncu bomo preverili, kako se estri v primerjavi z izhodnima alkoholoma razlikujejo v organoleptičnih lastnostih. Vrednotili bomo topnost, izgled, barvo in vonj.

3. MATERIALI IN METODE

3. 1. Materiali

Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali kemikalije proizvajalcev Merck, Sigma Aldrich, Fluka, Acros organics, Panreac. Slednji so bili takšne čistosti, kot je bilo navedeno s strani proizvajalca (najmanj 95 % čistota).

Ekstrakcijske raztopine smo pripravili sami, razen nasičenih raztopin (NaCl, NaHCO₃) in brezvodnih topil, ki so že bili pripravljene po standardnem postopku v laboratoriju Farmacevtske kemije.

Risanje in poimenovanje spojin

Pri risanju in poimenovanju spojin smo uporabili program ChemBioDraw Professional 15.1 (PerkinElmer). S podatkovno bazo Scifinder Scholar 1.0 (CAS) smo poiskali reakcijske sheme in že znane oziroma sintetizirane spojine.

Laboratorijska oprema:

- analitska tehtnica Mettler Toledo AG245 (Mettler Toledo, Ljubljana),
- Büchi Rotavapor R-114, (Büchi Labortechnik, Ljubljana),
- UV svetilka CAMAG UV-CABINET II (λ=254 nm/ 366 nm) (Camag, Ljubljana),
- magnetno mešalo z grelnikom IKA Labortechnik RCT basic (IKA Works, USA),
- hladilna pištola SKIL 1800 Watt (Skil, Nemčija),
- termometer za oljno kopel IKA® RTC basic (IKA Works, USA),
- varnostna kemijska obleka in rokavice,
- steklovina različnih proizvajalcev.

3. 2. Metode

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Pri naših reakcijah smo uporabljali Tankoplastno kromatografijo za sledenje poteka reakcije ter določanje prisotnosti spojine v zmesi pri izolacijah in kolonski kromatografiji. Kot stacionarno fazo smo uporabili aluminijaste plošče proizvajalca Merck, TLC Silica Gel 60 F₂₅₄.

Na pločkah je prevleka z 0,22 mm debelo plastjo silikagela z dodanim fluorescenčnim označevalcem, ki obarva podlago zelenorumenno pri 254 nm pod UV-svetlobo. Za razvijanje TLC kromatogramov smo uporabili mobilne faze, ki smo jih sami pripravili v različnih razmerjih in so navedene v naslednjem poglavju. Spojine smo detektirali pri valovni dolžini 254 nm, ki jo večina aromatskih spojin absorbira. Na koncu smo kromatograme orosili z orositvenim reagentom.

Za alkohole in fenole smo uporabili FeCl_3 , kjer železove (III) soli tvorijo obarvane komplekse s prosto OH skupino. Za detekcijo aminov smo uporabili ninhidrin, za kisline pa bromkrezolzeleno.

Kolonska kromatografija

Zmesi spojin smo očistili z metodo kolonske kromatografije, za kar smo uporabili steklene kolone različnih dimenzij. Za stacionarno fazo smo uporabili Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm proizvajalca Merck. Z nadtlakom v koloni smo pospeševali pretok mobilne faze.

Mobilne faze, ki smo jih uporabili pri TLC in kolonski kromatografiji:

- **MF 1:** etilacetat/heksan = 1/2
- **MF 2:** etilacetat/heksan = 1/3
- **MF 3:** petroleter/eter = 4/1
- **MF 4:** petroleter/eter = 2/1
- **MF 5:** DKM/metanol = 10/1

Spektroskopske metode

Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

Spektri sintetiziranih spojin so bili posneti na spektrometru Bruker UltraShieldTM Plus (Bruker) pri frekvenci 400,15 MHz na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztapljali v devteriranih topilih DMSO-d_6 in CDCl_3 . Uporabili smo program MestRec 4.8.6 (Mestrelab Research) za računalniško obdelavo spektrov.

Infrardeča spektroskopija (FTIR)

IR spektri so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR System (Perkin Elmer) na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Masna spektroskopija (MS)

Snemanje masnih in HR-MS spektrov je potekalo na spektrometru Q-TOF Premier, proizvajalca Waters-Micromass (Velika Britanija), z ESI tehniko na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Elementna analiza (CHN)

Vsebnosti elementov C, H in N so bile izmerjene za analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN (Perkin Elmer) na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Določanje tališč

Tališče spojin smo določali na talilnem mikroskopu znamke Leica Cambridge Instruments (Leica Microsystems) z ogrevalno mizico na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Tališča so nekorrigirana.

Določanje topnosti

Topnost smo določili tako, da smo približno 5 mg estra dali v penicilinko in kanili 4 kapljice določenega topila. S pomočjo steklene palčke smo previdno premešali in opazovali raztapljanje kristalnikov naše spojine. Nato smo zmes nanесли s kapilaro na TLC ploščico, posušili in preverili intenzivnost obarvanosti lise pod UV lučko. Nismo uporabili nobenega standardiziranega postopka, tako da smo pridobili le približne ocene topnosti.

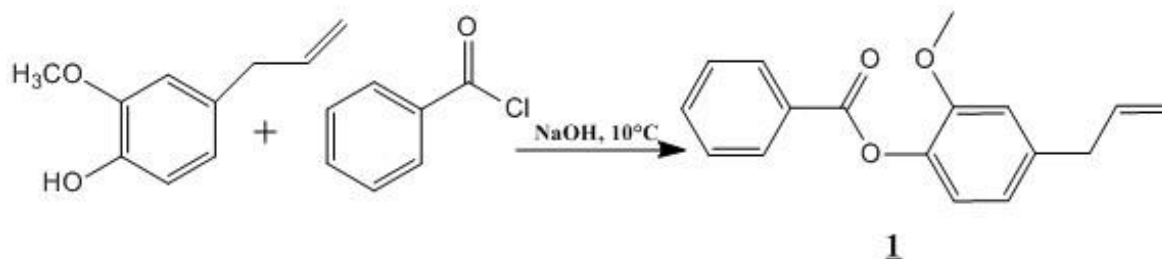
Določanje vonja

Dišavi (evgenol in izoevgenol) smo senzorno ocenili in vonj primerjali z vonji novonastalih spojin (estrov). Pri novonastalih spojinah smo vonje tudi medsebojno primerjali, da smo lahko določili morebitna odstopanja in razlike med derivati izomerov alkoholov.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4. 1. Sinteza 4-alil-2-metoksifenilbenzoata (1)

Reakcija



Postopek

Evgenol (6,09 mmol, 0,94 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bučki na ledu (10 °C). Nato benzoilklorid (6,09 mmol, 0,71 mL) dodamo pol'asi po kapljicah. Pustimo, da se zmes intenzivno meša s pomočjo magnetnega mešala, dokler popolnoma ne izgine vonj benzoil klorida (do 40 minut). Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in dvakrat speremo z mrzlo destilirano vodo. Produkt prekristaliziramo iz 96 % etanola, ga odfiltriramo s presesavanjem in posušimo v sušilniku.

Rezultati

Izgled: beli drobni svetlikajoči kristalčki

Izkoristek: 91,9 % (1,51 g) 91 % (39)

Rf: 0,48 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Tališče: 67-69 °C 66-67 °C (39)

IR (KBr, cm⁻¹): 3067, 3011, 2964, 2936, 2913, 2833, 1735, 1639, 1603, 1509, 1465, 1450, 1419, 1430, 1355, 1315, 1281, 1260, 1201, 1188, 1173, 1147, 1120, 1079, 1060, 1037, 1024, 999, 967, 803, 705.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,41 (d, 2H, J= 8 Hz, -CH₂-); 3,75 (s, 3H, -OCH₃); 5,08-5,17 (m, 2H, =CH₂); 5,96-6,06 (m, 1H, =CH); 6,82-6,84 (m, 1H, ArH); 7,01 (s, 1H, ArH-3); 7,14-7,16 (m, 1H, ArH); 7,59-7,63 (m, 2H, ArH); 7,72-7,75 (m, 1H, ArH); 8,10-8,12 (m, 2H, ArH).

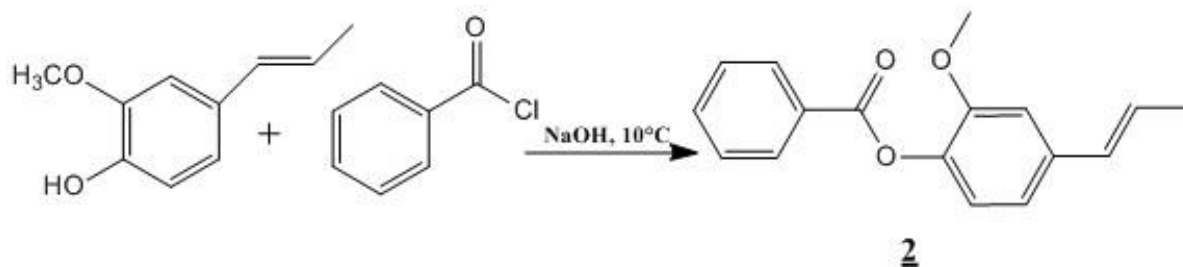
MS (ESI): 269,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunano)** = 268,31 g/mol

HR-MS: 269,1172 (izračunano: 269,1178)

Elementna sestava: C₁₇H₁₆O₃

4. 2. Sintēza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilbenzoata (2)

Reakcija



Postopek

Izoevģenol (6,09 mmol, 0,93 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bul'ki na ledu (10 °C). Nato benzoilklorid (6,09 mmol, 0,71 mL) dodamo pol'asi po kapljicah. Pustimo, da se zmes intezivno meģa s pomol'jo magnetnega meģala, dokler popolnoma ne izgine vonj benzoil klorida (do 60 minut). Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in dvakrat speremo z mrzlo destilirano vodo. Produkt prekrystaliziramo iz 96 % etanola, ga odfiltriramo s presesavanjem in posuģimo v suģilniku.

Rezultati

Izgled: beli zelo drobni kristall'ki (kot prah)

Izkoristek: 52,3 % (0,85 g) 88 % (39)

Rf: 0,61 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Talig'e: 107-109 °C 106 °C (39)

IR (KBr, cm⁻¹): 3057, 3000, 2957, 2929, 2900, 1728, 1593, 1509, 1465, 1450, 1408, 1301, 1256, 1203, 1160, 1118, 1063, 941, 870, 709, 539.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): ũ [ppm] = 1,875 (d, 3H, J= 4 Hz, -CH₃); 3,78 (s, 3H, -OCH₃); 6,34-6,47 (m, 2H, -HC=CH-); 6,98-7,01 (m, 1H, ArH); 7,13-7,15 (d, 1H, ArH); 7,17 (s, 1H, ArH-3); 7,59-7,63 (m, 2H, ArH); 7,73-7,76 (m, 1H, ArH); 8,10-8,12 (m, 2H, ArH).

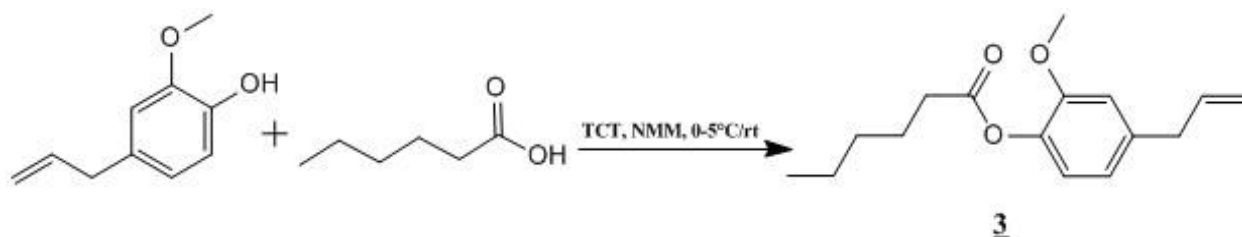
MS (ESI); 269,1 (M+H)⁺, **Mr (izral'unana)** = 268,31 g/mol

HR-MS: 269,1173 (izral'unano: 269,1178)

Elementna sestava: C₁₇H₁₆O₃

4. 3. Poskus sinteze 4-alil-2-metoksifenilheksanoata (3)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (10 mL) raztopimo 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazina (1 mmol, 139 μ L) in zmes ohladimo na ledeni kopeli. Nato dodamo *N*-metilmorfolin (3 mmol, 329 μ L) ter heksanojsko kislino (3 mmol, 0,38 mL) in pustimo mečati 2 uri na ledeni kopeli. Nato dodamo še evgenol (3 mmol, 462 μ L) in bučko vzamemo iz ledene kopeli ter pustimo mečati reakcijsko zmes pri sobni temperaturi 60 ur. Po 60 urah uparimo reakcijsko zmes in ji dodamo diklorometan (15 mL). Zmes ekstrahiramo z nasičeno raztopino NaHCO_3 , destilirano vodo in nasičeno raztopino NaCl , z vsako raztopino 3x po 10 mL. Po sušenju z natrijevim sulfatom organsko fazo uparimo in zaostanek ol'istimo s kolonsko kromatografijo. L'iste spojine nismo uspeli izolirati.

Rezultati:

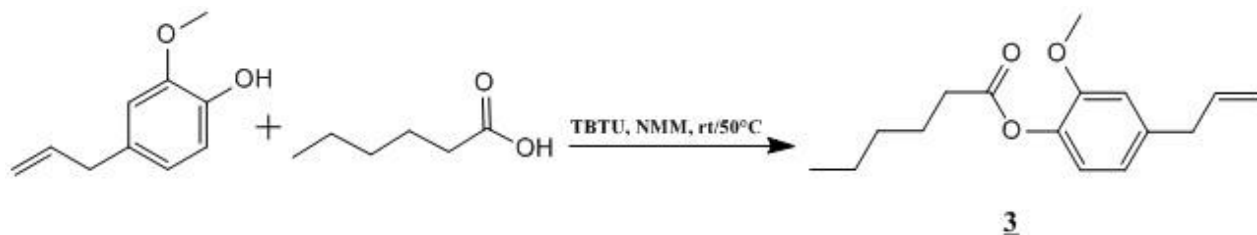
Izgled izolirane snovi: rumena viskozna snov

Izkoristek po koloni (zmes): 12,7 % (0,10 g)

R_f za spojino v zmesi: 0,45 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

4. 4. Sinteza 4-alil-2-metoksifenilheksanoata (3)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (4,5 mmol, 1,45 g) in heksanojsko kislino (4,5 mmol, 564 μ L). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (10 mmol, 1,10 mL) in pustimo mečati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mečanja dodamo še *N*-metilmorfolin (5 mmol, 549 μ L) in evgenol (3 mmol, 462 μ L), nato pa bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko prestavimo v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mečati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo in v bučko dodamo diklorometan (20 mL), da raztopimo preostanek. Izvedemo ekstrakcijo z 0,1M HCl, destilirano vodo in nasičeno raztopino NaCl, z vsako raztopino trikrat po 10 mL. Po suženju z natrijevim sulfatom organsko fazo uparimo in zaostanek očistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 3).

Rezultati:

Izgled: bistra tekočina, rahlo rumenkaste barve

Izkoristek: 35,6 % (0,28 g)

Rf: 0,62 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Tališče: /

IR (KBr, cm^{-1}): 3057, 2957, 2932, 1760, 1604, 1508, 1465, 1418, 1267, 1200, 1143, 1122, 1100, 1036, 914, 748.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0,85-0,9 (m, 3H, $-\text{CH}_3$); 1,22-1,44 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 1,53-1,67 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$); 2,19 (t, 2H, $J = 8$ Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2$); 3,37 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,74 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 5,05-5,16 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 5,92-6,00 (m, 1H, $=\text{CH}$); 6,75-6,77 (m, 1H, ArH); 6,95-6,96 (m, 1H, ArH); 6,98 (s, 1H, ArH-3).

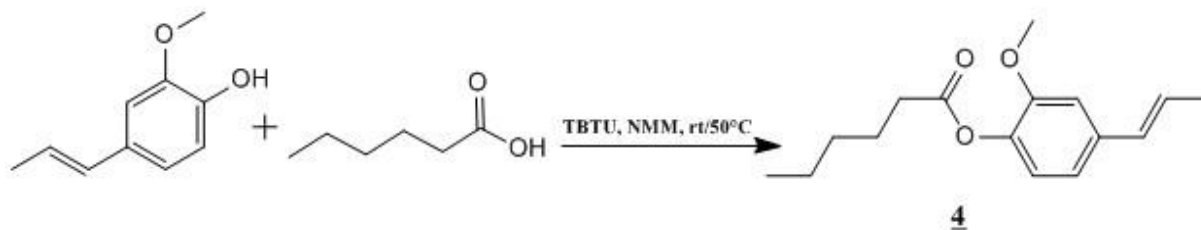
MS (ESI); 263,2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, **Mr (izračunano)** = 262,35 g/mol

HR-MS: 263,1642 (izračunano: 263,1647)

Elementna sestava: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$

4. 5. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilheksanoata (**4**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (4,5 mmol, 1,45 g) in heksanojsko kislino (4,5 mmol, 564 μ L). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (10 mmol, 1,10 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (5 mmol, 549 μ L) in izoevgenol (3 mmol, 457 μ L), nato pa bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko prestavimo v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo in zaostanek olistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 3).

Rezultati:

Izgled: bistra, prozorna tekočina

Izkoristek: 50,2 % (0,39 g)

Rf: 0,58 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Tališče: /

IR (KBr, cm^{-1}): 2957, 2932, 1760, 1600, 1508, 1465, 1414, 1377, 1300, 1261, 1201, 1139, 1120, 1099, 1034, 962, 857, 782, 738.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0,96 (t, 3H, J = 8 Hz, $-\text{CH}_3$); 1,36-1,49 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 1,73-1,84 (m, 2H, $-\text{CH}_2$); 1,90 (d, 3H, J = 8 Hz, $-\text{CH}_3$); 2,59 (t, 2H, J = 8 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2$); 3,85 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 6,20-6,26 (m, 1H, $=\text{CH}$); 6,385 (d, 1H, J = 4 Hz, $=\text{CH}$); 6,90-7,02 (m, 3H, ArH).

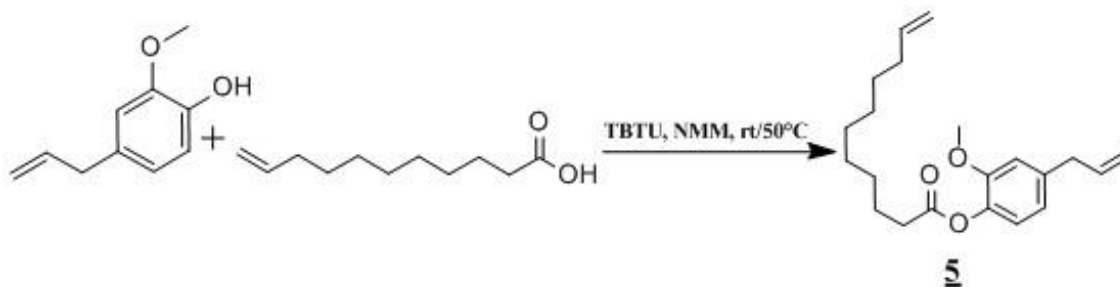
MS (ESI); 263,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, **Mr (izračunano)** = 262,35 g/mol

HR-MS: 263,1644 (izračunano: 263,1647)

Elementna sestava: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$

4. 6. Sinteza 4-alil-2-metoksifenilundek-10-enoata (5)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (4,5 mmol, 1,45 g) in 10-undekenojsko kislino (4,5 mmol, 0,83 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (10 mmol, 1,10 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (5 mmol, 549 μ L) in evgenol (3 mmol, 462 μ L), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo in zaostanek očistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 3).

Rezultati

Izgled: bistra, prozorna tekočina

Izkoristek: 41,9 % (0,42 g)

Rf: 0,65 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Tališče: /

IR (KBr, cm^{-1}): 3057, 2925, 2854, 1761, 1605, 1509, 1464, 1418, 1267, 1199, 1147, 1122, 1037, 933, 909, 849, 748.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,27-1,51 (m, 10H, $-\text{CH}_2-$); 1,72 (k, 2H, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_2-$); 2,06 (q, 2H, $J = 8$ Hz, $-\text{CH}_2-$); 2,59 (t, 2H, $J = 8$ Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2$); 3,40 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,93-5,05 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 5,07-5,17 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 5,77-5,91 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{}$); 5,91-6,04 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{}$); 6,78-6,81 (m, 2H, ArH); 6,95-6,97 (m, 1H, ArH).

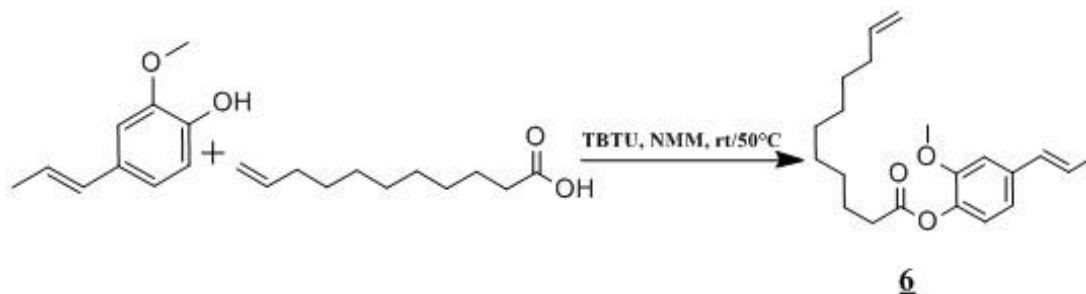
MS (ESI); 331,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), **Mr (izračunano)** = 330,47 g/mol

HR-MS: 331,2280 (izračunano: 331,2273)

Elementna sestava: $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$

4. 7. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilundek-10-enoata (**6**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (4,5 mmol, 1,45 g) in 10-undekenojsko kislino (4,5 mmol, 0,83 g). V zmes dodamo *N*-metilmorfolin (10 mmol, 1,10 mL) in pustimo mečati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mečanja dodamo še *N*-metilmorfolin (5 mmol, 549 μ L) in izoevgenol (3 mmol, 457 μ L), nato pa bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko prestavimo v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mečati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo in zaostanek očistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 3).

Rezultati

Izgled: bistra tekočina, prozorne do rahlo rumenkaste barve

Izkoristek: 30,7 % (0,30 g)

Rf: 0,62 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Tališče: /

IR (KBr, cm^{-1}): 3068, 2926, 2854, 1762, 1591, 1508, 1465, 1415, 1262, 1200, 1120, 1035, 962, 908, 857, 781.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,90 (d, 3H, J = 4 Hz, $-\text{CH}_3$); 1,27-1,51 (m, 10H, $-\text{CH}_2-$); 1,80 (k, 2H, J = 6 Hz, $-\text{CH}_2-$); 1,91 (d, 3H, $-\text{CH}_3$); 2,07 (q, 2H, J = 8 Hz, $-\text{CH}_2-$); 2,59 (t, 2H, J = 8 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2$); 3,85 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,95-5,05 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}$); 5,78-5,90 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6,15-6,27 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6,39 (d, 1H, J = 16 Hz, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6,90-7,03 (m, 3H, ArH).

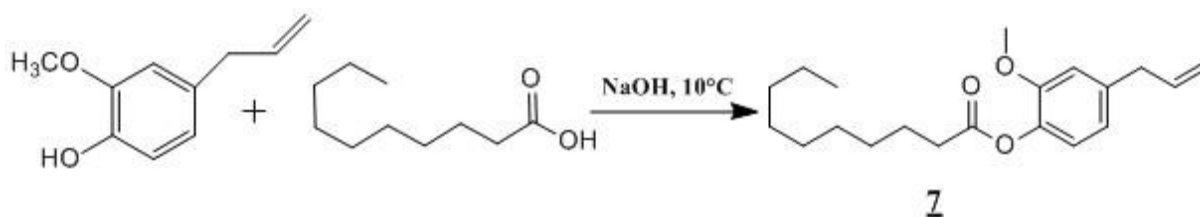
MS (ESI): 331,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, **Mr (izračunano)** = 330,47 g/mol

HR-MS: 331,2266 (izračunano: 331,2273)

Elementna sestava: $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$

4. 8. Sinteza 4-alil-2-metoksifenildekanoata (7)

Reakcija



Postopek

Evgenol (6,09 mmol, 0,94 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bulki na ledu (10 °C). Nato polasi, po kaplicah, dodamo dekanoil klorid (6,09 mmol, 1,26 mL). Pustimo, da se zmes intenzivno meša eno uro pri isti temperaturi.

Po končani reakciji topilo odparimo in v bulko dodamo diklorometan (15 mL), da raztopimo preostanek. Organsko fazo speremo z nasičeno raztopino NaHCO₃, destilirano vodo in nasičeno raztopino NaCl, z vsako raztopino trikrat po 10 mL. Po sušenju z natrijevim sulfatom organsko fazo uparimo. Dobimo oljast preostanek.

Rezultati

Izgled: bistra tekočina, rumena/zlata barva

Izkoristek: 61,3 % (1,19 g)

Rf: 0,60 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: /

IR (KBr, cm⁻¹): 3068, 2989, 2924, 2854, 1760, 1605, 1509, 1464, 1419, 1267, 1199, 1140, 1122, 1106, 1036, 994, 912, 849, 823, 748.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0,92 (t, 3H, J= 8 Hz, -CH₃); 1,23-1,49 (m, 12H, -CH₂-CH₂); 1,79 (k, 2H, J= 8 Hz, -CH₂-); 2,60 (t, 2H, J= 8 Hz, -CO-CH₂); 3,40 (d, 2H, J= 4 Hz, -CH₂-); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 5,10-5,16 (m, 2H, =CH₂); 5,94-6,03 (m, 1H, =CH-); 6,78-6,81 (m, 2H, ArH); 6,95-6,97 (m, 1H, ArH).

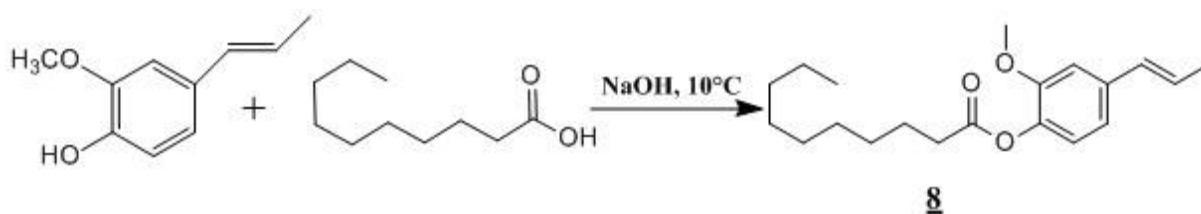
MS (ESI); 319,2 (M+H)⁺, **Mr (izračunano)** = 318,46 g/mol

HR-MS: 319,2270 (izračunano: 319,2273)

Elementna sestava: C₂₀H₃₀O₃

4. 9. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenildekanoata (**8**)

Reakcija



Postopek

Izoevgenol (6,09 mmol, 0,93 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bučki na ledu (10 °C). Nato polasi dodamo dekanol klorid (6,09 mmol, 1,26 mL) po kapljicah. Pustimo, da se zmes intenzivno meša eno uro pri isti temperaturi ter 30 minut pri sobni temperaturi. Po končani reakciji topilo odparimo in v bučko dodamo diklorometan (15 mL), da raztopimo preostanek. Organsko fazo speremo z nasičeno raztopino NaHCO₃, destilirano vodo in nasičeno raztopino NaCl, z vsako raztopino trikrat po 10 mL. Po sušenju z natrijevim sulfatom organsko fazo uparimo in preostanek olistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 3).

Rezultati

Izgled: motna tekočina, prozorne barve

Izkoristek: 29,7 % (0,58 g)

Rf: 0,65 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: /

IR (KBr, cm⁻¹): 3020, 2924, 2854, 2360, 1762, 1610, 1508, 1465, 1415, 1300, 1261, 1200, 1138, 1120, 1105, 1035, 961, 857, 781.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, J= 8 Hz, -CH₃); 1,25-1,51 (m, 12H, -CH₂-CH₂); 1,78 (k, 2H, J= 8 Hz, -CH₂-); 1,91 (d, 3H, J= 8 Hz, -CH₃); 2,59 (t, 2H, J= 8 Hz, -CO-CH₂); 3,85 (s, 3H, -OCH₃); 6,17-6,25 (m, 1H, =CH-); 6,39 (d, 1H, J= 16 Hz, =CH-); 6,88-7,03 (m, 3H, ArH).

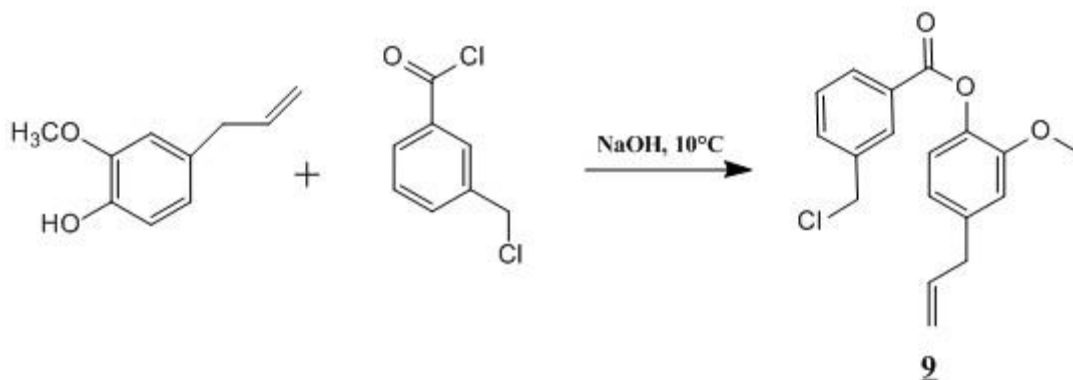
MS (ESI); 319,2 (M+H)⁺, **Mr (izračunano)** = 318,46 g/mol

HR-MS: 319,2274 (izračunano: 319,2273)

Elementna sestava: C₂₀H₃₀O₃

4. 10. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-(klorometil)benzoata (9)

Reakcija



Postopek

Evgenol (6,09 mmol, 0,94 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bučki na ledu (10 °C). Nato polasi, po kapljicah, dodamo 3-(klorometil)benzoil klorid (6,09 mmol, 0,87 mL). Pustimo, da se zmes intenzivno meša eno uro pri isti temperaturi ter 30 minut pri sobni temperaturi. Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in dvakrat speremo z mrzlo destilirano vodo. Produkt posušimo in ga prekristaliziramo iz 96 % etanola. Prekristalizacijo že enkrat ponovimo.

Rezultati

Izgled: drobni kristallčki, barva vanilije

Izkoristek: 77,6 % (1,50 g)

Rf: 0,46 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/2)

Tališče: 55-57 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3010, 2958, 2833, 2365, 1729, 1601, 1508, 1444, 1283, 1256, 1182, 1170, 1124, 1081, 1033, 921, 845, 702, 662, 573.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,44 (d, 2H, J= 8 Hz, -CH₂-); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 4,69 (s, 2H, -CH₂-Cl); 5,14-5,19 (m, 2H, =CH₂); 5,97-6,08 (m, 1H, =CH-); 6,83-6,85 (m, 2H, ArH); 7,08-7,10 (m, 1H, ArH); 7,52-7,56 (m, 1H, ArH); 7,69-7,71 (m, 1H, ArH); 8,20 (m, 1H, ArH); 8,25 (s, 1H, ArH-2').

MS (ESI); 339,1 (M+Na)⁺, **Mr (izračunano)** = 316,78 g/mol

HR-MS: 339,0770 (izračunano: 339,0764)

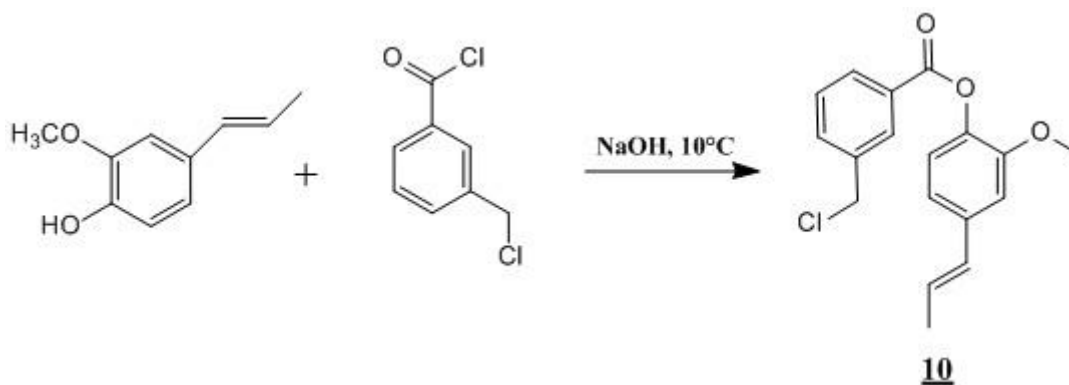
Elementna sestava: C₁₈H₁₇ClO₃

Elementna analiza za $C_{18}H_{17}ClO_3 \cdot H_2O$:

Izračunano	Ugotovljeno	è (%)	Preračunane vrednosti ob upoštevanju vode	è (%)
% C 68,25	% C 64,83	3,42	64,57	0,26
% H 5,41	% H 5,15	0,26	5,61	0,46

4. 11. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-(klorometil)benzoata (10)

Reakcija



Postopek

Izevgenol (6,09 mmol, 0,93 mL) raztopimov 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bučki na ledu (10 °C). Nato polasi dodamo 3-(klorometil)benzoil klorid (6,09 mmol, 0,87 mL) po kapljicah. Pustimo, da se zmes intenzivno meša eno uro pri isti temperaturi ter 30 minut pri sobni temperaturi. Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in dvakrat speremo z mrzlo destilirano vodo. Produkt posušimo in ga prekrizaliziramo iz 96 % etanola. Prekrizalizacijo že enkrat ponovimo.

Rezultati

Izgled: drobni kristall'ki, barva vanilije

Izkoristek: 47,9 % (0,93 g)

Rf: 0,43 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Talig'e: 85-87 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3034, 3011, 2972, 2852, 2375, 1732, 1590, 1508, 1444, 1263, 1188, 1159, 1117, 1082, 1032, 959, 755, 700, 575, 539.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,92 (d, 3H, J = 8 Hz, $-\text{CH}_3$); 3,85 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,69 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Cl}$); 6,19-6,45 (m, 1H, $=\text{CH}-$); 6,425 (d, 1H, J = 18 Hz, $=\text{CH}-$); 6,93-7,02 (m, 2H, ArH); 7,08-7,10 (m, 1H, ArH); 7,52-7,56 (m, 1H, ArH); 7,69-7,71 (m, 1H, ArH); 8,18-8,21 (m, 1H, ArH); 8,25 (s, 1H, ArH-2').

MS (ESI); 317,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, **Mr (izračunano)** = 316,78 g/mol

HR-MS: 317,0944 (izračunano: 317,0944)

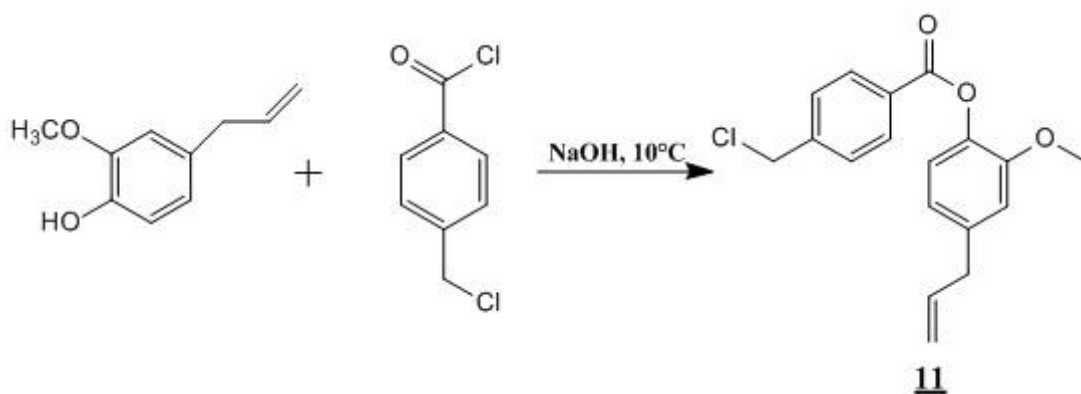
Elementna sestava: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClO}_3$

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 68,25	% C 68,34
% H 5,41	% H 5,88

4. 12. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-4-(klorometil)benzoata (**11**)

Reakcija



Postopek

Evgenol (6,09 mmol, 0,94 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bučki na ledu (10 °C). Nato polasi, ob stalnem mešanju, dodamo 4-(klorometil)benzoil klorid (6,09 mmol, 1,15 g). Pustimo, da se zmes intenzivno meša eno uro pri isti temperaturi ter 30 minut pri sobni temperaturi.

Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in dvakrat speremo z mrzlo destilirano vodo. Produkt posušimo in ga prekristaliziramo iz 96 % etanola. Prekristalizacijo še enkrat ponovimo.

Rezultati

Izgled: drobni kristallčki, bele barve

Izkoristek: 32,4 % (0,63 g)

Rf: 0,50 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 69-70 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3085, 3010, 2970, 2360, 1731, 1604, 1507, 1413, 1286, 1264, 1199, 1150, 1118, 1073, 1029, 1016, 852, 824, 704, 662.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,45 (d, 2H, J = 4 Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,82 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,67 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Cl}$); 5,12-5,18 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 5,96-6,07 (m, 1H, $=\text{CH}-$); 6,83-6,86 (m, 2H, ArH); 7,07-7,09 (m, 1H, ArH); 7,54-7,56 (m, 2H, ArH); 8,22-8,24 (m, 2H, ArH).

MS (ESI): 317,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, **Mr (izračunano)** = 316,78 g/mol

HR-MS: 317,0947 (izračunano: 317,0944)

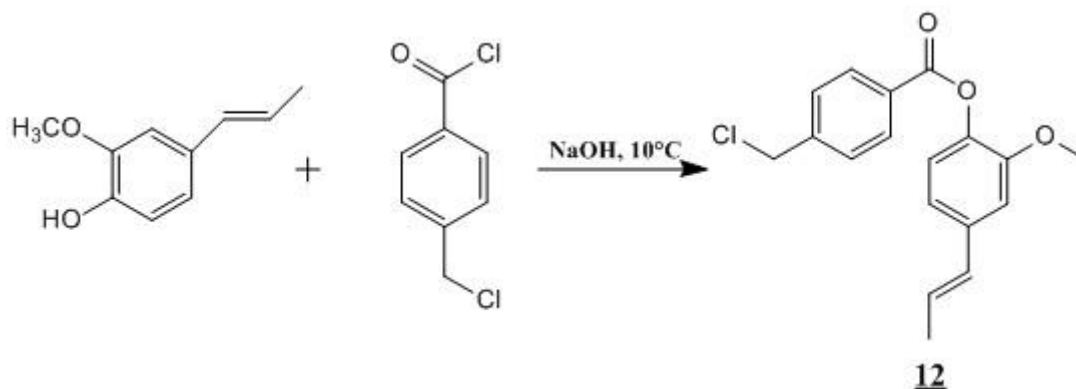
Elementna sestava: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClO}_3$

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 68,25	% C 68,63
% H 5,41	% H 5,52

4. 13. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-(klorometil)benzoata (12)

Reakcija



Postopek

Izoevgenol (6,09 mmol, 0,93 mL) raztopimo v 5 mL (13,0 mmol) 5 % NaOH v 10 mL bučki na ledu (10 °C). Nato pol'asi, ob stalnem mešanju, dodamo 4-(klorometil) benzoil klorid (6,09 mmol, 1,15g). Pustimo, da se zmes intenzivno meša eno uro pri isti temperaturi ter 30 minut pri sobni temperaturi.

Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in dvakrat speremo z mrzlo destilirano vodo. Produkt posušimo in ga prekristaliziramo iz 96 % etanola. Prekristalizacijo že enkrat ponovimo.

Rezultati

Izgled: drobni kristall'ki kot pesek, barva vanilije

Izkoristek: 44,2 % (0,85 g)

Rf: 0,51 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 120-121 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3021, 3000, 2938, 2365, 1730, 1599, 1509, 1417, 1259, 1202, 1155, 1118, 1066, 1027, 966, 873, 784, 704, 670, 634, 621.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,92 (d, 3H, J= 8 Hz, -CH₃); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 4,67 (s, 2H, -CH₂-Cl); 6,19-6,30 (m, 1H, -CH=); 6,42 (d, 1H, J= 14 Hz, =CH-); 6,94-7,03 (m, 2H, ArH); 7,07-7,10 (m, 1H, ArH); 7,54-7,56 (m, 2H, ArH); 8,22-8,24 (m, 2H, ArH).

MS (ESI); 317,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana)** = 316,78 g/mol

HR-MS: 317,0948 (izračunano: 317,0944)

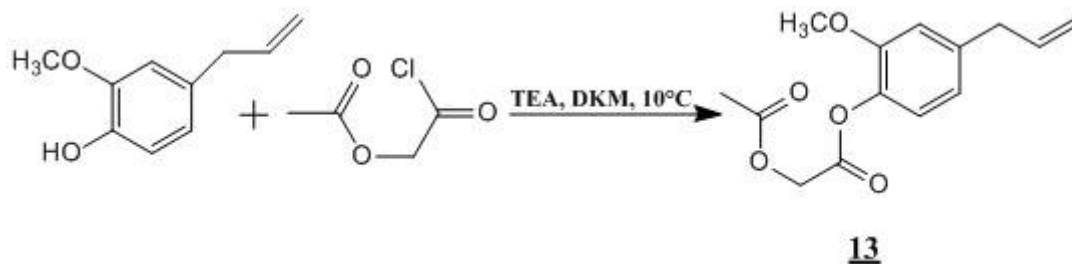
Elementna sestava: C₁₈H₁₇ClO₃

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 68,25	% C 68,39
% H 5,41	% H 5,59

4. 14. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-2-acetoksietanoata (**13**)

Reakcija



Postopek

Evgenol (6,09 mmol, 0,94 mL) raztopimo v mešanici brezvodnega diklorometana (15 mL) in trietilamina (7,00 mmol, 0,98 mL) ter ohladimo na ledeni kopeli.

2-acetoksiacetil klorid (6,09 mmol, 0,66 mL) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (2 mL) in raztopino po časi dodamo v reakcijsko mešanico po kapljicah. Pustimo mešati pri konstantni temperaturi (10 °C) 40 minut, nato vzamemo bučko iz ledene kopeli. Zmes pustimo mešati še 20 minut pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji odparimo topilo in preostanek raztopimo v dietiletru (20 mL) ter ekstrahiramo z 0,1M NaOH, destilirano vodo in nasičeno NaCl, z vsako raztopino trikrat po 10 mL. Po sušenju z Na₂SO₄, odparimo dietileter in preostanek (rumeno olje) očistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 4).

Rezultati

Izgled: bistra tekočina, prozorne do rahlo rumenkaste barve

Izkoristek: 17,7 % (0,29 g)

Rf: 0,28 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: /

IR (KBr, cm^{-1}): 3001, 2989, 2932, 1784, 1751, 1604, 1508, 1419, 1382, 1268, 1233, 1148, 1121, 1075, 1033, 916, 844, 822, 745, 601.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2,21 (s, 3H, $-\text{CO}-\text{CH}_3$); 3,40 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,83 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,91 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$); 5,13 (t, 2H, $J = 12$ Hz, $=\text{CH}_2$); 5,91-6,04 (m, 1H, $=\text{CH}-$); 6,78-6,81 (m, 2H, ArH); 6,99-7,02 (m, 1H, ArH).

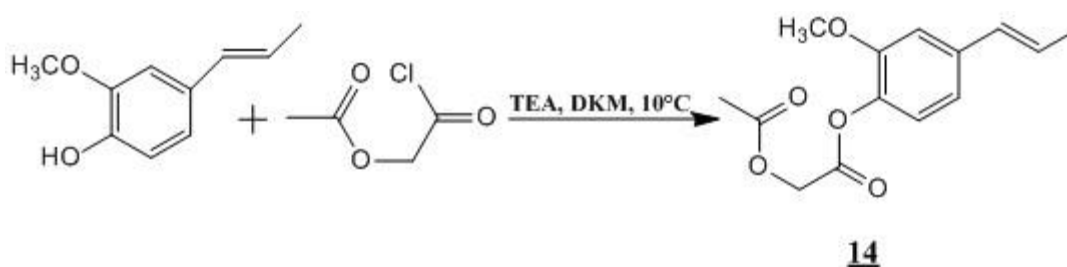
MS (ESI); 287,1 ($\text{M}+\text{Na}^+$), **Mr (izračunano)** = 264,28 g/mol

HR-MS: 287,0890 (izračunano: 287,0895)

Elementna sestava: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$

4. 15. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-2-acetoksietanoata (**14**)

Reakcija



Postopek

Izoevgenol (6,09 mmol, 0,93 mL) raztopimo v mešanici brezvodnega diklorometana (15 mL) in trietilamina (7,00 mmol, 0,98 mL) ter ohladimo na ledeni kopeli. 2-acetoksiacetil klorid (6,09 mmol, 0,66 mL) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (2 mL) in raztopino polasi dodamo v reakcijsko mešanico po kapljicah. Pustimo mešati pri konstantni temperaturi (10 °C) 40 minut, nato bučko vzamemo iz ledene kopeli. Zmes pustimo mešati še 20 minut pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji odparimo topilo in preostanek raztopimo v dietiletru (20 mL) ter ekstrahiramo z 0,1M NaOH, destilirano vodo in nasičeno NaCl, z vsako raztopino trikrat po 10 mL. Po sušenju z Na_2SO_4 odparimo dietileter in preostanek (rumeno olje) olistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 4). Postopek čiščenja ponovimo še enkrat.

Rezultati

Izgled: rahlo motna tekočina, nečrne rumenkaste barve

Izkoristek: 12,3 % (0,20 g)

Rf: 0,25 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: /

IR (KBr, cm^{-1}): 3014, 2940, 1785, 1751, 1508, 1416, 1263, 1233, 1151, 1119, 1075, 1031, 964, 843.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,90 (d, 3H, J = 8 Hz, $-\text{CH}_3$); 2,21 (s, 3H, $-\text{CO}-\text{CH}_3$); 3,85 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 4,91 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$); 6,17-6,40 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{}$); 6,38 (d, 1H, J = 16 Hz, $=\text{CH}-$); 6,90-6,94 (m, 2H, ArH); 6,99-7,01 (m, 1H, ArH).

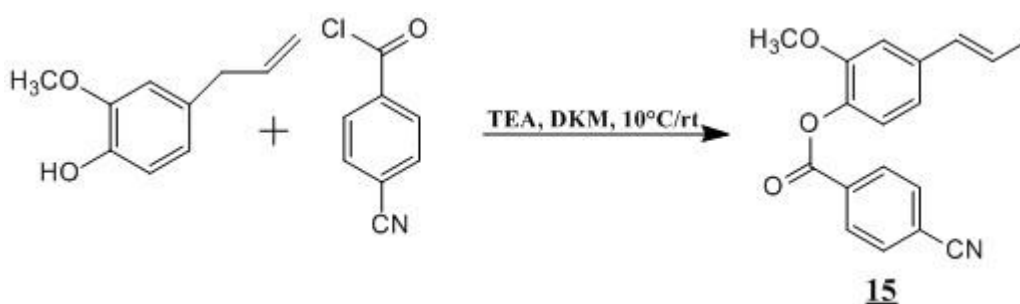
MS (ESI); 265,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, **Mr (izračunano)** = 264,28 g/mol

HR-MS: 265,1073 (izračunano: 265,1076)

Elementna sestava: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$

4. 16. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-4-cianobenzoata (**15**)

Reakcija



Postopek

Evgenol (6,09 mmol, 0,94 mL) raztopimo v mešanici brezvodnega diklorometana (15 mL) in trietilamina (7,00 mmol, 0,98 mL) ter ohladimo na ledeni kopeli. 4-cianobenzoil klorid (6,09 mmol, 1,01 g) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (15 mL) in raztopino polasi s pomočjo kapalnika dodajamo v reakcijsko mešanico. Pustimo mešati pri konstantni temperaturi (10 °C) 90 minut, nato vzamemo bučko iz ledene kopeli. Zmes pustimo mešati še 60 minut pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji izpadli produkt odfiltriramo s presesavanjem in posušimo. Produkt dvakrat prekristaliziramo iz 96 % etanola in na koncu posušimo v sušilniku.

Rezultati

Izgled: svetlikajoče tanke paličice, bele barve

Izkoristek: 59,2 % (1,06 g)

Rf: 0,40 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 94-96 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3094, 3052, 2948, 2375, 2234, 1745, 1601, 1509, 1261, 1197, 1188, 1176, 1151, 1121, 1064, 914, 862, 761, 687.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,44 (d, 2H, J = 7,8 Hz, -CH₂-); 3,84 (s, 3H, -OCH₃); 5,11-5,18 (m, 2H, =CH₂); 5,93-6,07 (m, 1H, =CH-); 6,84-6,86 (m, 2H, ArH); 7,07-7,09 (m, 1H, ArH); 7,82-7,84 (m, 2H, ArH); 8,32-8,34 (m, 2H, ArH).

MS (ESI); 293,2 (M⁺), **Mr (izračunano)** = 293,32 g/mol

HR-MS: 293,1058 (izračunano: 293,1052)

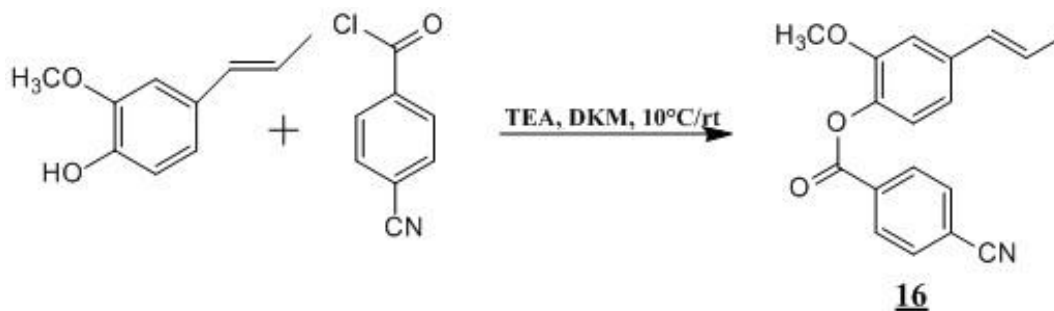
Elementna sestava: C₁₈H₁₅NO₃

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 73,71	% C 73,11
% H 5,15	% H 5,18
% N 4,78	% N 4,86

4. 17. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-cianobenzoata (**16**)

Reakcija



Postopek

Izevgenol (6,09 mmol, 0,93 mL) raztopimo v mešanici brezvodnega diklorometana (15 mL) in trietilamina (7,00 mmol, 0,98 mL) ter ohladimo na ledeni kopeli.

4-cianobenzoil klorid (6,09 mmol, 1,01 g) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (15 mL) in raztopino polasi, s pomočjo kapalnika, dodajamo v reakcijsko mešanico. Pustimo mešati pri konstantni temperaturi (10 °C) 90 minut, nato bučko vzamemo iz ledene kopeli. Zmes pustimo mešati še 60 minut pri sobni temperaturi.

Po končani reakciji izpadli produkt odfiltriramo s presesavanjem in posušimo. Produkt dvakrat prekristaliziramo iz 96 % etanola in na koncu posušimo v sušilniku.

Rezultati

Izgled: svetlikajoče tanke paličice, bele barve

Izkoristek: 41,5 % (0,74 g)

Rf: 0,40 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 150-152 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3073, 2948, 2365, 2231, 1736, 1595, 1509, 1408, 1302, 1160, 1071, 965, 862, 761, 686, 610.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,92 (d, 3H, J= 8,2 Hz, -CH₃); 3,84 (s, 3H, -OCH₃); 6,21-6,30 (m, 1H, -CH=); 6,425 (d, 1H, J= 12 Hz, =CH-); 6,96-7,01 (m, 2H, ArH); 7,08-7,10 (m, 1H, ArH); 7,82-7,84 (m, 2H, ArH); 8,32-8,34 (m, 2H, ArH).

MS (ESI); 294,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunano)** = 293,32 g/mol

HR-MS: 294,1135 (izračunano: 294,1130)

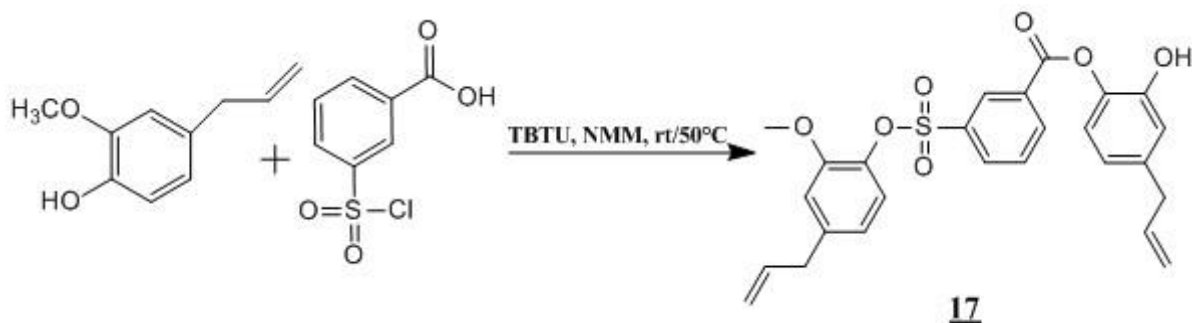
Elementna sestava: C₁₈H₁₅NO₃

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 73,71	% C 73,39
% H 5,15	% H 5,12
% N 4,78	% N 4,65

4. 18. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-((4-alil-2-metoksifenoksi)sulfonil)benzoata (**17**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (3,5 mmol, 1,12 g) in 3-klorosulfonil benzojsko kislino (3,5 mmol, 0,78 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (6,2 mmol, 0,68 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (2,3 mmol, 0,25 mL) in evgenol (3 mmol, 462 μ L), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo, produkt posušimo in ga prekrizaliziramo iz 96 % etanola. Prekrizalizacijo še enkrat ponovimo.

Rezultati:

Izgled: drobni kristallčki, oranžne barve

Izkoristek: 20,9 % (0,62 g)

Rf: 0,14 (MF 4: petroleter/eter = 2/1)

Tališče: 88-89 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3061, 3000, 2939, 2838, 2333, 1742, 1602, 1505, 1373, 1297, 1265, 1199, 1188, 1174, 1150, 1112, 1068, 1031, 908, 890, 848, 814.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,65 (d, 2H, J = 4 Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,44 (d, 2H, J = 6,6 Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,58 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 3,82 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 5,07-5,19 (m, 4H, $=\text{CH}_2$); 5,88-6,07 (m, 2H, $=\text{CH}-$); 6,87 (s, 1H, ArH-3''); 6,76-6,78 (m, 1H, ArH); 6,86 (m, 2H, ArH); 7,07-7,09 (m, 1H, ArH); 7,15-7,17 (m, 1H, ArH); 7,65-7,69 (m, 1H, ArH); 8,12-8,14 (m, 1H, ArH); 8,47-8,49 (m, 1H, ArH); 8,80 (s, 1H, ArH-2).

MS (ESI): 495,1 ($\text{M}+\text{H}^+$), **Mr (izračunano)** = 494,56 g/mol

HR-MS: 495,1471 (izračunano: 495,1478)

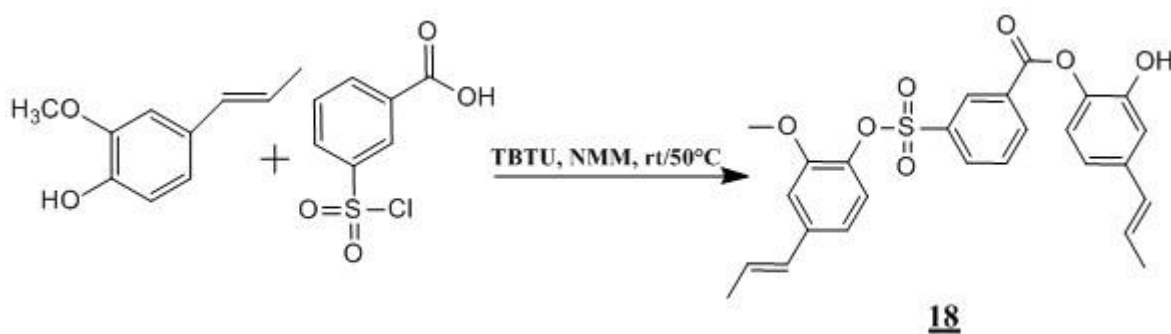
Elementna sestava: $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{S}$

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 65,57	% C 65,72
% H 5,30	% H 5,55

4. 19. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-((2-metoksi-4-prop-1-en-1-il)fenoksi)sulfonil)benzoata (18)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (3,5 mmol, 1,12 g) in 3-klorosulfonil benzojsko kislino (3,5 mmol, 0,78 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (6,2 mmol, 0,68 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (2,3 mmol, 0,25 mL) in izoevgenol (3 mmol, 457 μ L), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo, produkt posušimo in ga prekrizaliziramo iz 96 % etanola. Prekrizalizacijo še enkrat ponovimo.

Rezultati:

Izgled: drobn kristallčki, barva vanilije

Izkoristek: 20,7 % (0,62 g)

Rf: 0,12 (MF 4: petroleter/eter = 2/1)

Tališče: 98-99 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3080, 3020, 2910, 2375, 1735, 1594, 1509, 1365, 1300, 1262, 1194, 1177, 1159, 1102, 1070, 1033, 961, 891, 867, 783.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,84-1,99 (m, 6H, -CH₃); 3,58 (s, 3H, -OCH₃); 3,84 (s, 3H, -OCH₃); 6,17-6,46 (m, 4H, -CH=CH-); 6,79 (s, 1H, ArH-3''); 6,86-6,89 (m, 1H, ArH); 6,90-6,96 (m, 2H, ArH); 6,98-7,00 (m, 1H, ArH); 7,16-7,18 (m, 1H, ArH); 7,64-7,68 (m, 1H, ArH); 8,11-8,13 (m, 1H, ArH); 8,46-8,48 (m, 1H, ArH); 8,81 (s, 1H, ArH-2).

MS (ESI); 495,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunano)** = 494,56 g/mol

HR-MS: 495,1482 (izračunano: 495,1478)

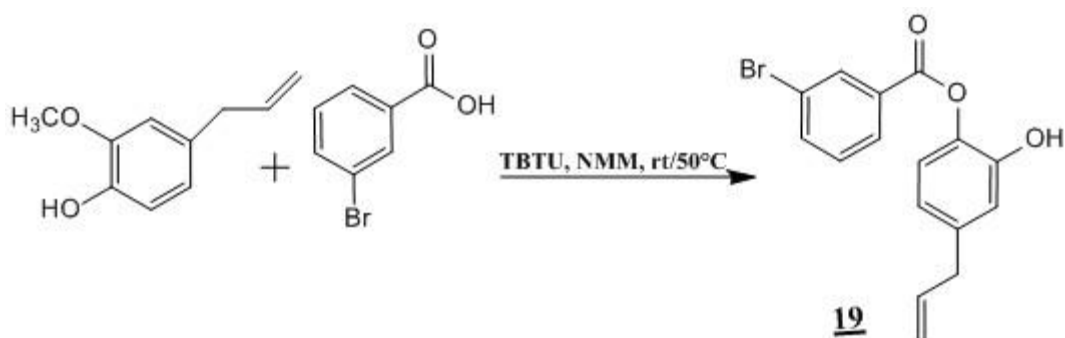
Elementna sestava: C₂₇H₂₆O₇S

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 65,57	% C 65,39
% H 5,30	% H 5,41

4. 20. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-bromobenzoata (**19**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (3,5 mmol, 1,12 g) in 3-bromobenzojsko kislino (3,5 mmol, 0,70 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (6,2 mmol, 0,68 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi.

Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (2,3 mmol, 0,25 mL) in evgenol (3 mmol, 462 μ L), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel, segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur.

Po končani reakciji topilo odparimo, produkt posušimo in ga prekrizaliziramo iz 96 % etanola. Prekrizalizacijo še enkrat ponovimo.

Rezultati:

Izgled: svetlikajolje ploščice, barva bele kave (beh barva)

Izkoristek: 59,7 % (0,62 g)

Rf: 0,50 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 49-50 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3100, 2967, 2378, 1737, 1599, 1568, 1507, 1422, 1277, 1246, 1200, 1187, 1146, 1076, 1033, 904, 741, 729, 698, 589, 550.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,435 (d, 2H, J= 4 Hz, -CH₂-); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 5,10-5,19 (m, 2H, =CH₂); 5,96-6,08 (m, 1H, =CH-); 6,83-6,86 (m, 2H, ArH); 7,07-7,09 (m, 1H, ArH); 7,39-7,41 (m, 1H, ArH); 7,76-7,78 (m, 1H, ArH); 8,15-8,17 (m, 1H, ArH); 8,38 (s, 1H, ArH-2').

MS (ESI): 347,0 (M+H)⁺, **Mr (izračunano)** =346,8 g/mol

HR-MS: 347,0276 (izračunano: 347,0283)

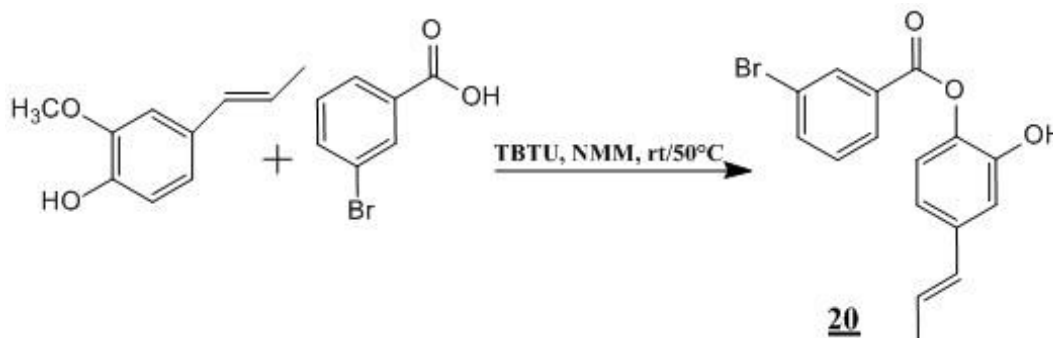
Elementna sestava: C₁₇H₁₅BrO₃

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 58,81	% C 58,97
% H 4,35	% H 4,46

4. 21. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-bromobenzoata (**20**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (3,5 mmol, 1,12 g) in 3-bromobenzojsko kislino (3,5 mmol, 0,70 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (6,2 mmol, 0,68 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (2,3 mmol, 0,25 mL) in izoevgenol (3 mmol, 457 μ L), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo, produkt posušimo in ga prekrizaliziramo iz 96 % etanola. Prekrizalizacijo še enkrat ponovimo.

Rezultati:

Izgled: zelo drobni kristallčki (kot prah), bele barve

Izkoristek: 47,6 % (0,50 g)

Rf: 0,50 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 71-73 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3100, 2978, 2945, 2389, 1734, 1592, 1511, 1424, 1409, 1298, 1276, 1244, 1199, 1158, 1118, 1076, 1028, 970, 875, 743, 729, 699, 672, 542.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,93 (d, 3H, J = 7,8 Hz, $-\text{CH}_3$); 3,85 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 6,20-6,29 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{}$); 6,425 (d, 1H, J = 12 Hz, $=\text{CH}-$); 6,96-7,00 (m, 2H, ArH); 7,07-7,09 (m, 1H, ArH); 7,42-7,44 (m, 1H, ArH); 7,77-7,79 (m, 1H, ArH); 8,15-8,17 (m, 1H, ArH); 8,38 (s, 1H, ArH-2').

MS (ESI); 347,0 ($\text{M}+\text{H}^+$), **Mr (izračunano)** = 346,8 g/mol

HR-MS: 347,0277 (izračunano: 347,0283)

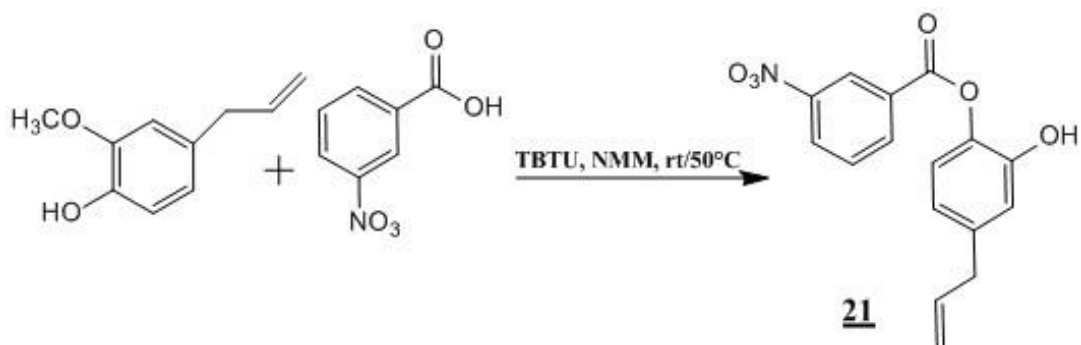
Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrO}_3$

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 58,81	% C 59,15
% H 4,35	% H 4,69

4. 22. Sinteza 4-alil-2-metoksifenil-3-nitrobenzoata (21)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (3,5 mmol, 1,12 g) in 3-nitrobenzojsko kislino (3,5 mmol, 0,59 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (6,2 mmol, 0,68 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (2,3 mmol, 0,25 mL) in evgenol (3 mmol, 462 μ L), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel segreto na 50 °C.

Zmes pustimo mešati 24 ur. Po končani reakciji topilo odparimo, produkt posušimo in ga olčistimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 2).

Rezultati:

Izgled: prozorni kristallčki, rumene barve

Izkoristek: 56,7 % (0,53 g)

Rf: 0,33 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Tališče: 68-69 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3078, 3010, 2839, 2365, 1742, 1603, 1506, 1467, 1421, 1373, 1289, 1264, 1199, 1188, 1150, 1032, 890, 848, 746, 594.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,45 (d, 2H, J = 8 Hz, $-\text{CH}_2-$); 3,84 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); 5,12-5,19 (m, 2H, $=\text{CH}_2$); 5,95-6,07 (m, 1H, $=\text{CH}-$); 6,85-6,88 (m, 2H, ArH); 7,10-7,12 (m, 1H, ArH); 7,73-7,77 (m, 1H, ArH); 8,50-8,56 (m, 2H, ArH); 9,07 (s, 1H, ArH-2').

MS (ESI): 314,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, **Mr (izračunano)** = 313,31 g/mol

HR-MS: 314,1020 (izračunano: 314,1042)

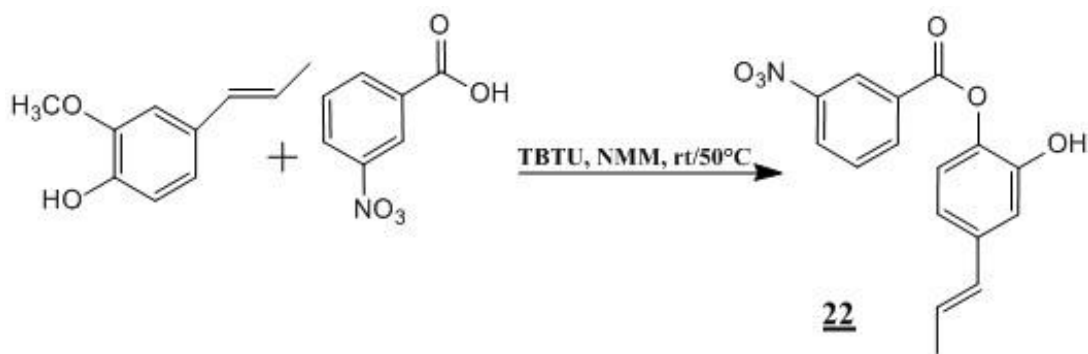
Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
% C 65,17	% C 65,23
% H 4,83	% H 4,67
% N 4,47	% N 4,49

4. 23. Sinteza 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-nitrobenzoata (**22**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo TBTU (3,5 mmol, 1,12 g) in 3-nitrobenzojsko kislino (3,5 mmol, 0,59 g). V zmes dodamo še *N*-metilmorfolin (6,2 mmol, 0,68 mL) in pustimo mešati pri sobni temperaturi.

Po dveh urah mešanja dodamo še *N*-metilmorfolin (2,3 mmol, 0,25 mL) in izoevgenol (3 mmol, 457 μL), nato pa prestavimo bučko s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko v oljno kopel, segreto na 50 °C. Zmes pustimo mešati 24 ur.

Po končani reakciji topilo odparimo, produkt posušimo in ga ol'istimo s flash kolonsko kromatografijo (MF 2). Produkt že dvakrat prekrizaliziramo iz 96 % etanola.

Rezultati:

Izgled: drobni svetlikajoči kristall'ki, sonl'no rumene barve

Izkoristek: 60,8 % (0,57 g)

Rf: 0,33 (MF 2: etilacetat/heksan = 1/3)

Talig'e: 112-114 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3125, 2938, 2917, 2354, 1743, 1618, 1593, 1526, 1507, 1466, 1349, 1289, 1249, 1198, 1122, 1058, 1031, 967, 909, 861, 711.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,92 (d, 3H, J= 8 Hz, -CH₃); 3,85 (s, 3H, -OCH₃); 6,20-6,29 (m, 1H, -CH=); 6,425 (d, 1H, J= 12 Hz, =CH-); 6,96-6,99 (m, 2H, ArH); 7,08-7,09(m, 1H, ArH); 7,39-7,41 (m, 1H, ArH) ; 7,77-7,79 (m, 1H, ArH); 8,15-8,17 (m, 1H, ArH); 8,38 (s, 1H, ArH-2`).

MS (ESI); 314,1 (M+H)⁺, **Mr (izral'unana)** =313,31 g/mol

HR-MS: 314,1021 (izral'unano: 314,1042)

Elementna sestava: C₁₇H₁₅NO₅

Elementna analiza:

Izral'unano	Ugotovljeno
% C 65,17	% C 65,05
% H 4,83	% H 4,56
% N 4,47	% H 4,50

4. 24. Rezultati organoleptičnega vrednotenja

V preglednici 2 so predstavljeni rezultati organoleptičnega vrednotenja (analize vonja in topnosti). Vonj smo senzorno ocenili tako, da smo hkrati primerjali vonj evgenola in vonj novonastalega estra evgenola (se vonj evgenola obdrži ali ne). Enako smo storili pri izoevgenolu, kjer smo najprej senzorno ocenili vonj izoevgenola in podali oceno že za novonastali ester izoevgenola. Primerjali smo vonje tudi med estrom evgenola in estrom izoevgenola, da bi lahko določili morebitna odstopanja in razlike med derivati teh dveh izomerov.

Topnost smo določili tako, da smo manjšo količino (približno 10 mg) estra zatehtali v penicilinko, dodali topilo in dobro premešali s stekleno palčko. Zaželi smo z najbolj polarnim topilom (acetonitrilom) in končali z najmanj polarnim topilom (heksanom), kjer smo za vsako topilo zatehtali novo količino estra. Topnost smo preverili že s TLC kromatografijo, kjer smo kapljico raztopljenega estra nanесли na TLC ploščo in preverili intenzivnost lise pod UV lučko. Če se je ester popolnoma raztopil, je bila intenzivnost lise pod UV lučko močnejša. Topnost smo opredelili z DA ali NE (določitev pri sobni temperaturi). Če se je ester dobro topil v topilu, smo dobili raztopino v penicilinki (enakomerna porazdelitev spojine v topilu). Raztapljanje smo pospežili z mešanjem in drobljenjem trdnih delcev (estri v trdnem stanju). Če smo dobili raztopino, smo opredelili topnost kot DA. Če se je ester kljub mešanju ter drobljenju nepopolnoma raztopil in smo dobili nehomogeno raztopino, smo topnost opredelili kot NE.

Preglednica 2: Rezultati analize (organoleptičnega vrednotenja) vonja in topnosti (A = acetonitril, ETO = etanol, AC = aceton, ETI = etil acetat, ET = eter, D = diklorometan, H = heksan)

ESTER	VONJ	A	ETO	AC	ETI	ET	D	H
1	ima že malo vonja po evgenolu, osvežilen vonj	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
2	ne obdrži vonja, po vaniliji	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
3	ne obdrži vonja, nima vonja	DA	DA	DA	NE	NE	DA	DA
4	ne obdrži vonja, nima vonja	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
5	ne obdrži vonja, nima vonja	DA	DA	DA	NE	NE	DA	DA

6	ne obdrži vonja, nima vonja	DA	DA	DA	NE	NE	DA	DA
7	vonj evgenola se obdrži, prijeten vonj	NE	NE	DA	NE	NE	DA	DA
8	ne obdrži vonja, nima vonja	NE	NE	DA	DA	DA	DA	DA
9	se malo obdrži, prijeten in sladek vonj	DA	NE	DA	DA	NE	DA	DA
10	se ne obdrži, vonj po piškotih	DA	NE	DA	DA	NE	DA	DA
11	se ne obdrži, nima izrazitega vonja	NE	NE	DA	DA	DA	DA	DA
12	se ne obdrži, po vaniliji	NE	NE	DA	DA	DA	DA	DA
13	se ne obdrži, prijeten vonj s pridihom cimeta	NE	DA	DA	NE	DA	DA	DA
14	vonj izoevgenola se obdrži, blag prijeten vonj po muškarnem oreglu	NE	DA	DA	NE	NE	DA	DA
15	se ne obdrži, nima izrazitega vonja	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
16	se ne obdrži, malo osvežilen vonj (po sveži travi)	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
17	se ne obdrži, nima izrazitega vonja	NE	NE	DA	NE	NE	DA	DA
18	se ne obdrži, sladek vonj (po beli kavi)	DA	DA	DA	DA	DA	DA	DA
19	se ne obdrži, zelo blag vonj	NE	NE	DA	NE	NE	DA	DA
20	se ne obdrži, nehen vonj po rezanem zelenju	DA	DA	DA	DA	NE	DA	DA
21	se obdrži vonj, izrazit oster vonj	DA	NE	DA	DA	DA	DA	DA
22	se ne obdrži, zelo blag vonj po vaniliji	DA	NE	DA	DA	DA	DA	DA

5. RAZPRAVA

5.1. Sinteza estrov evgenola in izoevgenola

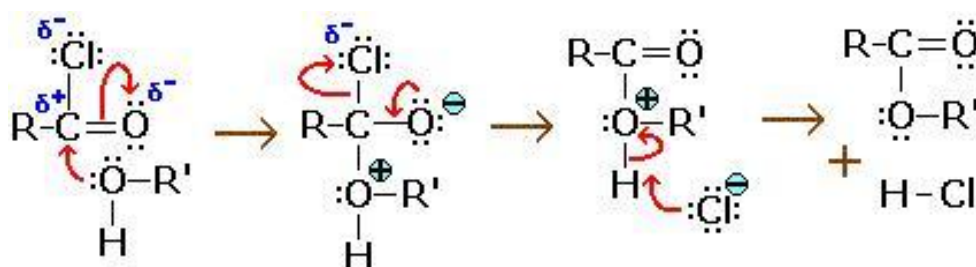
Iz evgenola in izoevgenola smo sintetizirali različne estre kot potencialne nove dišave z manjšo prooksidativno aktivnostjo ter posledilno manjšimi neželenimi učinki. S pomočjo podatkovnih zbirk in baz (Pubmed, Scifinder Scholar) smo najprej ugotovili, kateri so še znani in sintetizirani estri izbranih dveh alkoholov. Na podlagi dosegljivih kemikalij na Katedri za farmacevtsko kemijo smo sestavili seznam novih estrov, ki smo jih vse preverili preko programa Scifinder Scholar, in sicer ali so še poznani oziroma sintetizirani. Tako smo določili sintezo 20 različnih novih estrov evgenola in izoevgenola. Med kemikalijami, ki smo jih uporabili za sintezo novih estrov, smo uporabili poleg izbranih dveh alkoholov še različne aromatske in alifatske karboksilne kisline oziroma njihove kislinske kloride. Kot kislinske kloride smo uporabili benzoil klorid, dekanol klorid, 3-(klorometil)benzoil klorid, 4-(klorometil)benzoil klorid, 4-cianobenzoil klorid in 2-acetoksiacetil klorid; kot aromatske in alifatske karboksilne kisline pa smo izbrali heksanojsko kislino, 10-undekenojsko kislino, 3-klorosulfonilbenzojsko kislino, 3-bromobenzojsko kislino in 3-nitrobenzojsko kislino.

V nadaljevanju bomo opisali izvedene sintezne postopke za tvorbo novih estrov pri eksperimentalnem delu, primerjali izkoristke esterifikacije evgenola in izoevgenola ter predstavili optimizacijo sinteze posameznih estrov.

5. 1. 1. Nukleofilna acilna substitucija z evgenolom oziroma izoevgenolom in ustreznimi kisljinami ali njihovimi kislinskimi kloridi

Najprej smo želeli pripraviti po en še poznan in karakteriziran ester izoevgenola in evgenola po postopkih, ki so opisani v literaturi. Odločili smo se za benzilna estra in pri tem uporabili benzoil klorid kot kislinski klorid za sintezo primerjalnih estrov, 4-alil-2-metoksifenilbenzoat (**1**) ter 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilbenzoat (**2**). Pri tem je potekla reakcija nukleofilne substitucije. V prvi stopnji, kjer poteka adicija, pride do interakcije med nukleofilom (alkoholom) ter ogljikovim atomom karbonilne skupine. V drugi stopnji pa poteka eliminacija v dveh korakih. V prvem koraku se tvori dvojna vez med ogljikom in kisikom, medtem pa se odstrani kloridni ion. V drugi fazi poteka odstranitev vodikovega iona s pomočjo kloridnega iona, kar lahko vidimo na sliki 8 (mehanizem nukleofilne substitucije). Nastaneta ester in HCl kot stranski produkt (40).

V reakciji uporabimo tudi bazo, v primeru spojine **1** in **2** je to baza NaOH. Dodatek baze omogoči tvorbo alkoksidnega intermedata (konjugirano bazo alkohola), kar poveča nukleofilni značaj kisikovega atoma in nadaljnjo interakcijo z elektrofilnim centrom karbonilne skupine (sol na kislini). Poleg tega baza tudi nevtralizira klorovodik, ki bi lahko reverzibilno povzročil hidrolizo nastalega estra. Kot stranski produkt je nastala sol NaCl (41). Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli (10 °C), saj smo s tem povečali na začetku selektivnost kislinkega klorida in obstojnost nastalega intermedata.



Slika 2: Mehanizem nukleofilne acilne substitucije (41).

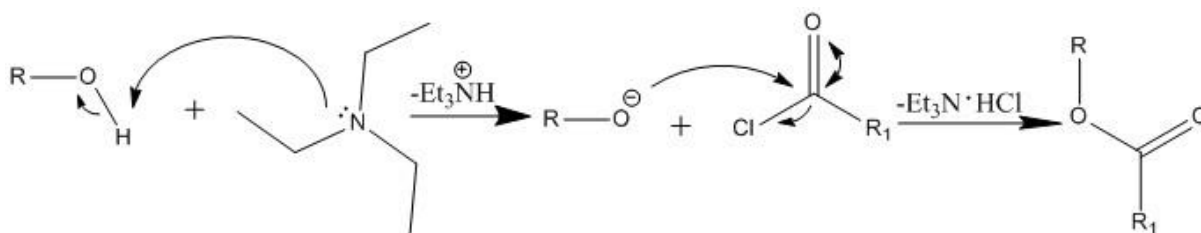
Izkoristki primerjalnih estrov **1** in **2** so bili primerljivi z izkoristki splošnih predpisov iz številnih raziskav. Izkoristek spojine **2** (ester izoevgenola) je bil slabši (52,3 %) v primerjavi s spojino **1** (91,9 %), kar bi lahko pripisali različnim reakcijskim karakteristikam zaradi strukturne izomerije (položaj dvojne vezi). Izpadlo oborino pri obeh spojinah smo na koncu prefiltrirali, dvakrat sprali z mrzlo destilirano vodo in prekrystalizirali iz 96 % etanola ter tako pridobili isti produkt.

Ester **7** smo pripravili po enakem postopku, le da smo l'as reakcije, pri isti temperaturi (10 °C), podaljšali za eno uro. Ker produkt ni izpadel, smo preostanek raztopili v diklorometanu in ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃, destilirano vodo in z nasičeno raztopino NaCl. Organsko fazo smo potem posušili in odparili do oljastega preostanka. Na ta način smo pridobili isto spojino z 61,3 % izkoristkom. Ester **8** nam je nastajal počasneje, zato smo reakcijo podaljšali za 90 minut in smo zadnjih 30 minut mešali na sobni temperaturi. Spojine nismo uspeli o'istiti v celoti z ekstrakcijo, zato smo opravili kolonsko kromatografijo. Dobili smo slab izkoristek (29,7 %), za kar je verjetno razlog nepopolna reakcija, dve metodi čiščenja in izgube pri tem. Postopek sinteze estra **8** smo ponovili pri estrih **9**, **10**, **11**, **12**. Uporabili smo enako izolacijo kot pri estrih **1** in **2**, le da smo prekrystalizacijo iz 96 % etanola še enkrat ponovili, saj smo na TLC-ju opazili še gibke sledi alkohola (spojina **9**, **11**) in določili talilne z večjim talilnim intervalom (spojini **10**, **12**).

Najboljši izkoristek smo dobili pri estru **9** (77,6 %) in najslabši pri estru **11** (32,4 %), čeprav bi lahko pričakovali obraten rezultat zaradi večje reaktivnosti para substituiranega kislinskega klorida od meta substituiranega kislinskega klorida (klorometilna skupina je aktivirajoča skupina).

Enako sintezno pot smo ponovili tudi pri estru **13**, vendar želenega produkta nismo uspeli sintetizirati. Razlog je bil najverjetneje vodni medij (5 % raztopina NaOH), ker voda lahko nastopa kot kompetitivni nukleofil in tako lahko povzroči razpad oziroma hidrolizo produkta na estra ali kislinskega klorida do nastanka karboksilne kisline.

Kislinski kloridi so dokaj občutljivi na vlago, saj lahko reagirajo z vodo do kislin, vendar so nekateri slabo reaktivni in to izkoriščamo z uporabo vode kot topilo pri slabo topnih alkoholih in kislinah v organskih topilih, ko želimo izvajati tvorbo estra. Pri estru **13** smo uporabili 2-acetoksiacetil klorid kot kislinsko komponento pri tvorbi estra. Ta kislinski klorid je dovolj reaktiven, da hitro reagira z vodo in je bil zato izkoristek esterifikacije z izbranimi alkoholoma zelo nizek. Reakcijo smo optimizirali z zamenjavo vodnega medija z brezvodnim, kjer smo tokrat uporabili naslednje reakcijske pogoje, in sicer brezvodni diklorometan in brezvodni trietilamin. Kislinski klorid smo raztopili v brezvodnem diklorometanu in ga po kapljicah dodajali raztopini alkohola, brezvodnega diklorometana in brezvodnega trietilamina. Na sliki 9 je prikazan mehanizem esterifikacije ob prisotnosti trietilamina kot baze. Reakcijsko zmes smo ob dodajanju kislinskega klorida najprej mešali pri nizki temperaturi ter po vsem dodatku še na sobni temperaturi. Produkt smo ekstrahirali, kar ni zadostovalo za odstranitev vseh nečistoč, zato smo produkt očistili še s kolonsko kromatografijo do oljastega preostanka po odparitvi mobilne faze. Izkoristek je bil precej nizek, in sicer 18 %.



Slika 3: Mehanizem esterifikacije ob prisotnosti trietilamina (TEA).

Podobno smo ravnali pri estru **14**, le da smo tu kolonsko kromatografijo še enkrat ponovili, ker smo preko NMR analize zasledili še prisotnost izhodnega alkohola (izoevgenola).

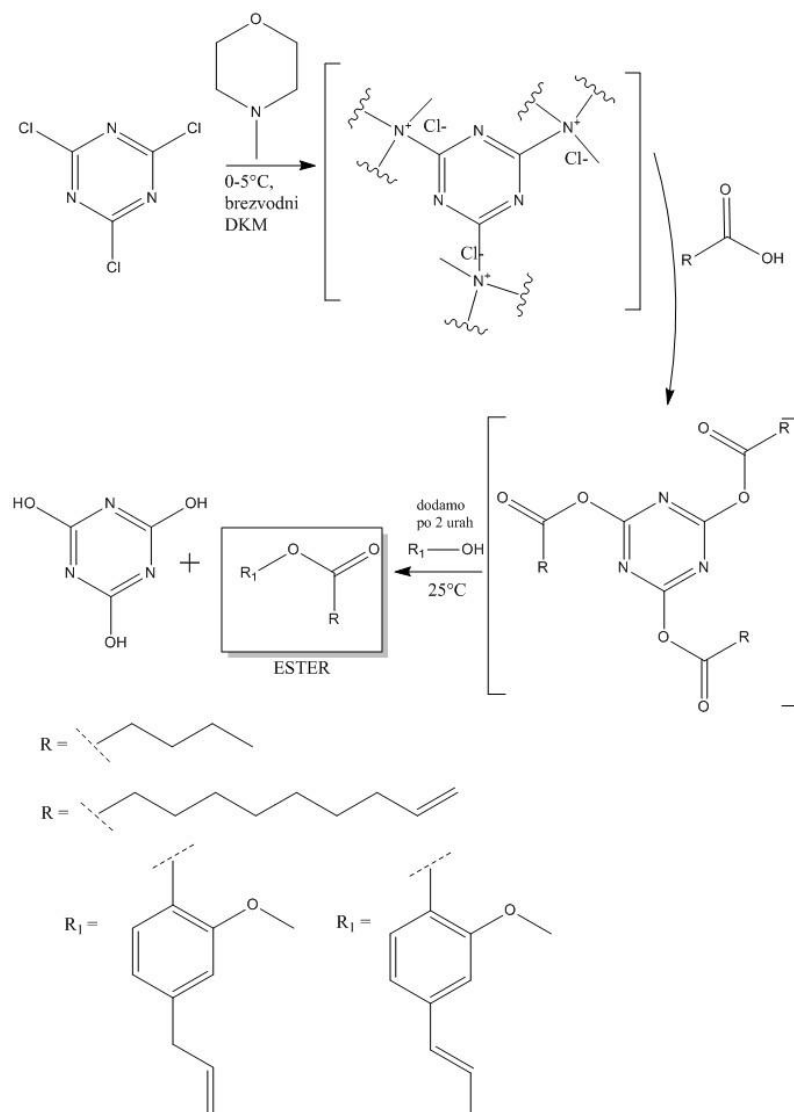
Posledilno smo dobili že nižji izkoristek kot pri sintezi estra **13**, saj je bil le 12,3 %. NMR nam je pokazal že ostanke alkohola, tako da spojino **14** nismo uspeli najboljše očistiti. Razlog temu bi bil lahko nestabilnost estra in nadaljni delni razpad tekom postopka liganja.

Izkoristek bi lahko povečali z vzpostavitvijo popolnega brezvodnega medija (npr. z argonovo atmosfero), večjim prebitkom TEA ter daljšim časom reakcije.

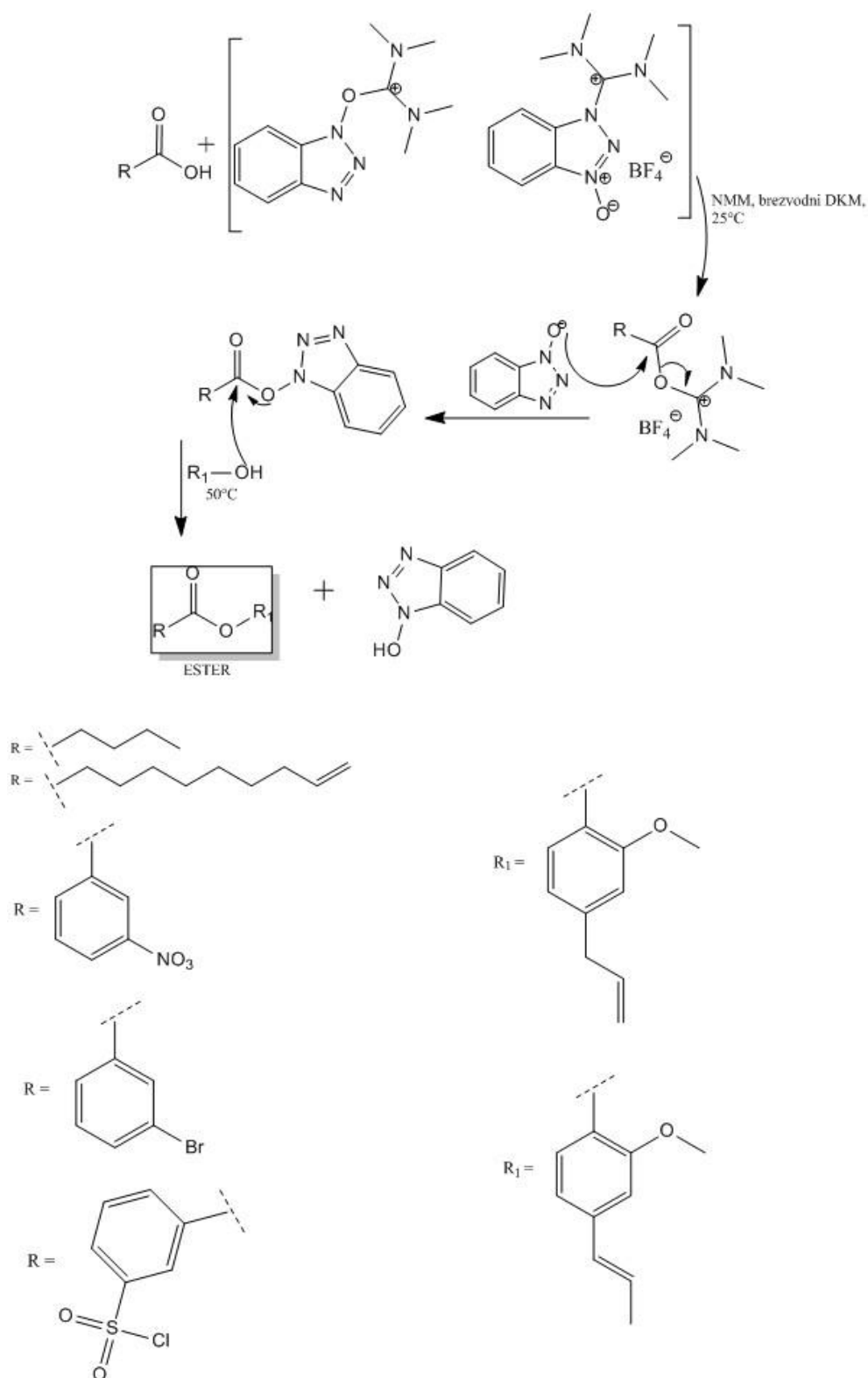
Postopek sinteze smo delno ponovili pri estru **15** in **16**, kjer smo uporabili večjo količino diklorometana za raztopitev kislinskega klorida in pripravljeno raztopino s pomočjo kapalnika dodajali v raztopino alkohola. Na nizki temperaturi smo mešali daljši čas, prav tako smo podaljšali čas mešanja tudi na sobni temperaturi. Produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz 96 % etanola, vendar sta nam talilne in NMR pokazala že sledi izhodnih alkoholov. Prekrizalizacijo smo že dvakrat ponovili. Dobljena izkoristka (59,2 % pri **15**, 41,5 % pri **16**) sta bila kljub trikratni prekrizalizaciji primerna.

5. 1. 2. Aktivacija karboksilne kisline

Karboksilne kisline so v primerjavi s kislinskim kloridom veliko manj reaktivne, zato je vedno potrebno v reakcijsko zmes, kjer kisline sodelujejo v nukleofilni substituciji z alkoholom ali aminom, dodati že sklopitveni reagent. V eksperimentalnem delu smo imeli opravka z dvema sklopitvenima reagentoma, in sicer s TCT-jem in TBTU-jem. Poleg teh dveh obstajajo tudi drugi sklopitveni reagenti, kot so dicikloheksil karbodiimid (DCC), karbonil diimidazol (CDI), benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat (BOP) in drugi. Zaradi široke uporabnosti in učinkovitosti pri tvorbi amidne vezi ter tudi estrske vezi smo se najprej odločili za cianuril klorid ali TCT sklopitveni reagent (42). Reakcijska shema za aktivacijo karboksilne kisline in tvorbo estra s TCT reagentom je prikazana na sliki 10. Gre za zelo reaktivno organsko spojino, ki se pridobiva s trimerizacijo cianogen klorida. Uporabili smo ga pri sintezi estra **3**. Kisline smo skušali aktivirati s TCT pred dodatkom alkohola. Ta del reakcije je potrebno izvajati pri nizki temperaturi (0-5 °C) zaradi nestabilnosti intermediatov (kvarterna amonijeva sol in aktiviran ester), ki pri tem nastajajo. Reakcijo smo spremljali s TLC kromatografijo, ki nam je sicer pokazala gibke sledi nastajajočega estra. Čas mešanja smo podaljšali za 72 ur, vendar estra vseeno nismo uspeli sintetizirati. Zato smo se odločili za drugo metodo, kjer smo uporabili sklopitveni reagent TBTU za aktivacijo kisline. Mehanizem aktivacije karboksilne kisline s TBTU in tvorba estrske vezi prikazuje slika 11.



Slika 4: Reakcijska shema za aktivacijo karboksilne kisline in tvorbo estra s TCT reagentom.



Slika 5: Reakcijska shema za aktivacijo karboksilne kisline in tvorbo estra s TBTU reagentom.

TBTU aktivira karboksilno kislino s pomočjo dodane baze (npr. TEA ali trietilamina, NMM ali *N*-metilmorfolina), v našem primeru smo uporabili bazo NMM. Slednji ionizira karboksilno kislino in tvori aktiviran ester z elektrofilnim delom molekule TBTU.

Naslednja stopnja omogoča nastanek aktiviranega estra z 1-hidroksibenzotriazolnim delom TBTU-ja, kjer pride do premestitve elektronov in izstopa tetrametilseľnine kot stranskega produkta. V končni fazi reakcije nastopi vezava nukleofilnega alkohola na karbonilni ogljikov atom, pri tem pa pride do izstopa 1-hidroksibenzotriazola (42). V primerjavi s TCT-jem smo tukaj reakcijsko zmes segrevali na oljni kopeli (50 °C). Po končani reakciji smo na TLC ploščici detektirali naš produkt z najvišjim *R_f*-jem in že dve prisotni neľistoti. Produkt smo ekstrahirali z 0,1 M HCl, destilirano vodo in nasiľeno NaCl. Ker metoda ľiľenja ni bila dovolj uspešna, smo prešli na kolonsko kromatografijo, ki se je izkazala za uspešna. Dobili smo ester v obliki prozornega olja, vendar z nizkim izkoristkom (35,6 %). Ta postopek sinteze smo ponovili pri estru **4**, **5** in **6**, vendar s to izjemo, da smo izpustili ekstrakcijo. Po odparitvi topila na rotavaporju smo izvedli kolonsko kromatografijo v enaki mobilni fazi kot pri estru **3**, in sicer petroleter ter eter v razmerju 4/1. Izkoristki so bili malo boljši od izkoristka pri estru **3** (50,2 % pri estru **4** in 41,9 % pri estru **5**), le pri estru **6** je bil ta nižji (30,7 %). Prisotne neľistote bi lahko bile tetrametilseľnina, 1-hidroksibenzotriazol in soli teh dveh produktov z NMM bazo.

Enako sintezo kot pri estru **3** smo izvedli tudi pri estrih **17**, **18**, **19**, **20**, **21** in **22**. Pri estrih **17**, **18**, **19** in **20** smo izpustili kolonsko kromatografijo, saj smo opazili poľasno izobarjanje produkta, tako da smo izvedli le prekristalizacijo surovega trdnega produkta iz 96 % etanola. Ker tališće po prvi prekristalizaciji ni bilo dovolj ostro (širok talilni interval), smo metodo ľiľenja že enkrat ponovili. Opazne so bile spremembe v izgledu, kajti spojine so bile po drugi prekristalizaciji veliko bolj homogene in svetlejše barve. Pri estrih **17** in **18** smo dobili dimer, kjer je prišlo tudi do nastanka sulfonatnega estra. Kot kislinski reagent smo tu uporabili 3-klorosulfonyl benzojsko kislino, ki pa ima dva elektrofilna centra. Drugi elektrofilni center predstavlja sulfonyl skupina, ki je zaradi reaktivnosti reagirala z alkoholom in tako smo dobili dimer. Z izbiro ustreznih reakcijskih pogojev pa bi lahko dobili samo substituiran produkt na karboksilni skupini.

Razmerje uporabljene kisline in alkohola je bilo ekvivalentno, zato smo v tem primeru dobili manjši, vendar priľakovan izkoristek (20,9 % za **17** in 20,7 % za **18**).

Prekristalizacijo smo izvedli tudi pri estru **22**, ker smo po meritvah tališća in NMR analizah ugotovili že sledi izhodnega alkohola. Prekristalizacijo je bilo potrebno že dvakrat izvesti. Kljub vsem teľavam smo dobili dober izkoristek, ta pa je bil 60,8 %.

Uspešno smo očiistili ester **21** s 56,7 % izkoristkom, tako da ni bilo potrebe po metodi rekristaliziranja.

Le primerjamo med seboj estre evgenola in izoevgenola, opazimo razlike v izkoristkih, ki so velinoma višji pri estrih evgenola kot pri estrih izoevgenola. Retencijski faktorji enakih estrov obeh izomerov so si zelo podobni. Pri metodah čiščenja lahko vidimo, da se estri izoevgenola nekoliko razlikujejo od estrov evgenola, saj je bilo pri velini estrov (ester **8**, **14**, **22**) potrebno še dodatno čiščenje.

Optimizacije so bile potrebne pri estru **3**, kjer smo najprej podaljšali čas mešanja pri aktivaciji karboksilne kisline s TCT reagentom. Ugotovili smo, da je za tovrstno sintezo estrske vezi primernejši TBTU reagent. Tu smo spremenili tudi postopek čiščenja, tako smo opravili še kolonsko kromatografijo. Pri estrih **17**, **18**, **19**, in **20** smo ekstrakcijo izpustili in zmanjšali količino reagentov. Pri estru **7** in **8** smo optimizirali čas mešanja, ki smo ga podaljšali za eno uro. Ker je ester **8** počasneje nastajal, smo čas reakcije pri sobni temperaturi podaljšali še za 30 minut. Tak optimiziran postopek smo ponovili pri naslednjih estrih (**9**, **10**, **11**, **12**). Pri estru **13** smo v primerjavi z estrom **7** ali **8** optimizirali postopek z zamenjavo reakcijskega medija in baze (brezvodni medij in trietilamin kot baza).

Pri naši nalogi se je bolje izkazal TBTU sklopitveni reagent za aktivacijo karboksilne kisline in tvorbo estrske vezi. TBTU je primernejši za uporabo takrat, ko želimo manj reaktiven sklopitveni reagent in je manjša možnost nastanka dodatnih stranskih produktov. Uporaba tega reagenta je bolj smiselna, če želimo dobiti aktiviran ester, medtem ko TCT pretvori kislino do reaktivnega kislinskega derivata oziroma kislinskega klorida.

5. 2. Vrednotenje organoleptičnih lastnosti

Po končanih sintezah in čiščenju produktov smo vse estre organoleptično ovrednotili, tako da smo preverili njihov vonj, barvo, izgled, tališče in topnost v različnih topilih.

Pri topnosti smo uporabili topila različne polarnosti, in sicer acetonitril, etanol, aceton, etilacetat, eter, diklorometan in heksan. Rezultate smo primerjali z evgenolom in izoevgenolom, kjer smo ugotovljali, ali se je vonj izhodnih alkoholov obdržal ali spremenil.

5. 2. 1. Izgled, tališče in topnost

Veljina pridobljenih estrov je pri sobni temperaturi oziroma v normalnih pogojih v trdnem stanju, saj smo dobili oblike svetlikajočih drobnih kristalčkov (1, 9, 11, 12, 17, 18, 21), zelo drobnih kristalčkov kot prah (2, 10, 20, 22), svetlikajočih tankih paličic (15, 16) in svetlikajočih kristalnih ploščic (19). Estri 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13 in 14 pa so viskozno olje.

Pri agregatnih stanjih estrov smo opazili, da smo dobili viskozno obliko le pri estrih, kjer smo uporabili alifatske karboksilne kisline in kislinske kloride. Trdna oblika pa je nastala le v primeru, če je bila spojina sestavljena iz dveh aromatskih obročev, torej pri sintezi estrov z aromatskimi karboksilnimi kislinami ali aromatskimi kislinskimi kloridi.

Barva evgenola je ista blede rumena ali jantarjeva, pri izoevgenolu pa je rumena barva malo svetlejša. Obarvanost estrov varira od prozorne barve pa vse do oranžne barve. Naša standardna estra 1 in 2 sta v obliki bele barve in takšen izgled smo opazili tudi pri estrih 10, 11, 15, 16 in 20. Prozorna in prozorna barva z rahlim odtenkom rumene ali zlate barve se je obdržala pri estrih viskozne oblike. Pri estrih 9, 12, 18 in 19 smo dobili barve vanilije, bele kave ali rahlo bež barve. Specifično se nam je obarval ester 17, kjer smo dobili oranžno barvo, za razliko od njegovega izomera (ester 18), ki ima barvo vanilije. Isto rumeno barvo smo opazili le pri estrih 7, 14, 21 in 22.

Pri meritvi tališč estrov (trdno stanje) smo ugotovili, da tališča niso visoka. Veljina tališč se giblje v območju od 60 °C do 100 °C. Najvišje tališče smo izmerili pri estru 16 (150-152 °C), najnižje pa pri estru 19 (49-50 °C). Če primerjamo izomere med seboj, smo pri vseh produktih opazili višje vrednosti tališč estrov z izoevgenolom kot pri estrih z evgenolom.

Topnosti alkoholov in estrov nismo določali po kakšnem standardiziranem postopku, tako da smo pridobili le približne ocene topnosti teh spojin. Pri topnosti smo najprej preverili, kako se topita evgenol in izoevgenol v določenih topilih. Topnost smo preverili tako, da smo približno 5 mg estra raztopili v penicilinki in ga nanесли s kapilaro na TLC ploščico, posušili in preverili intenzivnost obarvanosti lise pod UV lučko. Evgenol in izoevgenol sta se dobro topila v vseh topilih. Po Evropski farmakopeji bi lahko topnost obeh alkoholov opredelili kot zelo lahko topno, kar pomeni, da je potrebno manj kot 1 mL topila za raztapljanje 1 g vzorca.

Če bi potrebovali več kot 1 mL (do 10 mL) topila za raztapljanje 1 g vzorca, bi opredelili topnost kot lahko topno (43). V diklorometanu, heksanu in acetonu so se topili vsi estri. Slabše so se topili v etanolu, acetonitrilu, etru in etilacetatu. Najslabše so se topili estri 7, 17 in 19. Takšno topnost bi lahko po Evropski farmakopeji uvrstili kot zelo težko topno, kar pomeni, da je potrebno 1000-10000 mL topila za raztapljanje 1 g vzorca (43). Najbolj topni pa so estri 1, 2, 4, 15, 16 in 18, ki so se topili v vseh topilih.

Le primerjamo različne estre obeh izomerov, vidimo, da se estri izoevgenola boljše topijo kot estri evgenola. Pri estrih izoevgenola se girje estri topijo v vseh topilih (estri 2, 4, 15, 16), medtem ko se pri estrih evgenola le dva topita v vseh topilih (estra 1, 15).

5. 2. 2. Vonj

Dišavi evgenol in izoevgenol smo senzorno ocenili in vonj primerjali z vonji novonastalih estrov. Testiranje in identifikacija posameznega vonja niso enostavni, saj gre za olfaktorno prepoznavanje in percepcijo, kjer prevladuje subjektivna ocena na podlagi asociacij na določen vonj, na podlagi spominov in osebnih l'ustev (7).

S spremembo položaja posameznih kemijskih skupin v molekuli lahko specifično spodbujamo občutljive l'utilne celice olfaktorne regije, kar zaznamo kot specifično vonjavo. Položaj osmoformnih skupin (npr. alkoholna, karbonilna skupina) v molekuli dišave prispeva k specifičnemu vonju. S spremembo kemijske strukture spojine se spremeni tudi vonj same spojine. V izjemnih primerih imajo različne kemijske spojine isti vonj, kot lahko opazimo pri jasmonu in n-amilcimetnem aldehydu, ki imata oba vonj po jasminu (7).

Vonj evgenola se je obdržal pri girih estrih evgenola za razliko od estrov izoevgenola, kjer se je vonj tega alkohola obdržal le pri enem estru. Vendar je več estrov evgenola izgubilo vonj (pet estrov) kot pri estrih izoevgenola, kjer so le trije estri izgubili vonj.

Prijeten vonj evgenola se je obdržal pri estrih 1 (gibek vonj po evgenolu), 7, 9 (gibek vonj po evgenolu) ter 21 (zelo močen oster vonj). Vonj izoevgenola se je obdržal le pri estru 14. Pri estrih 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17 ter 19 nismo zaznali posebnega vonja, oziroma imajo zelo blag vonj. Pri estrih 3 in 4 smo uporabili heksanojsko kislino, ki ima značilen vonj po kozah, vendar se je ta vonj med reakcijo izgubil. Pri estrih 5 in 6 smo izvajali esterifikacijo z 10-undekenojsko kislino, ki ima bolj sladek vonj po lesu. Tudi ta vonj se je izgubil tekom reakcije. Uporabljeni kislini pri estrih 17 (3-klorosulfonilbenzojska kislina) in 19 (3-bromobenzojska kislina) imata dokaj oster in neprijeten vonj, ampak se je le ta izničil s pripravo estrov.

Za sintezo estrov 11 in 15 smo uporabili tudi 4-(klorometil)benzoil klorid in 4-cianobenzoil klorid, ki imata kot kislinska klorida specifičen iritabilen vonj zaradi reaktivne kemijske strukture. Pri estru 11 se vonj evgenola ni obdržal, prav tako ni prevzel posebnega vonja. Tekom reakcije se je reaktivnost strukture kislinskega klorida (4-(klorometil)benzoil klorid) spremenila, kar je povzročilo izgubo oziroma izničenje prijetnega vonja alkohola.

Enak rezultat smo imeli pri estru **15**, ki ni imel izrazitega vonja. Tudi tukaj se je vonj kislinskega klorida (4-cianobenzoil klorid) izgubil oziroma izničil.

Opazimo lahko, da smo izgubili vonj le pri estrih evgenola (**11**, **15**) v primerjavi z izoevgenolom (**12**, **14**). Kislinski kloridi s para substitucijo (na mestu 4 benzenskega obroča) v reakciji z evgenolom najverjetneje povzročijo izgubo vonja obeh reagentov. Pri estrih **13** in **14** pa smo uporabili 2-acetoksiacetil klorid, ki pa ima že bolj iritabilen vonj kot 4-(klorometil)benzoil klorid ali 4-cianobenzoil klorid. V tem primeru smo dobili prijetne vonje, kar pomeni, da je reaktivnost kislinskega klorida ugodno vplivala na vonj. Pri estru **13** se vonj evgenola ni obdržal, smo pa dobili zato prijeten vonj s pridihom cimeta. Vonj izoevgenola se je pri estru **14** obdržal, prevzel je tudi blag vonj po muškarnem oreščku.

Pri estrih **2** in **12** smo dobili tudi zelo prijetne sveže vonje po vaniliji. Ester **10** ima prijeten vonj po piškotih, medtem ko ima ester **18** vonj po beli kavi s pridihom vanilije. Ester **16** diši po sveži travi, pri estru **20** pa zasledimo nehen vonj po rezanem zelenju (podoben vonj kot pri estru **16**). Prijeten in sladek vonj s pridihom vanilije smo dobili pri estru **9**. Ester **13** je prevzel blag sladek vonj s pridihom cimeta, medtem ko smo pri estru **14** zasledili že blag vonj po muškarnih oreščkih. Pri estru **22** smo dobili zelo blag, vendar prijeten vonj po vaniliji.

Estra **7** in **21** sta po svojih karakteristikah glede organoleptičnih in fizikalno kemijskih lastnosti že najbolj podobna evgenolu. Vonj teh dveh estrov spominja na klinčke s sladko in pikantno noto. Razlika je le v topnosti, saj se ester **21** slabše topi le v etanolu, medtem ko je topnost estra **7** slabša v etanolu, acetonitrilu, etilacetatu in etru. Največjo podobnost z izoevgenolom pa lahko zasledimo pri estru **14**, ki je obdržal vonj alkohola in viskozno agregatno stanje z razliko v topnosti. Le ta se slabše topi v acetonitrilu, etilacetatu in etru.

Le primerjamo estre evgenola in izoevgenola, lahko vidimo, da so določene razlike v topnosti ter pri talilnih. Podobnost lahko pri večini estrov zasledimo pri agregatnih stanjih, barvah in vonjavah z določenimi niansami. Po približno 11 mesecih od prvega analiznega vrednotenja estrov smo opravili že dodatni pregled estrov in detekcijo vonja. Hranili smo jih na sobni temperaturi, v suhem in temnem prostoru, v laboratorijski omarici. Po vrednotenju smo ugotovili razliko v vonjih pri estrih **3** in **4**. Vonj se je spremenil iz nevtralnega (brez posebnega vonja) v malo sladkast vonj s pridihom klinčkov.

Opravili smo TLC kromatografijo in ugotovili sledi alkohola pri obeh estrih. Na osnovi TLC lahko zaključimo, da je med tem časom prišlo pri teh pogojih do delne hidrolize estra in da pri teh pogojih nista stabilna. Zaključimo lahko, da je potrebno estre hraniti pri nizki temperaturi v hladilniku (4 °C). Zaradi njihove občutljive narave lahko hitro pride do različnih kemijskih procesov, ki vodijo v razgradnjo estra in zato tudi do spremembe vonja.

5. 2. 3. SAR glede na vonj

V nalogi smo uporabili reagente z različno strukturno obliko molekule, nakar smo sintetizirali tudi estre z različno strukturno obliko. Ti so prevzeli podobne, drugačne vonje od prvotnih alkoholov oziroma jih ni bilo mogoče zaznati. Da bi lažje razumeli to povezavo, je smiselno vključiti SAR obravnavo v razpravo.

Gre za princip farmacevtske kemije, ki opredeljuje vpliv strukturnih sprememb v molekuli na njeno biološko delovanje in organoleptične lastnosti spojine. Če majhna sprememba v molekuli (na primer vpeljava dvojne vezi v alifatski alkohol ali aldehyd) spremeni senzorični vtis ali poudari vonj za več redov velikosti (44).

Funkcionalne skupine imajo odločilno vlogo v jakosti in karakterju dišav. Za vezavo na senzorni receptor in razvoj vonja naj bi bila odgovorna direktna dipol-dipol interakcija. Intenziteta dišave pa se poveča, če imamo v molekuli dva akceptorja vodikove vezi, ki sta blizu med sabo (Ohloffovo bifunkcionalno pravilo) (44). V naši nalogi smo tako spreminjali le eno funkcionalno skupino, in sicer hidroksilno skupino. Z vpeljavo karbonilne skupine smo neke povečali intenziteto dišave, druge pa jo skoraj izgubili. Pri estru **21** imamo nitro skupino (dva dodatna akceptorja) na meta položaju aromatskega obroča na stranski verigi in tu smo dobili oster ter prijeten vonj. Izgubo vonja smo zasledili pri estrih **3**, **4**, **5**, **6**, **11**, **15**, **17** ter **19**. Pri estrih **3**, **4**, **5**, **6** imamo nasičene alifatske verige kot alkoholni del spojin, kar bi lahko predvidoma sterilno oviralo vezavo na senzorni receptor in s tem manjšo dipol-dipol interakcijo. Estri **11**, **15**, **17**, **19** imajo kot stransko verigo aromatski obroč (oziroma dva pri estru **17**) s funkcionalno skupino na meta (**17**, **19**) ali para položaju (**11**, **15**). Tudi tu je očitno prišlo do sterilnega oviranja pri vezavi na specifičen receptor. Ker so ti estri derivati evgenola in glede na to, da imajo njihovi izomeri ohranjen vonj (estri **12**, **16**, **18**, **20**), lahko predvidevamo ugoden vpliv izomerne selektivnosti izoevgenola na vezavo dišave na olfaktorne receptorje. Če cis in trans oblika izoevgenola se razlikujeta v vonju, saj ima trans bolj cvetličan in manj pekoč vonj od cis izomera (32). Vonji uporabljenih kislinskih kloridov in kislin so se izgubili oziroma izničili, saj smo z vezavo alkohola povečali njihove sterilne in konformacijske lastnosti. Tako se je lahko novonastali ester vezal na drugo receptorsko vezavno mesto v olfaktornih celicah, kar je pripeljalo do novega vonja strukturno spremenjene spojine.

6. SKLEPI

- V okviru magistrske naloge smo uspešno sintetizirali naslednje estre evgenola in izoevgenola: 4-alil-2-metoksifenilbenzoat (**1**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilbenzoat (**2**), 4-alil-2-metoksifenilheksanoat (**3**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilheksanoat (**4**), 4-alil-2-metoksifenilundek-10-enoat (**5**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenilundek-10-enoat (**6**), 4-alil-2-metoksifenildekanoat (**7**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenildekanoat (**8**), 4-alil-2-metoksifenil-3-(klorometil)benzoat (**9**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-(klorometil)benzoat (**10**), 4-alil-2-metoksifenil-4-(klorometil)benzoat (**11**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-(klorometil)benzoat (**12**), 4-alil-2-metoksifenil-2-acetoksietanoat (**13**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-2-acetoksietanoat (**14**), 4-alil-2-metoksifenil-4-cianobenzoat (**15**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-4-cianobenzoat (**16**), 4-alil-2-metoksifenil-3-((4-alil-2-metoksifenoksi)sulfonil)benzoat (**17**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-((2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenoksi)sulfonil)benzoat (**18**), 4-alil-2-metoksifenil-3-bromobenzoat (**19**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-bromobenzoat (**20**), 4-alil-2-metoksifenil-3-nitrobenzoat (**21**), 2-metoksi-4-(prop-1-en-1-il)fenil-3-nitrobenzoat (**22**).
- Nukleofilna acilna substitucija ob prisotnosti baze se je izkazala za uspešno metodo pri tvorbi estrov s kislinskimi kloridi. Postopek sinteze estrov **1** in **2** smo modificirali s podaljšanjem mešanja reakcijske zmesi na ledeni kopeli (ester **7**) in na sobni temperaturi (ester **8**, **9**, **10**, **11**, **12**). Pri estrih **9**, **10**, **11** in **12** smo prekrizalizacijo ponovili zaradi nepopolne odstranitve alkoholov pri prvi prekrizalizaciji.
- Zaradi obľutljivosti 2-acetoksiacetil klorida na vlago smo postopek sinteze estra **13** modificirali tako, da smo zamenjali vodni medij z brezvodnim diklorometanom ob prisotnosti trietilamina kot baze z daljšim reakcijskim ľasom. Ker ekstrakcija ni bila zadostna, smo morali opraviti kolonsko kromatografijo. Reakcijski ľas osnovnega postopka, ki smo mu sledili pri pripravi estrov, smo ľe podaljšali pri estrih **15** in **16**, s to spremembo, da smo uporabili veljo koliľino diklorometana z uporabo kapalnika za enakomerno dodajanje raztopine.
- Pri reakcijah esterifikacije, kjer smo izhajali iz karboksilnih kislin in obeh alkoholov, smo najprej uporabili kot aktivator sklopitveni reagent TCT. Le ta se ni izkazal za uspeľnega pri sintezi estra **3**, zato smo se odloľili za TBTU reagent. Ugotovili smo, da je ta sklopitveni reagent optimalen za tvorbo estrov **3**, **4**, **5**, **6**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21** in **22**.

- Pretvorba izoevgenola in evgenola v njune estre je vplivala na izgled novih sintetiziranih spojin. Dobili smo estre v obliki svetlikajočih drobnih kristalčkov (**1**, **9**, **11**, **12**, **17**, **18**, **21**), zelo drobnih kristalčkov kot prah (**2**, **10**, **20**, **22**), svetlikajočih tankih paličic (**15**, **16**) in svetlikajočih kristalnih ploščic (**19**). Estri **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **13** in **14** pa so viskozna olja.
- Vpliv na spremembo barve: estri **10**, **11**, **15**, **16** in **20** so se obarvali belo kot standardna estra **1** in **2**, medtem ko smo pri estrih **9**, **12**, **18** in **19** dobili barve vanilije, bele kave ali rahlo bež barve. Le estri **7**, **14**, **21** in **22** so pridobili isto rumeno barvo.
- Vpliv na tališče: najvišje tališče smo izmerili pri estru **16**, najnižje pa pri estru **19**. Ko smo primerjali izomere med seboj, smo pri vseh produktih opazili višje vrednosti tališč estrov z izoevgenolom kot pri estrih z evgenolom.
- Vpliv na topnost: najslabše so se topili estri **7**, **17** in **19**, najboljšo topnost pa smo določili estrom **1**, **2**, **4**, **15**, **16** in **18**, ki so se uspešno topili v vseh topilih.
- Vpliv na ohranitev oziroma spremembo vonja: prijeten vonj evgenola se je obdržal pri estrih **1** (globek vonj po evgenolu), **7**, **9** (globek vonj po evgenolu) ter **21** (zelo močen oster vonj). Vonj izoevgenola se je obdržal le pri estru **14**. Pri estrih **3**, **4**, **5**, **6**, **11**, **15**, **17** ter **19** se je vonj izgubil. Sklepamo lahko, da je pri vseh estrih z izgubo vonja prišlo do sterilnega oviranja (manjša dipol-dipol interakcija) pri vezavi na specifično receptorsko mesto v olfaktornih celicah, kar je vodilo do neizrazite interpretacije vonja estrov. Z vpeljavo alifatskih verig (**3**, **4**, **5**, **6**) in aromatskih substituiranih obročev (**11**, **15**, **17**, **19**) smo spremenili konformacijo izhodnih alkoholov in prepričali njihovo prvotno vezavo na določena receptorska mesta.
- Dobili smo tudi zelo prijetne sveže vonje po vaniliji, in sicer pri estrih **2** in **12**. Ester **10** ima prijeten vonj po piškotih, ester **18** po beli kavi s pridihom vanilije, medtem ko imata estra **16** (po sveži travi) in **20** (po zelenju) nežne, naravne in osvežilne vonje. Prijetne in sladke vonje smo dobili tudi pri spojinah **9** (s pridihom vanilije), **13** (pridih cimeta), **14** (pridih muškata orežka) in **22** (bolj blag vonj po vaniliji).
- Estra **7** in **21** sta po svojih karakteristikah glede organoleptičnih in fizikalno kemijskih lastnosti še najbolj podobna evgenolu. Vonj imata po klinčkah, ki je sladek in manj pikanten.

7. LITERATURA

1. Early Use of Perfumes; http://www.fashion-era.com/perfume_history.html (dostopano 23.4.2016)
2. Smola kadilne bosvelije; <http://www.herbana.si/kadilne-smole-in-disavnice/247-kadilna-bosvelija-boswellia-carteri-smola-beyo.html> (dostopano 23.4.2016)
3. Lenochova P, Vohnoutova P, Craig Roberts S, Oberzaucher E, Grammer K, Havlíček J: Psychology of Fragrance Use: Perception of Individual Odor and Perfume Blends Reveals a Mechanism for Idiosyncratic Effects on Fragrance Choice. *PloS One*, 2012; 7: e33810
4. Surburg H, Panten J: Common Fragrance and Flavor Materials. 5. izdaja. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 137-138
5. Clarke S: Essential chemistry for safe aromatherapy. 1. izdaja. Churchill Livingstone Elsevier, London, 2002: 101-110
6. Senses of taste and smell; http://encyclopedia.lubopitko-bg.com/Senses_of_Taste_and_Smell.html (dostopano 28.4.2016)
7. Lajkovac M: Kozmetologija. 2. dopolnjena izdaja. Naklada Slap, Zagreb, 2000: 71-75, 303-308
8. Galjot T: Ocena varne uporabe dišav v kozmetičnih izdelkih. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013: 4-12
9. Mitsui T: New cosmetic science. Churchill Livingstone Elsevier, Amsterdam, 1997: 99-210
10. Salvador A, Chisvert A: Analysis of Cosmetic Products. Churchill Livingstone Elsevier, Amsterdam, 2007: 240-250
11. Pirnat V: Primerjava vsebnosti in varnosti uporabe dišav v naravnih in necertificiranih trdih milih ter gelih za prhanje. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014: 8-13
12. Pravilnik o vsebini in načinu označevanja kozmetičnih izdelkov. 2003. Uradni list RS, št. 114/03; <https://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV3869> (dostopano 28.4.2016)
13. Wolfgang R, Kindl U: Pflegekosmetik. 3. izdaja. Die Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999: 220-222
14. Označevanje kozmetičnih izdelkov; <https://www.gzs.si/lepota-kozmetike/vsebina/Varnost-jepomembna/Ozna%C4%8Dvanje-kozmeti%C4%8Dnih-izdelkov> (dostopano 23.4.2016)

15. Digave in varnost; <https://www.gzs.si/lepota-kozmetike/vsebina/Vrste-kozmeti%C4%8Dnih-izdelkov/Di%C5%A1ave/Di%C5%A1ave-in-varnost> (dostopano 28.4.2016)
16. Cosmetics Europe: Guidelines on cosmetic product labelling. 2011. V skladu z regulativo 1223/2009, The European Cosmetics Association; https://www.dweckdata.com/PIP/COLIPA_Labelling_Guidance_Dec_2011.pdf (dostopano 29.4.2016)
17. International Fragrance Association: IFRA Code of Practice. 2006; https://www.ifraorg.org/Upload/Docs/22083_GD_2009_11_03_IFRA_Code_of_Practice_Dec_06.pdf (dostopano 29.4.2016)
18. Overview of IFRA standards - 48th Amendment. 2011. 22407_ISO; <https://www.ifraorg.org/en-us/standards#.WITNZdQr11I> (dostopano 30.4.2016)
19. Opinion on The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products intended for consumers concerning Musk Xylene and Musk Ketone. 2004. SCCNFP/0817/04; https://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sccp/documents/out280_en.pdf (dostopano 31.4.2016)
20. Dodson RE, Nishioka M, Standley LJ, Perovich LJ, Green Brody J, Rudel RA: Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. Environ Health Perspect, 2012; 120 (7): 935-943
21. Scientific committee on consumer safety: Opinion on Fragrance allergens in cosmetic products. 2011. SCCS/1459/11; ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_102.pdf (dostopano 30.4.2016)
22. Tisserand R, Young R: Essential oil Safety; A Guide for Health Care Professionals. 2. izdaja. Churchill Livingstone Elsevier, London, 2014: 555-560
23. Ester; https://en.wikipedia.org/wiki/Ester#cite_note-8 (dostopano 29.4.2016)
24. Chaibakhsh N, Basri M, Anuar S.H.M, Rahman M.B.A, Rezayee M: Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 1, 2012; 1: 226-231
25. Poucher W.A: Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps: The Raw Materials of Perfumery - volume 1. 9. izdaja. Chapman & Hall, London, 1991
26. Laroque D.A, Loss R.A, Silva M.J.A, Oliveira J.V, Oliveira D, Hense H: Seleção de catalisadores e sistema reacional para a síntese de acetato de eugenila via catálise

heterogênea em sistema livre de solvente. Congresso Brasileiro de Engenharia Quimica, 2014; 1: 1001-1008

27. Janež D, Kreft S, Mlinarič A, Slanc P, Stojilkovski K: Vaje iz Farmakognozije I, Katedra za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2012

28. K. Awasthi P, C. Dixit S, Dixit N, K. Sinha A: Eugenol Derivatives as Future Potential Drugs. Journal of Pharmacy Research, 2008; 1: 215-220

29. Marin Municipal Water District Vegetation Management Plan Herbicide Risk Assessment: Chapter 6 – Clove oil (Eugenol). Draft – 1/1/2010; <https://www.marinwater.org/DocumentCenter/View/253> (dostopano 23.4.2016)

30. Material Safety Data Sheet, Eugenol 99 %. 1998. Acros Organics BVBA AC119110000; <https://www.nwmissouri.edu/naturalsciences/sds/e/Eugenol.pdf> (dostopano 30.4.2016)

31. P. Kamatou G, Vermaak I, M. Viljoen A: Eugenol – From the Remote Maluku Islands to the International Market Place; A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. Molecules, 2012; 17: 6953-6981

32. Eugenol and isoeugenol; https://www.alluredbooks.com/sample_pages/perf_flav_synt_p167_169.pdf (dostopano 29.4.2016)

33. Maia de Moraes S, Vila-Nova N.S, Bevilacqua C.M.L, Rondon F.C and others: Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014; 22: 6250-6255

34. Sadeghian H, Seyedi M.S, Saberi M.R, Arghiani Z, Riazi M: Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008; 16: 890-901

35. Li J, Yu Y, Wang Q, Zhang J, Yang Y, Li B, Zhou X, Niu J, Wei X, Liu X, Liu Z: Synthesis of aspirin eugenol ester and its biological activity. Medicinal Chemistry Research, 2012; 21: 995-999

36. Glade discreet warm spice, S.C. Johnson Italy S.r.l. 20020 Arese – Milano, Italy. 2014. Varnostni list v skladu z direktivo 1999/45/EC; https://www.arc.si/files/Glade-discreet-Warm-Spice_ARC-VL-slo.pdf (dostopano 29.4.2016)

37. Api A.M, Belsito D, Bhatia S, Bruze M and others: RIFM fragrance ingredient safety assessment, isoeugenol. Food and Chemical Toxicology, CAS Registry Number 97-54-1, 2016; 97: 49-56

38. Melles D, Vielhaber T, Baumann A, Zazzaroni R, Karst U: In chemico evaluation of skin metabolism; Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry to liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2013; 913-914: 106-112
39. Diaz-Alvarez A.E, Crochet P, Cadierno V: A general route for the stereoselective synthesis of (E)-(1-propenyl)phenyl esters by catalytic C=C bond isomerization. *Tetrahedron*, 2012; 68: 2611-2620
40. Alcohol Nomenclature;
<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/alcohol1.html> (dostopano 29. 4.2016)
41. Požgan F, Četane B: Uvod v laboratorijsko organsko kemijo. 2.dopolnjena izdaja. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2013
42. Trnovec H: Sinteza indolamidnih in dikloropirrolamidnih zaviralcev DNA giraze B. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014: 45-46
43. Council of Europe: European Pharmacopoeia. 5. izdaja. Strassbourg, 2007
44. Turin L, Yoshii F: Structure-odor relations: a modern perspective. In *Handbook of Olfaction and Gustation*. Marcel Dekker, New York, 2003