

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ANJA RIBIČ**

**SINTEZA IN VREDNOTENJE OKSIMOV IN  
AMIDOKSIMOV KOT AMFIFILNIH  
ANTIOKSIDANTOV**

**THE SYNTHESIS AND EVALUATION OF OXIME  
AND AMIDOXIME AS AMPHYPHYLIC  
ANTIOXIDANTS**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**Ljubljana, 2009**

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreze, mag. farm.

Analize NMR so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, masne analize pa na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvaljujem se Niku, sorodnikom in prijateljem, ki so verjeli vame in me podpirali, mentorju doc. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in delovni mentorici Mirjam Gosenca, mag. farm. za njihovo vsestransko pomoč ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo in na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreze, mag. farm.

Anja Ribič

Ljubljana, marec 2009

**Predsednica komisije:** prof. dr. Jana Lukač Bajalo, spec. med. biokem.

**Članica komisije:** doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

# VSEBINA

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. POVZETEK.....</b>  | <b>IV</b> |
| <b>2. ABSTRACT .....</b>   | <b>V</b>  |
| <b>3. SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>  | <b>VI</b> |
| <b>4. UVOD .....</b>   | <b>1</b>  |
| 4.1. OKSIDACIJE .....  | 1         |
| 4.1.1. Redoks reakcije.....  | 1         |
| 4.1.2. Avtooksidacije.....   | 2         |
| 4.2. RADIKALI .....  | 3         |
| 4.2.1. Posledice delovanja radikalov.....                                | 5         |
| 4.2.2. Lipidna peroksidacija .....                                       | 7         |
| 4.3. ZAŠČITA PRED RADIKALI .....   | 8         |
| 4.3.1. Zaščita z encimi .....  | 8         |
| 4.3.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD) .....                                | 8         |
| 4.3.1.2. Katalaza .....  | 9         |
| 4.3.1.3. Glutation-peroksidaza .....                                     | 9         |
| 4.3.1.4. Glutation-reduktaza .....                                       | 9         |
| 4.3.2. Zaščita z antioksidanti .....                                     | 10        |
| 4.3.2.1. Definicija, delitev in mehanizem delovanja antioksidantov ..... | 10        |
| 4.4. OKSIMI IN AMIDOKSIMI KOT ANTIOKSIDANTI.....                         | 11        |
| 4.4.1. Delovanje oksimov.....  | 13        |
| 4.4.2. Delovanje in lastnosti amidoksimov .....                          | 13        |
| <b>5. NAČRT DELA .....</b>   | <b>15</b> |
| 5.1. REAKCIJSKE SCHEME .....   | 16        |
| 5.1.1. Reakcijska shema I: amidoksimi.....                               | 16        |
| 5.1.2. Reakcijska shema II: oksimi .....                                 | 18        |
| <b>6. MATERIALI IN METODE .....</b>                                      | <b>20</b> |
| 6.1. MATERIALI .....   | 20        |
| 6.1.1. Kemikalije in topila .....  | 20        |
| 6.1.2. Aparature .....   | 20        |
| 6.2. METODE.....   | 20        |
| 6.2.1. Metode organske sintezne kemije .....                             | 20        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.2.2. Testiranje antioksidantov .....   | 22        |
| 6.2.2.1. Določanje antioksidativne učinkovitosti oksimov in amidoskimov z difenilpikrilhidrazilno (DPPH) metodo .....  | 22        |
| <b>7. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>  | <b>24</b> |
| 7.1. SINTEZA 4-(OKSIRAN-2-ILMETOKSI)BENZONITRILA .....   | 24        |
| 7.2. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO 4-(3-(ALKILAMINO)-2-HIDROKSI PROPOKSI)BENZONITRILA .....   | 25        |
| 7.3. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO AMIDOKSIMOV .....  | 28        |
| 7.4. SINTEZA 4-(OKSIRAN-2-ILMETOKSI)BENZALDEHIDA .....   | 32        |
| 7.5. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO 4-(3-(ALKILAMINO)-2-HIDROKSI PROPOKSI)BENZALDEHIDA IN 4-(3-(ALKIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL) FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHIDA .....     | 33        |
| 7.6. SPLOŠNI PREDPIS SINTEZE OKSIMOV .....   | 42        |
| 7.7. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO ALKIL 4-FORMILHIDROGENFOSFATOV .....   | 51        |
| 7.8. SPLOŠNI PREDPIS SINTEZE ALKIL 4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENIL HIDROGENFOSFATA .....   | 53        |
| <b>8. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>  | <b>56</b> |
| 8.1. REZULTATI IN RAZPRAVA SINTEZE SPOJIN .....  | 56        |
| 8.1.1. Rezultati .....   | 56        |
| 8.1.2. Razprava .....  | 60        |
| 8.1.2.1. Razprava k sintezi 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzonitrila (2) in alkilamino-2-hidroksipropilnih etrov benzonitrila (3-7) .....   | 60        |
| 8.1.2.2. Razprava k sintezi amidoksimov (8-12) .....   | 62        |
| 8.1.2.3. Razprava k sintezi 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzaldehida (14) ter monomerov in dimerov alkilamino-2-hidroksipropilnih etrov benzaldehida (20-24 (monomeri) in 30-34 (dimeri)) ..... | 62        |
| 8.1.2.4. Razprava k sintezi alkilfosfatnih estrov benzaldehida (35-37) .....   | 63        |
| 8.1.2.5. Razprava k sintezi oksimov (20-24, 30-34 in 38-40) .....  | 63        |
| 8.2. UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE SPOSOBNOSTI OKSIMOV IN AMIDOKSIMOV Z DPPH METODO .....   | 63        |
| 8.2.1. Amidoksimi z aminopropandiolnim distančnikom (9, 10 in 11) .....  | 64        |
| 8.2.2. Monomeri oksimov z aminopropandiolnim distančnikom (21, 22 in 23) .....   | 66        |
| 8.2.3. Dimeri oksimov z aminopropandiolnim distančnikom (31 in 33) .....   | 68        |
| 8.2.4. Monomeri oksimov s hidrogenfosfatnim distančnikom (38) .....  | 70        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 8.2.5. Primerjava antioksidativnega delovanja oksimov in amidoksimov pri koncentraciji<br>5mM..... | 71        |
| <b>9. SKLEP.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>10. VIRI IN LITERATURA:.....</b>  | <b>74</b> |

# 1. POVZETEK

Številne zdravilne učinkovine so podvržene oksidativnemu kvarjenju, kar lahko povzroči izgubo učinka ali celo nastanek toksičnih intermediatov in produktov, zato so izjemnega pomena ustrezni pogoji shranjevanja teh učinkovin ter zaščita z uporabo antioksidantov. Ti lahko preprečijo oksidativno kvarjenje na več načinov, in sicer zaradi svoje strukture vstopajo v procese oksidacije prej kot učinkovina, kelirajo kovinske ione ali neposredno reagirajo z radikali.

Tekom diplomskega dela smo sintetizirali nove amfifilne antioksidante oksimskega in amidoksimskega tipa, ki so primerni za uporabo v dvofaznih sistemih, kot so emulzije O/V ali V/O. Sintetizirani antioksidanti naj bi delovali na medfazi, torej morajo na nek način izkazovati lastnosti površinsko aktivnih snovi. Sintetizirane končne spojine smo na koncu ovrednotili, in sicer tako da smo s pomočjo difenilpikrilhidrazilne (DPPH) metode preverili njihove antioksidativne lastnosti.

Za vse pripravljene antioksidante je značilno, da imajo polarno glavo in nepolaren rep. Kot izhodni spojini za sintezo smo uporabili 4-hidroksibenzaldehid in 4-cianofenol. Hidrofilni del molekule predstavlja amidoksimska oziroma oksimska skupina ter aminopropandiolni ali hidrogenfosfatni distančnik. Lipofilni del molekule pa je omejen na različno dolgo alkilno verigo.

Z DPPH metodo smo ovrednotili antioksidativne lastnosti izbranih oksimov in amidoksimov štirih strukturno različnih skupin. Ugotovili smo, da se je pri vseh testiranih spojinah vsebnost DPPH<sup>\*</sup> s časom zmanjšala, kar potrjuje dejstvo, da te spojine delujejo kot antioksidanti. Med testiranimi spojinami se je za najučinkovitejši antioksidant izkazal amidoksim z najkrajšo verigo (**9**), sledila sta mu amidoksima z daljšo verigo (**10** in **11**), nato pa monomeri oksimov. Kot najslabši antioksidanti so se izkazali dimeri oksimov. Dobljeni rezultati pomenijo pomemben prispevek k razumevanju strukturnih zakonitosti pri amfifilnih antioksidantih.

## 2. ABSTRACT

Numerous medical substances are often liable to oxidation, which can cause the loss of their therapeutic effect or even production of toxic intermediates. Therefore suitable storage of active substances is extraordinarily important. To prevent oxidation, we combine active substances with antioxidants. Antioxidants act in three different ways: their structure makes them liable to oxidate faster than medical substances, they are able to complex metals and directly react with free radicals.

During the thesis we have synthesized new amphiphilic antioxidants (oxime and amidoxime type) suitable for two phase systems such as emulsions O/V or V/O. Synthesized antioxidants have the structural properties of surface active substances that enable their distribution between aqueous and organic phase. The antioxidant activity of synthesized oximes and amidoximes was determined with diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) method.

All synthesized amphiphilic antioxidants have polar and lipophilic residues. 4-Cyanophenol and 4-hydroxybenzaldehyde were used as the starting compounds for the synthesis. The hydrophilic part of the molecule consists of amidoxime or oxime group and spacer, which is aminopropanediol or hydrogenphosphate group. The lipophilic part of the molecule is presented by an alkyl chain of varying length.

With DPPH method we have evaluated antioxidant properties of chosen oximes and amidoximes of four structurally different groups. We have ascertained that the percentage of unchanged DPPH<sup>•</sup> was lower in the course of time, as compared with the standard solution of DPPH<sup>•</sup> in methanol, a result that proves that these compounds act as antioxidants. Among the tested compounds the most effective antioxidants were of amidoxime type, followed by the monomers of oxime and the least effective were the dimers of oxime. These results are an important addition to the knowledge of structural features of amphiphilic compounds with antioxidant properties.

### 3. SEZNAM OKRAJŠAV

|                   |   |
|-------------------|---|
| d                 | dublet  |
| DNA               | deoksiribonukleinska kislina                              |
| DPPH <sup>•</sup> | difenilpikrilhidrazil radikal                             |
| E                 | redoks potencial neke snovi                               |
| E <sub>0</sub>    | standardni redoks potencial                               |
| EI                | elektronska ionizacija (MS)                               |
| ESI               | elektrosprej ionizacija (MS)                              |
| GPx               | glutation peroksidaza                                     |
| GSH               | glutation   |
| GSSG              | glutation disulfid  |
| IR                | infrardeča spektroskopija                                 |
| J                 | sklopitvena konstanta (NMR)                               |
| LDL               | lipoproteini majhne gostote                               |
| LP                | lipidna peroksidacija                                     |
| m                 | multiplet (NMR)   |
| M                 | molarna koncentracija                                     |
| MK                | maščobna kislina  |
| Mr                | molekulska masa   |
| MS                | masna spektrometrija                                      |
| NADPH             | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana oblika) |
| NADP <sup>+</sup> | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana oblika) |
| NMR               | jedrska magnetna resonanca                                |
| ppm               | en del na milijon delov (NMR)                             |
| OKH 12            | 4-(trideciloksi)-benzaldehyd oksim                        |
| O/V               | emulzije tipa olje/voda, hidrofilne emulzije              |
| PAS               | površinsko aktivna snov                                   |
| PNMK              | proste nenasičene maščobne kisline                        |
| R <sub>f</sub>    | retencijski faktor (TLC)                                  |
| ROS               | reaktivne kisikove spojine                                |
| RS                | reaktivne spojine   |



---

|                |  |
|----------------|--|
| s              | singlet (NMR)                                |
| SOD            | superoksid dismutaza                         |
| t              | triplet (NMR)                                |
| T <sub>t</sub> | temperatura tališča                          |
| TLC            | tankoplastna kromatografija                  |
| UV             | ultravijolično sevanje                       |
| V/O            | emulzije tipa voda/olje, hidrofobne emulzije |
| η              | izkoristek reakcije                          |

## 4. UVOD

Zadnjih dvajset let se pogosto srečujemo s pojmi kot so radikali, oksidacije, oksidativni stres ter antioksidanti. V nadaljevanju si bomo podrobneje pogledali, kaj sploh so radikali, oksidacije in oksidativni stres, kakšne so njihove posledice delovanja ter kako zaščitimo ne samo učinkovine, pač pa tudi sebe pred njihovimi škodljivimi vplivi, kjer pomembno vlogo dobijo prav antioksidanti. Seveda pa lahko z zagotavljanjem določene kakovosti življenja, manjšim izpostavljanjem škodljivim snovem iz okolja, sevanju, stresom ter pravilno prehrano, tudi sami prispevamo k zmanjšanemu škodljivemu delovanju radikalov v našem organizmu.

### 4.1. OKSIDACIJE

Oksidacije so poleg hidroliz najpogostejše reakcije, ki so odgovorne za kemijsko nestabilnost učinkovin. Definiramo jih bodisi kot odstranitev elektropozitivnih atomov, atomskih skupin ali elektronov bodisi kot pridobitev elektronegativnih atomov ali atomskih skupin. Glede na mehanizem delimo oksidativne reakcije na redoks reakcije in avtooksidacije (1).

#### 4.1.1. Redoks reakcije

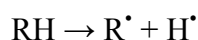
Redoks reakcije vključujejo reverzibilen prenos elektronov med dvema spojinama. Tendenco molekule za reverzibilno oksidacijo lahko napovemo s pomočjo njenega standardnega redoks potenciala ( $E_0$ ). Za substanco v raztopini pri konstantni temperaturi velja, da je njen redoks potencial ( $E$ ) odvisen od standardnega redoks potenciala, števila elektronov, ki se prenesejo in od logaritemskega razmerja koncentracij reducirane in oksidirane oblike:

$$E = E_0 - 0,06/n * \log [\text{reducirana oblika}] / [\text{oksidirana oblika}]$$

Na potencial ima pomemben vpliv tudi pH. Višji kot je pH, nižji je potencial. Proces oksidacije lažje poteka pri nižjem E, zato so učinkovine z visokim E manj podvržene oksidaciji kot tiste z nizkim E (1).

#### 4.1.2. Avtooksidacije

Avtooksidacija je ireverzibilna verižna reakcija, kjer se spojina počasi oksidira ob prisotnosti kisika, zlasti v lipofilnih sistemih. Reakcije katalizirajo ioni prehodnih kovin, predvsem tisti, ki se nahajajo v različnih oksidacijskih stanjih (železo in baker), ki se med seboj razlikujejo po prisotnosti ali odsotnosti enega elektrona (1,2). Verižna reakcija poteka v treh stopnjah: iniciaciji, propagaciji in terminaciji. V fazi iniciacije nastajajo pod vplivom svetlobe, toplote ali sledov težkih kovin radikali, kar prikazuje spodnja reakcija:



Nastali radikali v fazi propagacije reagirajo s kisikom in tvorijo peroksilne radikale  $ROO^{\bullet}$ . Peroksilni radikali odvzamejo H organskim molekulam ali pa se vežejo na dvojne vezi, ter tako tvorijo hidroperoksidi in nove radikale, ki se spet vključujejo v verižno reakcijo. Hidroperoksidi se hidrolitično cepijo na aldehide, ketone in karboksilne kisline. Te spojine izkazujejo spremenjene organoleptične lastnosti in so indikatorji stopnje oksidacije v sistemu.

Reakciji tvorbe peroksilnega radikala ter hidroperoksida:

- $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$
- $ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$

Propagacija se lahko nadaljuje do celotne porabe organske spojine ali kisika v sistemu, vendar ponavadi pride prej do terminacije verižne reakcije, ker radikali reagirajo med seboj in tvorijo neradikalske produkte:

- $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R-R$
- $ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$
- $R^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR$

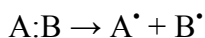
Med iniciacijo poteka oksidacija zelo počasi, zato jo tudi imenujemo indukcijska faza. V propagacijski fazi se hitrost oksidacije povečuje logaritemsko. V fazi terminacije pa se reakcija upočasnjuje dokler se tudi popolnoma ne ustavi.

Preprečevanje oksidacij v zdravilih je izrednega pomena, saj pride do sprememb v strukturi zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi, nastanejo pa lahko številni, strukturno različni produkti oksidacije. Nekateri produkti so toksični ali obarvani ter lahko povzročijo zavrnitev zdravila, čeprav je vsebnost učinkovine znotraj predpisane specifikacije. Za uspešno zaščito pred oksidacijo je potrebno poznati mehanizem reakcije, kakor tudi dejavnike, ki na proces vplivajo. Pomembni dejavniki so predvsem temperatura, svetloba, prisotnost kisika, sledov težkih kovin in oksidantov, pH raztopine, koncentracija učinkovine in fizikalno stanje sistema. Zdravilo lahko stabiliziramo z zmanjševanjem vpliva zunanjih dejavnikov (shranjevanje pri nižji temperaturi, zaščita pred svetlobo) in z dodajanjem antioksidantov (1).

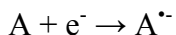
## 4.2. RADIKALI

Radikali so atomi, ioni, molekule ali kompleksi, ki imajo v svoji strukturi (orbitali) vsaj en sam, nesparjen elektron, ki je v večini primerov tudi vzrok za njihovo kemično reaktivnost in s tem povezano nestabilnost. Nastanejo pri homolitski cepitvi kovalentnih vezi, v enoelektronskih reakcijah oksidacije in redukcije (redoks reakcije) ter pri ionizaciji snovi, kar prikazujejo spodnje reakcije (1,2,3):

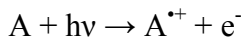
- homolitska cepitev kovalentne vezi



- enoelektronska redoks reakcija



- ionizacija snovi

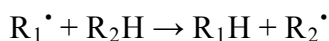


Radikali z lihim številom elektronov in tisti s sodim številom nesparjenih elektronov, ki imajo nasprotno spino, so zelo reaktivni. Kemično stabilni radikali imajo sodo število elektronov, vendar vsaj dva elektrona na različnih nivojih s spinoma v isti smeri. V

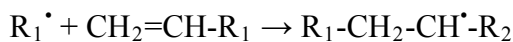
primerjavi z reaktivnimi radikali reagirajo slednji z drugimi molekulami, ki niso radikali, kar nekaj velikostnih razredov počasneje. Primera stabilnih radikalov sta molekularni tripletni kisik ( $O_2$ ) in dušikov dioksid ( $NO_2$ ) (4). Radikalske reakcije so po hitrosti primerljive z encimskimi reakcijami, vendar pa so neselektivne, nespecifične in nenadzorovane (5,6).

Radikali reagirajo s snovmi, ki jih srečajo v svoji okolici. Produkt radikalske reakcije je odvisen od spojine s katero radikal reagira. Lahko pride do privzema radikala ali adicije radikala na dvojno vez, v obeh primerih nastane nov radikal, ki se največkrat obnaša podobno kot prvotni radikal. Če med sabo reagirata dva radikala pa lahko nastane neradikalni produkt. Produkte radikalskih reakcij predstavljajo spodnje reakcije (5,6):

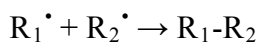
- odtegnitev vodikovega atoma iz neradikalne spojine



- adicija na dvojno vez

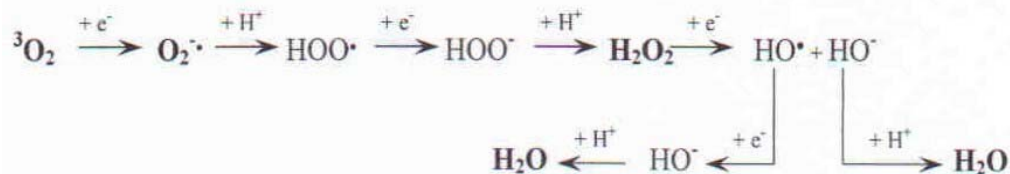


- medsebojna reakcija dveh radikalov



V normalnih pogojih so v organizmu glavni vir radikalov in drugih reaktivnih kisikovih spojin mitohondriji, peroksisomi, citokrom P450 in aktivirani fagociti. Nastale radikale organizem uporablja za lastno obrambo in kot prenašalce informacij, hkrati pa ima razvite ustrezne sisteme za obrambo pred njimi (3). V patofizioloških stanjih je nastajanje radikalov povečano in poteka nenadzorovano na mestu poškodbe ali obolenja. Nastajajo zaradi notranjih (aktivnost encimov, aktivnost imunskega sistema, obolenja, metabolizem učinkovin) kot tudi zunanjih (UV sevanje, onesnažen zrak, kovinski ioni, kemikalije, zdravila) dejavnikov (4,6).

Človeški organizem kisik nujno potrebuje za življenje, hkrati pa je pomemben vir radikalov in drugih reaktivnih kisikovih spojin. Molekula atmosferskega kisika je biradikal, ki ima dva nesparjena elektrona na ločenih orbitalah, spina pa obrnjena v isto smer. Kisik lahko sprejme štiri elektrone in se pri tem reducira do vode. Reakcija poteka v encimsko kontroliranih štirih enoelektronskih oziroma dveh dvoelektronskih redukcijah (slika 1). Kadar kisik ne sprejme vseh štirih elektronov, se tvorijo kisikovi radikali, ki so vzrok ali posledica številnih bolezni (3,7).



*Slika 1: Redukcija molekule kisika do vode.*

**Reaktivne kisikove spojine** so snovi, ki nastajajo v različnih procesih v celici in pod določenimi pogoji lahko tvorijo radikale. Najpogostejša kisikova radikala v organizmu sta superoksidni anionski in hidroksilni radikal. Slednji je zaradi svoje velike kemične reaktivnosti tudi najnevarnejši (3). Pregled nekaterih kisikovih radikalov in reaktivnih kisikovih zvrsti je podan v preglednici I.

| Kisikovi radikali        |                                       | Reaktivne kisikove spojine |                    |
|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| ${}^3\text{O}_2$         | kisik v tripletnem stanju             | ${}^1\text{O}_2$           | singletni kisik    |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$    | superoksid                            | $\text{O}_3$               | ozon               |
| $\text{HO}^{\cdot}$      | hidroksilni radikal                   | $\text{H}_2\text{O}_2$     | vodikov peroksid   |
| $\text{HO}_2^{\cdot}$    | hidroperoksilni radikal               | $\text{HOCl}$              | hipoklorna kislina |
| $\text{ROO}^{\cdot}$     | peroksilni radikal                    | $\text{ROOH}$              | hidroperoksid      |
| $\text{RO}^{\cdot}$      | alkoksilni radikal                    | $\text{ROOR}$              | peroksid           |
| $\text{ArO}^{\cdot}$     | ariloksilni radikal                   | $\text{ONOO}^-$            | peroksinitrit      |
| $\text{UQ}^{\cdot}$      | semikinonski radikal                  |                            |                    |
| ${}^1\text{O}_2^{\cdot}$ | vzbujena oblika<br>singletnega kisika |                            |                    |
| $\text{NO}^{\cdot}$      | dušikov oksid                         |                            |                    |

*Preglednica I: Kisikovi radikali in reaktivne kisikove spojine.*

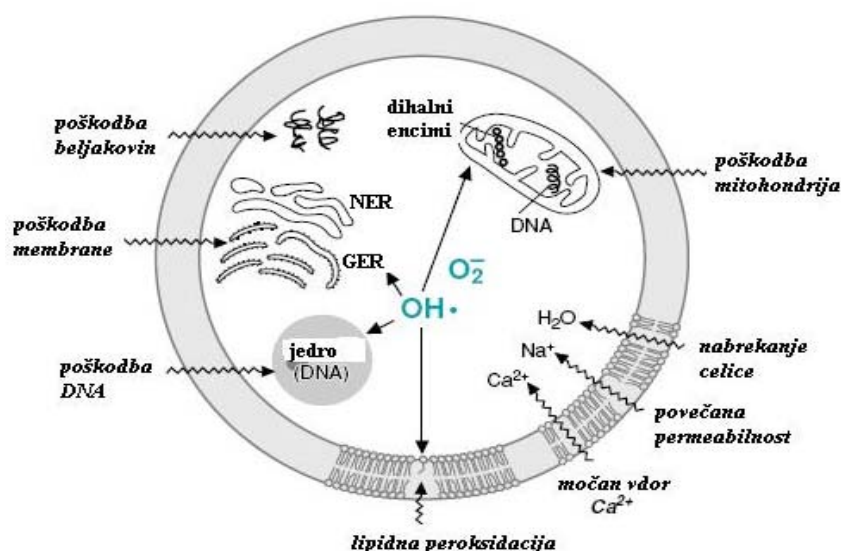
#### 4.2.1. POSLEDICE DELOVANJA RADIKALOV

Kot smo že omenili, radikali in ROS (reaktivne kisikove spojine) nastajajo v telesu tudi v fizioloških pogojih, v nenormalnih, torej bolezenskih stanjih pa je njihova endogena

produkcija povečana in poteka nenadzorovano na mestu poškodbe ali obolenja. Govorimo o oksidativnem stresu, s katerim opišemo učinke škodljivega delovanja radikalov zaradi njihovega povečanega nastajanja ali zaradi izrabe obrambne kapacitete fizioloških antioksidantov (3).

Pri oksidativnem stresu manjšega obsega, se celice same obranijo učinkov radikalov z razpoložljivimi antioksidanti, z njihovo povečano tvorbo in regeneracijo. Pri oksidativnem stresu večjega obsega pride tudi do motenj v presnovi celice, poškodbe DNA, lipidne peroksidacije, poškodb membranskih transportnih sistemov in večanja koncentracije kalcijevih ionov v celici (3). Frekvenca poškodb DNA je lahko različna. Če je frekvenca okvar majhna in niso prizadeti pomembnejši geni, govorimo o staranju, procesu, ko postopno slabijo posamezne fiziološke funkcije organizma. V primeru prizadetosti določene skupine genov v določenem organu imamo opraviti s kako od degenerativnih obolenj (Alzheimerjeva bolezen). V posebnih primerih pa je lahko nabor naključnih mutacij takšen, da se normalna celica pretvori v rakavo (7). Oksidativni stres lahko povzroča številne bolezni, med katerimi so poleg že prej omenjenih tudi vnetne bolezni (artritis, glomerulonefritis), Parkinsonova bolezen, srčne bolezni, hemokromatoze, mišična distrofija, emfizem, želodčne razjede, bolezni, ki so posledica kajenja ali prekomernega uživanja alkohola ter številne druge (8).

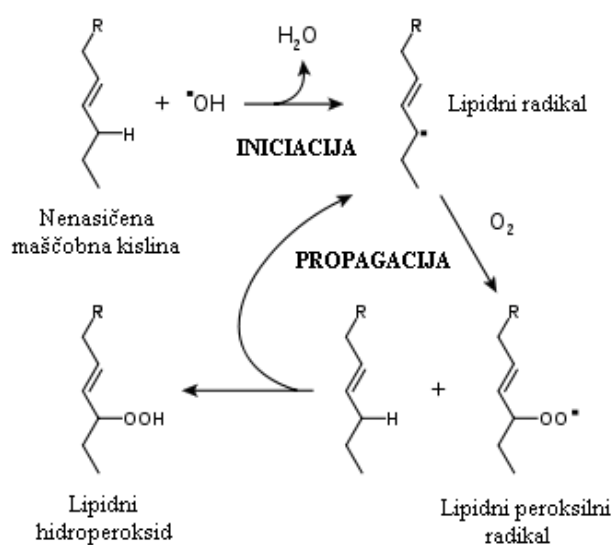
Posledice oksidativnega stresa na celico so prikazane na sliki 2.



**Slika 2:** Posledice oksidativnega stresa na celico; GER=granulirani endoplazmatski retikulum, NER=gladki endoplazmatski retikulum.

## 4.2.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija (LP) je serija radikalskih in oksidativnih sprememb PNMK, ki na koncu privedejo do porušjenja membranske strukture in spremembe njene funkcije. Za sprožitev LP sta dovolj reaktivna hidroksilni radikal in singletni kisik. Slednji nastaja v organizmu v manjši meri, zato je bolj pomemben pri širjenju LP. K širitvi procesa LP pomembno prispevajo lipidni in drugi sekundarno nastali radikali ter železovi in/ali bakrovi ioni, ki se pri raznih poškodbah, vnetjih in obolenjih sproščajo iz skladišč (slika 3) (2,3).



*Slika 3: Reakcije lipidne peroksidacije.*

LP najpogosteje poteka na nenasičenih maščobnih kislinah fosfolipidov, holesterolu in retinolu. Posledica oksidacije verig maščobnih kislin, ki sestavljajo membranske fosfolipide, je zmanjšanje membranske viskoznosti in povečanje njene prepustnosti za snovi, ki sicer ne morejo nenadzorovano prehajati membrane. LP prizadene proteine in njihovo funkcijo posredno (spremenjena je funkcija membranskih encimov zaradi spremembe v hidrofobnem membranskem okolju teh encimov) in neposredno (pride do spremembe strukture proteinov, modifikacije posameznih aminokislin in prečnega povezovanja). Lipoproteini se lahko ujamejo pod notranjo steno arterij, kjer obstaja nevarnost oksidacije, s tem pa se poveča nevarnost koronarnih srčnih obolenj in ateroskleroze (3).



Končni produkti LP so različni aldehidi, ketoni, epoksidi, nižje maščobne kisline in vrsta krajših ogljikovodikov kot so etan, etilen idr. LP se konča, ko je porabljen eden od substratov ali ko antioksidanti nevtralizirajo vse radikale (3).

### 4.3. ZAŠČITA PRED RADIKALI

Biokemični procesi, v katerih se pojavljajo radikali, so za organizem običajni. Nastale radikale je organizem nato uporabil za lastno obrambo, hkrati pa je razvil tudi ustrezne sisteme za obrambo pred njimi:

- z organizacijo lipidov v dvojne plasti, ki se oksidirajo bistveno kasneje kot posamezne maščobne kisline,
- z vezavo ionov prehodnih kovin ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) v proteinske komplekse, od koder ne morejo katalizirati oksidativnih reakcij in lipidne peroksidacije,
- s specifičnimi encimi ter
- z endogenimi in eksogenimi antioksidanti (3).

Posamezne skupine si bomo podrobneje pogledali v nadaljevanju.

#### 4.3.1. ZAŠČITA Z ENCIMI

Zaščito pred lipidno peroksidacijo si organizem zagotavlja z naslednjimi encimi:

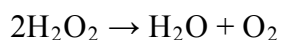
##### 4.3.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

SOD odstranjuje superoksid, tako da ga v reakciji dismutacije pretvori v neradikalni vodikov peroksid in kisik (2,3). Glede na kovinske ione, ki so v aktivnem mestu ločimo:

- Cu-Zn SOD, ki ima dve proteinski podenoti, vsako s svojim aktivnim mestom, kjer sta  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$ . Bakrov ion neposredno sodeluje v katalizi, medtem ko cink stabilizira strukturo encima.
- Mn SOD ima štiri proteinske podenote z 2-4 ioni  $\text{Mn}^{3+}$ . Med reakcijo pride do spremembe oksidacijskega stanja (3,8).

#### 4.3.1.2. Katalaza

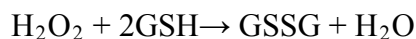
Katalaza katalizira razgradnjo vodikovega peroksida na vodo in kisik:



Sestavljajo jo 4 podenote, od katerih vsaka v aktivnem mestu vsebuje  $\text{Fe}^{3+}$  ione. Zmanjšana aktivnost katalaz pomeni kopičenje vodikovega peroksida, ki se lahko pod vplivom kovinskih ionov, kot sta železov in bakrov ion pretvori v reaktivni in izredno nevarni hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ) (3).

#### 4.3.1.3. Glutation-peroksidaza

Peroksidazni encimi odstranjujejo vodikov peroksid tako, da ga porabijo za oksidacijo drugih substratov. Najpomembnejša je **glutation-peroksidaza** (GPx), ki jo sestavljajo štiri podenote s selenom v aktivnem mestu. GPx odstranjuje vodikov peroksid, tako da ga porablja za oksidacijo glutationa (GSH), tiol-vsebujočega tripeptida, v glutationdisulfid (GSSG). Reakcijo redukcije vodikovega peroksida pod vplivom glutacion-peroksidaze prikazuje spodnja reakcija:



#### 4.3.1.4. Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza vsebuje 2 podenoti, v aktivnem mestu vsake pa se nahaja FAD, ki ga reducira NADPH, pri tem se sam oksidira v  $\text{NADP}^+$ . Posledica redukcije FAD je nastanek dveh  $-\text{SH}$  skupin, ki reagirata z GSSG in ga pretvorita nazaj v GSH. Glutation-reduktaza torej omogoča regeneracijo glutaciona iz GSSG preko oksidacije NADPH v  $\text{NADP}^+$ , kar prikazuje spodnja reakcija:



*In vitro* lahko GSH reagira z  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{RO}_2^\bullet$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$ , ogljikovimi radikali ter  $^1\text{O}_2$ , ne pa z  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Slednjega lahko odstranita SOD ter GSSG s pretvorbo v GSH z glutacion-reduktazo (9).

## 4.3.2. ZAŠČITA Z ANTIOKSIDANTI

### 4.3.2.1. DEFINICIJA, DELITEV IN MEHANIZEM DELOVANJA ANTIOKSIDANTOV

Antioksidant je snov, ki že v nizki koncentraciji v primerjavi z oksidirajočimi snovmi, zavre ali prepreči oksidacijo drugih sestavin v organizmu (9).

Antioksidante delimo na endogene (glutation, sečna kislina, ubikinon, bilirubin, ceruplazmin, lipoična kislina) in eksogene (vitamin C, vitamin E, karotenoidi, fenolne, polifenolne in žveplove sojine) antioksidante, glede na mehanizem delovanja pa na prave antioksidante, redoks stabilizatorje in antioksidantne sinergiste. Pravi antioksidanti, kot so butilhidroksianizol, ditercetilhidroksitoluen, vitamin E in drugi, lovijo radikale in s tem zavirajo verižno reakcijo. Redoks stabilizatorji imajo nižji redoks potencial od učinkovin, ki jih želimo zaščititi. Zaradi nižjega redoks potenciala so sposobni zmanjšati obseg oksidacije teh učinkovin. Mednje spadajo  $\text{NaHSO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , tioglikolna kislina, tiomlečna kislina, tiourea, glutation, cistein in askorbinska kislina. Med antioksidantne sinergiste spadajo kelatorji, na primer EDTA, citronska kislina in vinska kislina, katerih glavna naloga je keliranje kovinskih ionov (1).

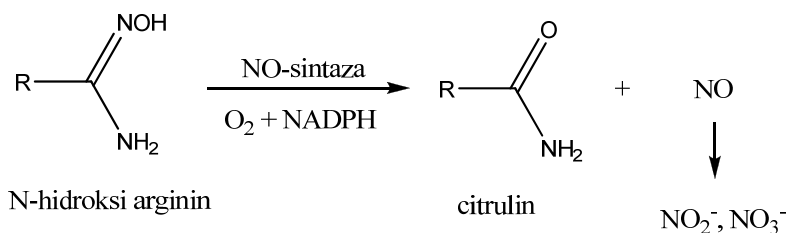
Antioksidanti, ki prekinjajo verižne reakcije, so tiste snovi, ki neposredno reagirajo z radikali in jih spreminjajo v stabilnejše produkte. Delujejo lahko na različne načine:

- znižujejo lokalne koncentracije kisika,
- preprečujejo sprožitev LP z lovljenjem radikalov, ki bi LP lahko sprožili,
- vežejo kovinske ione v oblike, ki ne morejo sodelovati pri sprožitvi ali širitvi peroksidacije,
- razgrajujejo perokside tako, da jih spremenijo v manj reaktivne produkte,
- prekinjajo verižne reakcije in tako preprečujejo nadaljnji odcep  $\text{H}^\bullet$  (1,7).

Da neko spojino lahko uporabimo kot antioksidant v zdravilnih pripravkih, mora imeti sledeče lastnosti: biti mora fiziološko sprejemljiva tako v oksidirani kot tudi reducirani obliki, ne sme reagirati z učinkovino, pomožnimi snovmi ali embalažo, učinkovita mora biti v čim širšem pH območju ter imeti ustrezne organoleptične lastnosti (3).

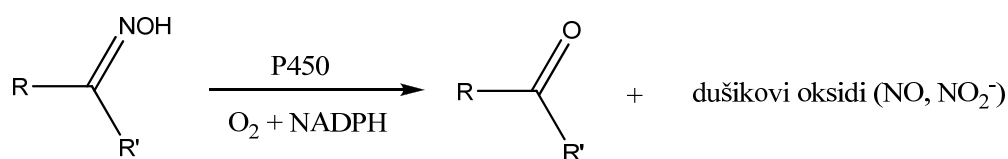
## 4.4. OKSIMI IN AMIDOKSIMI KOT ANTIOKSIDANTI

Dušikov oksid je zelo pomemben mediator v kardiovaskularnem sistemu, možganih ter imunskem sistemu. V organizmu se sintetizira s pomočjo NO-sintaze katalizirane oksidacije iz L-arginina v dveh korakih (slika 4). Najprej poteče hidroksilacija arginina, nato pa oksidativna pretvorba C=NOH skupine, pri čemer nastaneta citrulin in NO (10,11).



**Slika 4:** Reakcija pretvorbe L-arginina v citrulin oziroma amidoksimske skupine v amidno.

Slednjo reakcijo katalizirajo tudi jetrni citokromi P450 (slika 12) ne samo pri N-hidroksiargininu, ampak tudi pri številnih drugih spojinah kot so oksimi, amidoksimi in N-hidroksigvanidini, pri čemer lahko namesto NO (10,11) nastane tudi HNO (nitroksil). HNO nastaja v večjih koncentracijah v primeru oksidativnega stresa ter bolezenskih stanj neodvisno od NOS, vendar pa se pod vplivom različnih bioloških oksidantov lahko pretvori v NO<sup>•</sup>, kar omogočajo methemoglobin, SOD, baker vsebujoči encimi, citokromi P450 ter nepoškodovani mitohondriji (12).



**Slika 12:** Oksidativna pretvorba C=NOH skupine pod vplivom jetrnih citokromov P450.

Do nedavnega so večino bioloških efektov dušikovega oksida pripisovali njegovemu radikalu (NO<sup>•</sup>), sedaj pa so ugotovili, da lahko NO obstaja tudi v reducirani obliki kot sta HNO in NO<sup>-</sup>. Terapevtska uporaba NO-signalnih poti je bila dolgo poznana v povezavi z nitrovazodilatatorji pri kardiovaskularnih zapletih kot sta angina pectoris ter srčno

popuščanje, vendar je bila njegova uporaba omejena zaradi zmanjšane učinkovitosti pod vplivom oksidativnega stresa ter potencialnim citotoksičnim učinkom (12).

Nitroksil ima edinstvene biološke in farmakološke lastnosti v primerjavi z ostalimi dušikovimi oksidi. V kardiovaskularnem sistemu donorji HNO ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  (Angeli's salt-AS), cianamid, aciloksinitrozo spojine,...) povečajo srčno funkcijo sinergistično in neodvisno od  $\beta$ -adrenergičnega signaliziranja. Prav tako varujejo srčno tkivo pred ishemično poškodbo ter regulirajo delovanje kalcijevih kanalčkov tako v kardiovaskularnem kot tudi živčnem sistemu (12,13,14). HNO lahko neposredno reagira s tioli, odporen je na superoksidni radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), ne razvije se toleranca nanj in ima višjo afiniteto do  $\text{Fe}^{3+}$  kot  $\text{Fe}^{2+}$  hem vsebujočih proteinov. Zaradi svojih antioksidativnih lastnosti zmanjša lipidno peroksidacijo ter inhibira agregacijo trombocitov (12).

Nitroksil ima zelo visok pKa, ki je 11.4, zato se bo pri fiziološkem pH HNO vedno nahajal v protonirani obliki. Vez H-NO ima nizko energijo disociacije, kar pomeni, da je lahko HNO zelo dober donor vodika in lahko reagira z reaktivnimi radikalskimi intermediati, ki se tvorijo pri oksidativnih procesih. Poleg tega oksidacija HNO v lipofilnem okolju vodi do nastanka NO, drugega potencialnega antioksidanta, ki s svojim antioksidativnim delovanjem skupaj z HNO ščiti membrane pred radikalskimi poškodbami.

HNO lahko podobno kot  $\text{NO}^{\cdot}$  deluje kot prooksidant ali antioksidant. Delovanje je odvisno od številnih dejavnikov, kot so celično okolje, koncentracija HNO oziroma  $\text{NO}^{\cdot}$  in prisotnost drugih RS. Nitroksil lahko v visokih koncentracijah (2-4  $\text{mmol L}^{-1}$  AS) deluje citotoksično na nekatere celice, tudi na nevrone, in sicer preko oksidacije DNA (k). Citotoksično pa deluje med drugim tudi na timocite ter rakave celice dojke. Glede na to, da toksičnost HNO opazimo pri koncentracijah mnogo višjih od tistih, ki povzročajo farmakološki učinek, je pričakovati, da bodo pri terapevtskih koncentracijah izraženi le želeni učinki (14).

HNO lahko torej deluje kot antioksidant z donacijo svojega vodikovega atoma. Prav tako pa inducira povečano ekspresijo in aktivnost antioksidantnega proteina hem oksigenaze (HO-1), ki ima pomembno vlogo pri celičnem odgovoru na oksidativni stres (12,14).

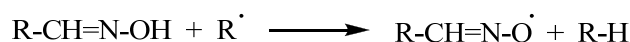
#### 4.4.1. DELOVANJE OKSIMOV

Oksimi so spojine, ki jih v farmaciji največ uporabljamo za ponovno aktivacijo z organofosfati inhibiranih acetilholinesteraz (AChE). Organofosfati so klasični inhibitorji holinesteraz, ki jih pretežno uporabljamo kot pesticide, in lahko povzročijo oksidativni stres pri podganah, miših in v človeškem organizmu, vendar natančen mehanizem še ni popolnoma znan. V raziskavah, so se spojine, ki delujejo kot reaktivatorji acetilholinesteraz z antioksidativnimi lastnostmi, izkazale za dober pristop pri zdravljenju zastrupitev z organofosfati (15).

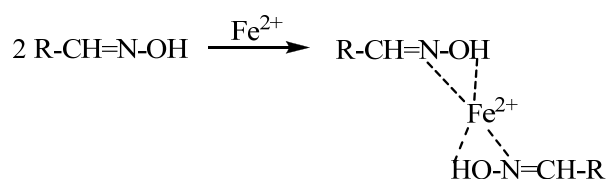
Puntel in sodelavci so ugotovili da butan-2,3-diontiosemikarbazon (oksim) učinkovito nevtralizira lipidno peroksidacijo povzročeno z različnimi oksidativnimi spojinami, reagira s številnimi radikali kot sta hidroksilni radikal in  $\text{NO}^\bullet$  ter kelira kovinske ione. Poleg tega lahko oksimi preprečijo serumsko oksidacijo in oksidacijo LDL ter s tem nastanek in razvoj ateroskleroze, kronične vnetne bolezni, ki je v zahodnem svetu vedno večji problem (16).

##### Oksimi delujejo antioksidativno ker:

- neposredno reagirajo z radikali



- kelirajo kovinske ione



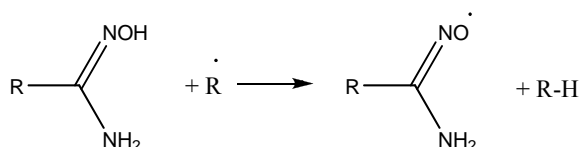
#### 4.4.2. DELOVANJE IN LASTNOSTI AMIDOKSIMOV

Amidoksimska funkcionalna skupina se nahaja v številnih skupinah zdravilnih učinkovin kot so tripanocidi, tuberkulostatiki, antihipertenzivi, baktericidi, fungicidi, lokalni anestetiki, antagonistih fibrinogenskega receptorja ter učinkovinah, ki delujejo na centralni živčni sistem.

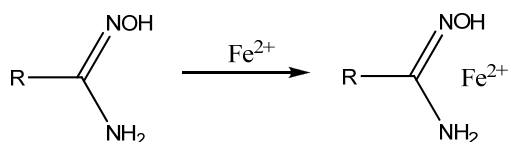
Amidoksimi so spojine s šibko kislimi lastnostmi. Tautomerna oblika hidrosiaminenamin je manj stabilna od amidoksimske, ker je onemogočena tvorba intramolekularnih vodikovih vezi med H in OH, tako kot je to mogoče pri amidoksimski obliki (17).

#### Amidoksimi delujejo antioksidativno ker:

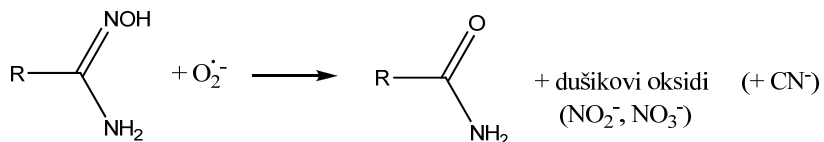
- neposredno reagirajo z radikali



- kelirajo kovinske ione



- reagirajo s superoksidnim radikalom



## 5. NAČRT DELA

Oksidacije so med najpogostejšimi vzroki za kemijsko nestabilnost učinkovin. Ta se kaže v izgubi učinka, spremembi barve, spremembi hitrosti raztapljanja, precipitaciji ali celo nastanku toksičnih intermediatov, zato so izjemnega pomena pogoji shranjevanja teh učinkovin ter ustrezna zaščita z uporabo antioksidantov. Antioksidante dodajamo v zdravilne pripravke zato, ker vstopajo v procese oksidacije prej kot sama učinkovina oziroma pomožne snovi in na ta način zaščitijo učinkovino pred oksidativnim kvarjenjem. Zaradi pomembne vloge antioksidantov pri zaščiti učinkovin pred oksidativnim kvarjenjem, je namen te diplomske naloge načrtovanje in sinteza amfifilnih antioksidantov oksimskega in amidoksimskega tipa, ki bodo delovali na medfazi in se bodo lahko uporabljali v dvofaznih sistemih, kot so emulzije tipa O/V oziroma V/O. Za doseganje tega cilja bomo upoštevali določene zakonitosti, ki so nujne pri načrtovanju amfifilnih molekul z antioksidativnim delovanjem. Polarni del molekule bodo predstavljali izbrani distančnik in funkcionalna skupina z antioksidativnim delovanjem, nepolarni del molekule pa različno dolge alkilne verige.

Amidoksimski tip antioksidantov bomo pripravili iz 4-cianofenola, kot izhodne spojine, na katerega bomo najprej pripeli epiklorhidrin. Nato bomo odprli oksiranski obroč z ustreznimi amini. Ciano skupino bomo na koncu s hidroksilamonijevim kloridom pretvorili v ustrezen amidoksim. Za povečanje nukleofilnosti OH skupine 4-cianofenola pri tvorbi etra z epiklorhidrinom bomo uporabili vodno raztopino NaOH. Nadaljnjo reakcijo pripenjanja ustreznega amina bomo izvajali v brezvodnem dioksanu ob dodatku  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ , ki odpre epoksidni obroč in aktivira metilensko  $\text{CH}_2$  skupino za nukleofilni napad amino skupine. Amidoksime bomo pripravili v brezvodnem etanolu ob dodatku  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , kot baze, za nevtralizacijo sproščene kisline (HCl). Po enakem postopku bomo pripravili antioksidante oksimskega tipa iz 4-hidroksibenzaldehida, kot izhodne spojine.

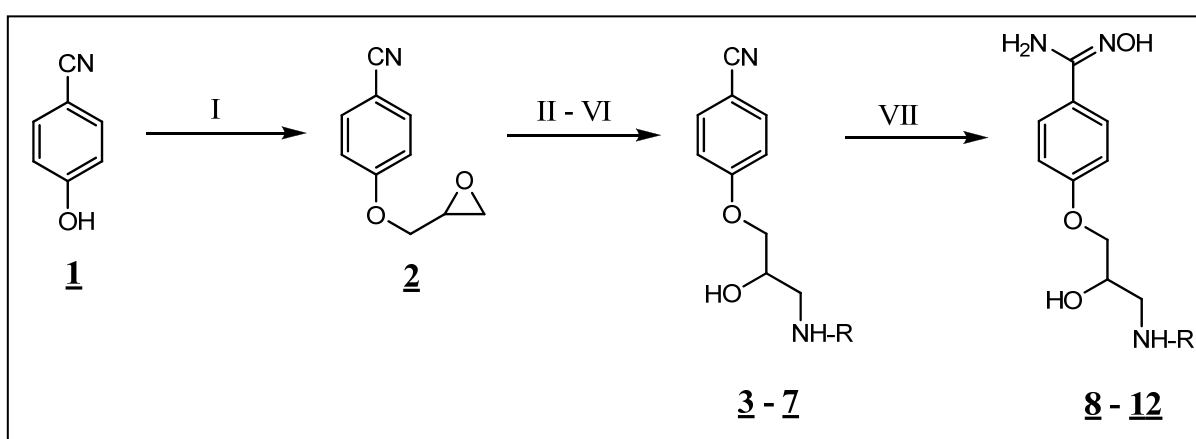
Antioksidante oksimskega tipa s hidrogensfosfatno skupino kot distančnikom bomo sintetizirali iz 4-hidroksibenzaldehida, kot izhodne spojine, raztopljenega v piridinu, s pripenjanjem fosforjevega oksiklorida ter ustreznega alkohola. Reakcijo bomo izvajali v brezvodnem diklorometanu. Nadaljnjo tvorbo oksima bomo izvedli enako kot pri ostalih oksimih in amidoksimih, in sicer s hidroksilamonijevim kloridom v brezvodnem etanolu ter dodatku baze ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), za nevtralizacijo sproščene HCl.



Antioksidativne lastnosti izbranih, prej sintetiziranih, oksimov in amidoksimov bomo preverili s pomočjo difenilpikrilhidrazilne (DPPH) metode. Pri DPPH metodi bomo s pomočjo UV spektrofotometra spremljali padec absorbanca oziroma zmanjševanje vsebnosti DPPH v %, kot medij za pripravo vzorcev (DPPH in izbranih spojin) pa bomo uporabili metanol, ker dokazano ne vpliva na sam potek reakcij.

## 5.1. REAKCIJSKE SCHEME

### 5.1.1. REAKCIJSKA SCHEMA I: AMIDOKSIMI



**I:** raztopina NaOH, epiklorhidrin, sobna temperatura; preko noči

**II:** CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>, Ca(OTf)<sub>2</sub>, brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**III:** CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>NH<sub>2</sub>, Ca(OTf)<sub>2</sub>, brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**IV:** CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>NH<sub>2</sub>, Ca(OTf)<sub>2</sub>, brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**V:** CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>, Ca(OTf)<sub>2</sub>, brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**VI:** CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>NH<sub>2</sub>, Ca(OTf)<sub>2</sub>, brezvodni dioksan, refluks; 6 h

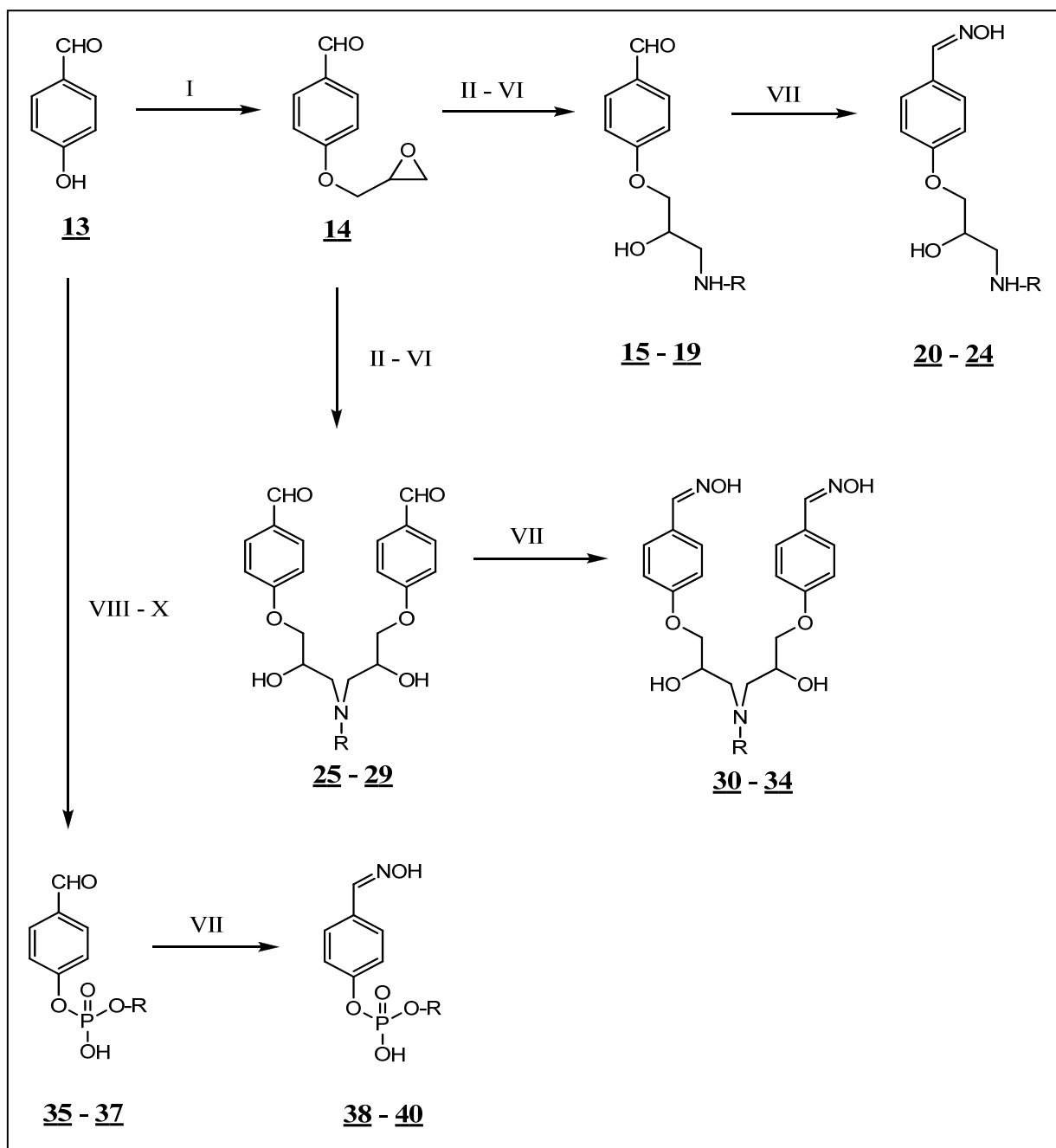
**VII:** NH<sub>2</sub>OH × HCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, brezvodni etanol, refluks; preko noči

V preglednici II so predstavljene skupine v stranskih verigah spojin **1-12** pri sintezi amidoksimov.

| ŠTEVILKA<br>SPOJINE | R                                |
|---------------------|----------------------------------|
| <b>1</b>            | /                                |
| <b>2</b>            | /                                |
| <b>3</b>            | $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$    |
| <b>4</b>            | $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$    |
| <b>5</b>            | $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$    |
| <b>6</b>            | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| <b>7</b>            | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| <b>8</b>            | $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$    |
| <b>9</b>            | $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$    |
| <b>10</b>           | $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$    |
| <b>11</b>           | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| <b>12</b>           | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |

*Preglednica II: Skupine v stranski verigi pri spojinah **1-12**.*

## 5.1.2. REAKCIJSKA SHEMA II: OKSIMI



**I:** raztopina NaOH, epiklorhidrin, sobna temperatura; preko noči

**II:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ , brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**III:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ , brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**IV:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NH}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ , brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**V:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ , brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**VI:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{NH}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ , brezvodni dioksan, refluks; 6 h

**VII:**  $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , brezvodni etanol, refluks; preko noči

**VIII:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$ ,  $\text{POCl}_3$ , piridin, brezvodni diklorometan, sobna temperatura; preko noči

**IX:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$ ,  $\text{POCl}_3$ , piridin, brezvodni diklorometan, sobna temperatura; preko noči

**X:**  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{OH}$ ,  $\text{POCl}_3$ , piridin, brezvodni diklorometan, sobna temperatura; preko noči

V preglednici III so predstavljene skupine v stranskih verigah spojin **13-40** pri sintezi oksimov.

| ŠTEVILKA SPOJINE | R                                |
|------------------|----------------------------------|
| 13               | /                                |
| 14               | /                                |
| 15               | $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$    |
| 16               | $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$    |
| 17               | $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$    |
| 18               | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| 19               | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 20               | $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$    |
| 21               | $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$    |
| 22               | $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$    |
| 23               | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| 24               | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 25               | $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$    |
| 26               | $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$    |
| 27               | $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$    |
| 28               | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| 29               | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 30               | $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$    |
| 31               | $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$    |
| 32               | $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$    |
| 33               | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| 34               | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 35               | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| 36               | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 37               | $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ |
| 38               | $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ |
| 39               | $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ |
| 40               | $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ |

*Preglednica III: Skupine v stranski verigi pri spojinah **13-40**.*

## 6. MATERIALI IN METODE

### 6.1. MATERIALI

#### 6.1.1 Kemikalije in topila

Pri sinteznem delu smo uporabili reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros, Aldrich, Merck, Sigma. Večina kemikalij je bila p.a. ali višje stopnje čistosti.

**Priprava brezvodnega dioksana:** dioksanu smo dodali na koščke narezan Na in ga predestilirali v atmosferi argona.

**Priprava brezvodnega diklorometana:** diklorometanu smo dodali na koščke narezan Na in ga predestilirali v atmosferi argona.

#### 6.1.2 Aparature

**Standardna laboratorijska oprema:** laboratorijska tehtnica (Kern EG220-3NM), rotavapor (Buchi), magnetni mešalnik, ...

### 6.2. METODE

#### 6.2.1. METODE ORGANSKE SINTEZNE KEMIJE

##### Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabili smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> z 0,25 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm in orositvene reagente:

2,4-dinitrofenilhidrazin za aldehide, rodamin za lipofilne spojine, FeCl<sub>3</sub> za alkohole ter ninhidrin za amine.

##### Kolonska kromatografija pod povišanim tlakom (Flash):

Pri čiščenju smo za nekatere spojine kot separacijsko tehniko uporabili kolonsko kromatografijo. V nekaterih primerih je bila stacionarna faza silikagel z velikostjo delcev

0,04 – 0,063 mm (Merck), v drugih pa silikagel z velikostjo delcev 0,063 – 0,200 mm (Merck).

**Mobilne faze:** diklorometan/metanol=20/1, 9/1, 7/1, petroleter/etilacetat=2/1, etilacetat/metanol=2/1.

### **Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektre smo posneli na spektrometru Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

### **Masna spektrometrija: (MS)**

Masne spektre so nam posneli na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q s tehniko EI, ESI in FAB na Institutu Jožef Štefan v Ljubljani.

### **Jedrska magnetna resonanca (NMR):**

NMR spektre so nam posneli na spektrometru Bruker AVANCE DPX<sub>300</sub> pri 300,15 MHz na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, NMR center. Kot topilo smo uporabili CDCl<sub>3</sub> in DMSO-d<sub>6</sub>.

### **Elementna analiza**

Elementne analize ogljika, vodika in dušika, so bile opravljene z analizatorjem Perkin Elmer 240 CHN na Katedri za organsko kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

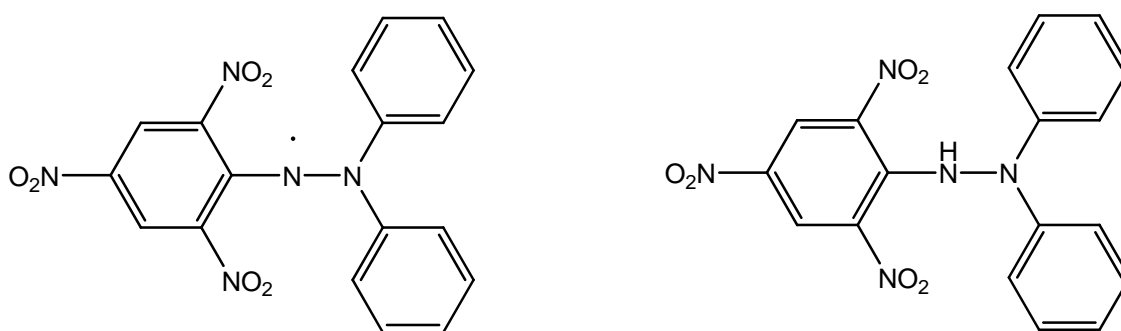
### **Določevanje tališč**

Tališča smo določili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico (Leica).

## 6.2.2. TESTIRANJE ANTIOKSIDANTOV

### 6.2.2.1. Določanje antioksidativne učinkovitosti oksimov in amidoksimov z difenilpikrilhidrazilno (DPPH) metodo

Antioksidativno učinkovitost oksimov in amidoksimov smo spremljali z DPPH metodo. DPPH<sup>•</sup> je stabilen radikal (slika 5), intenzivne vijolične barve (18,19,20). Če raztopini DPPH<sup>•</sup> dodamo raztopino substrata, ki lahko donira vodikov atom, se pri tem tvori reducirana oblika DPPH (slika 5), pri čemer se raztopina razbarva (20).



*Slika 5: Difenilpikrilhidrazil radikal (levo) in njegova reducirana oblika (desno).*

Koncentracijo DPPH<sup>•</sup> določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri njegovem absorpcijskem maksimumu, v našem primeru pri valovni dolžini okrog 516 nm (odvisno tudi od spektrofotometra). Kot topilo za DPPH<sup>•</sup> in vzorce uporabimo metanol, ker dokazano ne vpliva na sam potek reakcije. V prisotnosti dodanega antioksidanta pride do zmanjšanja absorbance DPPH<sup>•</sup> sorazmerno s koncentracijo in antioksidativno aktivnostjo dodane spojine. Antioksidativni učinek podamo kot delež DPPH<sup>•</sup> (%) v ravnotežnem stanju, ki smo ga izračunali po naslednji formuli:

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} = (A_f/A_0) \times 100,$$

pri čemer  $A_0$  predstavlja absorbanco radikala pri 516 nm brez dodanega vzorca,  $A_f$  pa absorbanco radikala ob dodatku antioksidanta po določenem času (18,19,20).

Najprej smo pripravili 0,063 mM metanolno raztopino DPPH<sup>•</sup>, ki je bila intenzivne vijolične barve in ji izmerili absorbanco  $A_0$  pri 516 nm. Nato smo pripravili različne

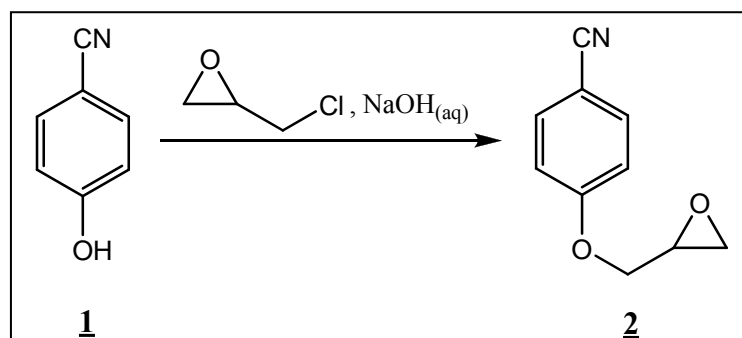
koncentracije ( 2,0 mM, 5,0 mM ali 10,0 mM) metanolnih raztopin oksimov ali amidoksimov in določali njihovo antioksidativno delovanje tako, da smo v kiveto najprej odmerili 2 mL raztopine DPPH<sup>•</sup> in nato dodali 1 mL raztopine oksima oziroma amidoksima. Prvi padec absorbance, za približno 35% v vseh primerih, je tako posledica razredčitve osnovne raztopine DPPH<sup>•</sup> in ne antioksidativnega delovanja posameznih spojin. Absorbanco radikala smo spremljali prvih 10 minut vsako minuto, nato na 5 minut, dokler nismo dosegli ravnotežnega stanja, ko se je koncentracija DPPH<sup>•</sup> nehala zniževati. Spremembo smo lahko spremljali tudi vizualno, saj se je raztopina s časom vedno bolj razbarvala (iz vijolične v blede rumeno). Pred merjenjem absorbance vzorcev smo izmerili tudi absorbanco same raztopine radikala (brez dodanih vzorcev) v enakih časovnih intervalih in opazovali, če pride do padca absorbance zaradi vpliva UV sevanja, vendar je absorbanca ostala praktično nespremenjena skozi ves čas merjenja. S tem smo potrdili, da UV sevanje samo po sebi ne vpliva na stabilnost radikala.

Meritve smo izvajali na UV spektrofotometru Hewlett Packard 8453, Nemčija.



## 7. EKSPERIMENTALNI DEL

### 7.1. SINTEZA 4-(OKSIRAN-2-ILMETOKSI)BENZONITRILA



#### Postopek:

6,00 g (50,4 mmol) 4-hidroksibenzonitrila smo raztopili v 2 g (50,0 mmol) NaOH in 30 ml vode. Med mešanjem na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 4,68 g (50,0 mmol) epiklorhidrina. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo dodali 50 ml diklorometana, fazi ločili in organsko fazo spirali z 3 x 40 ml 1M HCl, 40 ml vode, nasičeno raztopino NaCl ter sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tako dobljen produkt smo na koncu očistili s pomočjo kolonske kromatografije, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili petroleter/etilacetat = 2/1. Dobili smo 3,50 g (19,98 mmol) bele trdne spojine, ki smo jo nato uporabili pri nadaljnji sintezi amidoksimov.

$\eta$  (**2**) = 40 %

Mr = 175,1 g/mol

Elementna sestava: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>

Tt = 37-41 °C

Rf = 0,36 (silikagel, petroleter/etilacetat=2/1)

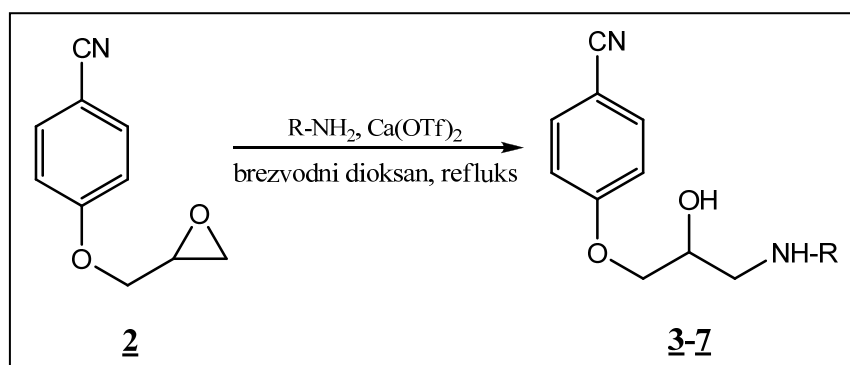
#### Analize 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzonitrila

<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  2.72 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.35 (m, 1H, CH), 3.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.45 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 7.12-7.79 (AA'BB', 4H,  $J=9.0$  Hz,  $\Delta\nu=191.2$  Hz, Ar-H) ppm

MS (EI): m/z (%): 175 (M<sup>+</sup>, 100)

IR (KBr):  $\nu$  3609, 3006, 221, 1605, 1509, 1300, 1259, 1175, 1026, 919, 841, 766 cm<sup>-1</sup>

## 7.2. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO 4-(3-(ALKILAMINO)-2-HIDROKSI PROPOKSI)BENZONITRILA



Spojina **3**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>

Spojina **4**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>

Spojina **5**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>

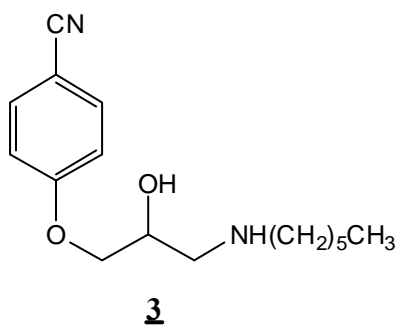
Spojina **6**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>

Spojina **7**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>

### Postopek:

8,57 mmol 4-(oksiran-2-iletoksi)benzonitrila, 4,28 mmol Ca(OTf)<sub>2</sub> in 12,86 mmol alkilamina smo raztopili v 50 ml brezvodnega dioksana ter segrevali ob temperaturi vrenja 6 ur in nato preko noči pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo oborino odfiltrirali s presesavanjem, matičnici pa pod znižanim tlakom odparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze diklorometan/metanol=20/1.

- **4-(3-(HEKSILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI) BENZONITRIL**



Dobili smo 2,05 g (7,42 mmol) belega praška.

$\eta$  (**3**)= 86 %

Mr= 276,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

T<sub>f</sub>= 65-68 °C

R<sub>f</sub>= 0,28 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

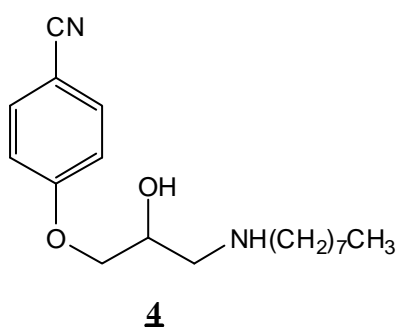
**Analize 4-(3-(heksilamino)-2-hidroksipropoksi)benzonitrila**

**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.85 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.28 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.85 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.57 (s, 1H, OH), 4.05 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.71 (s, 1H, NH), 7.10-7.76 (AA'BB', 4H, *J*=9.0 Hz, Δ*v*=191.5 Hz, Ar-H) ppm

**MS (ESI):** *m/z* (%): 277 (MH<sup>+</sup>, 19), 114 (100)

**IR (KBr):** *v* 3435, 3283, 2928, 2855, 2227, 1606, 1510, 1258, 1162, 1028, 943, 833 cm<sup>-1</sup>

- **4-(3-(OKTILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZONITRIL**



Dobili smo 1,69 g (5,55 mmol) belega praška.

η (**4**)= 73 %

Mr= 304,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

T<sub>f</sub>= 63-66 °C

R<sub>f</sub>= 0,25 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

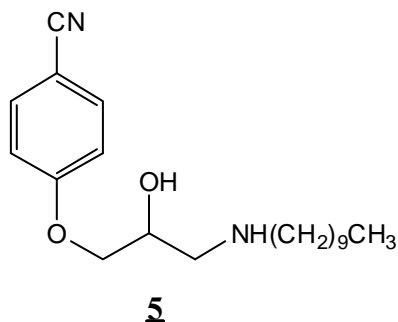
**Analize 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)benzonitrila**

**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.85 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 1.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.64 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.39 (s, 1H, OH), 3.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.07 (m, 1H, CH), 4.86 (s, 1H, NH), 7.09-7.77 (AA'BB', 4H, *J*=9.0 Hz, Δ*v*=193.9 Hz, Ar-H) ppm

**MS (ESI):** *m/z* (%): 305 (MH<sup>+</sup>, 24), 142 (100)

**IR (KBr):** *v* 3484, 3288, 2927, 2855, 2227, 1606, 1511, 1258, 1162, 1026, 951, 833 cm<sup>-1</sup>

- **4-(3-(DECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSIBENZONITRIL**



Dobili smo 2,26 g (6,80 mmol) belega praška.

η (**5**)= 79 %

Mr= 332,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

T<sub>f</sub>= 66-69 °C

R<sub>f</sub>= 0,24 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

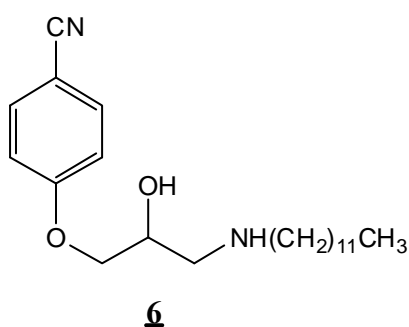
**Analize 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)benzonitrila**

$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.85 (t, 3H,  $J=6.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ ), 1.47 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.77 (m, 4H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.48 (s, 1H, OH), 4.04 (m, 3H,  $\underline{\text{CH-CH}_2\text{-O}}$ ), 5.19 (s, 1H, NH), 7.10-7.78 (AA'BB', 4H,  $J=9.0$  Hz,  $\Delta\nu=195.4$  Hz, Ar-H) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 333 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3482, 3159, 2922, 2852, 2226, 1606, 1510, 1258, 1162, 1117, 1038, 834  $\text{cm}^{-1}$

- **4-(3-(DODECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZONITRIL**



Dobili smo 2,39 g (6,63 mmol) belega praška.

$\eta$  (**6**) = 77 %

$M_r = 360,3 \text{ g/mol}$

Elementna sestava:  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2$

$T_f = 76\text{-}78 \text{ }^\circ\text{C}$

$R_f = 0,24$  (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

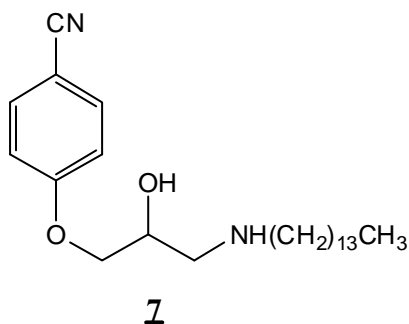
**Analize 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzonitrila**

$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ): 0.85 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (m, 18H,  $\text{CH}_2$ ), 1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.78 (m, 4H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.50 (s, 1H, OH), 4.04 (m, 3H,  $\underline{\text{CH-CH}_2\text{-O}}$ ), 5.53 (s, 1H, NH), 7.10-7.78 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=196.3$  Hz, Ar-H) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 361 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3445, 3288, 2920, 2852, 2227, 1606, 1511, 1258, 1161, 1026, 950, 834  $\text{cm}^{-1}$

- **4-(3-(TETRADECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZONITRIL**



Dobili smo 2,54 g (6,54 mmol) belega praška.

$\eta$  (**7**) = 81 %

$M_r = 388,3 \text{ g/mol}$

Elementna sestava:  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$

$T_f = 72\text{-}76 \text{ }^\circ\text{C}$

$R_f = 0,27$  (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

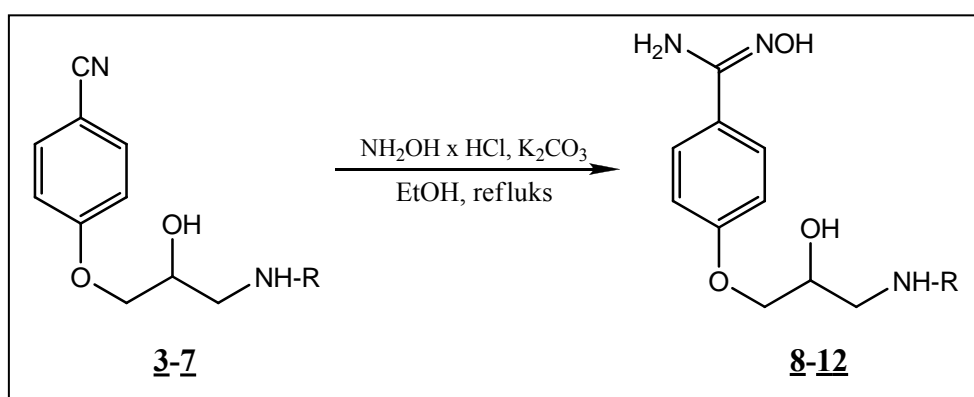
**Analize 4-(3-(tetradecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzonitrila**

**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** 0.85 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 22H, CH<sub>2</sub>), 1.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.55 (s, 1H, OH), 4.04 (m, 3H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.73 (s, 1H, NH), 7.10-7.79 (AA'BB', 4H, *J*=9.0 Hz, Δ*v*=197.5 Hz, Ar-H) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 389 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** ν 3445, 3287, 2920, 2851, 2225, 1605, 1510, 1467, 1257, 1161, 1038, 833 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 389.3168, ugotovljena: 389.3170

**7.3. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO AMIDOKSIMOV**

Spojini **3** in **8**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>

Spojini **4** in **9**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>

Spojini **5** in **10**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>

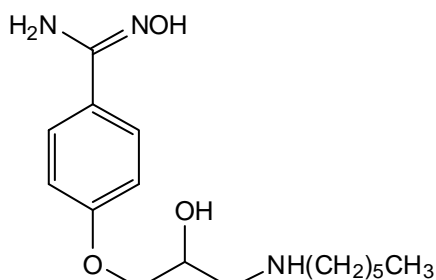
Spojini **6** in **11**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>

Spojini **7** in **12**: R= -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>

**Postopek:**

V bučko smo dodali 7,16 mmol 4-(3-(alkilamino)-2-hidroksipropoksi)benzonitrila 10,80 mmol hidrosilamonijevega klorida 7,16mmol kalijevega karbonata in 50 ml absolutnega etanola ter preko noči segrevali pri temperaturi vrenja. Po končani reakciji smo topilo odparili pod nižanim tlakom. Tako dobljen produkt smo na koncu prekrizalizirali iz etanola.

• **4-(3-(HEKSILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)-N'-HIDROKSI  
BENZIMIDAMID**



**8**

Dobili smo 0,89 g (2,88 mmol) belega praška.

$\eta$  (**8**)= 40 %

Mr= 309,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>=173-178 °C

R<sub>f</sub>= 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=7/1)

**Analize 4-(3-(heksilamino)-2-hidroksipropoksi)-N'-hidroksibenzimidamida**

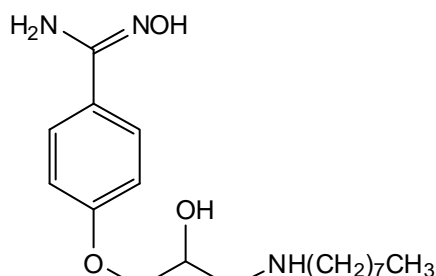
<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.87 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.30 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.55 (m, 1H, CH), 5.72 (s, 1H, NH), 5.85 (s, 1H, OH), 6.93-7.63 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =201.1 Hz, Ar-H), 8.68 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.44 (s, 1H, NOH) ppm

MS (ESI): m/z (%): 310 (MH<sup>+</sup>, 17), 77 (100)

IR (KBr):  $\nu$  3295, 2929, 2854, 1641, 1519, 1381, 1251, 1180, 1113, 1034, 916, 832 cm<sup>-1</sup>

HR-MS (FAB<sup>+</sup>): Izračunana za C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 310.2131, ugotovljena: 310.21130

• **4-(3-(OKTILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)-N'-HIDROKSI  
BENZIMIDAMID**



**9**

Dobili smo 0,99 g (2,94 mmol) belega praška.

$\eta$  (**9**)= 57 %

Mr= 337,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>=176-180 °C

R<sub>f</sub>= 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=7/1)

**Analize 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)-N'-hidroksibenzimidamida**

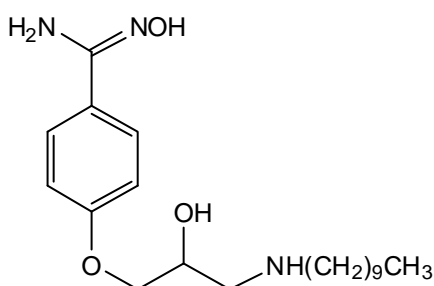
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.87 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.27 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.03 (m, 4H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.21 (m, 1H, CH), 5.73 (s, 1H, NH), 5.86 (s, 1H, OH), 6.93-7.63 (AA'BB', 4H,  $J=9.0$  Hz,  $\Delta\nu=201.4$  Hz, Ar-H), 8.75 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.45 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 338 ( $\text{MH}^+$ , 24), 77 (100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3264, 2924, 2855, 1642, 1522, 1368, 1256, 1184, 1120, 940, 832  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB $^+$ ):** Izračunana za  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_3$ : 338.2444, ugotovljena: 338.2436

• **4-(3-(DECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)-N'-HIDROKSI BENZIMIDAMID**

**10**

Dobili smo 0,98 g (2,68 mmol) belega praška.

$\eta$  (**10**)= 40 %

$M_r$ = 365,3 g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$

$T_f$ =183-186  $^{\circ}\text{C}$

$R_f$ = 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=7/1)

**Analize 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)-N'-hidroksibenzimidamida**

$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.86 (t, 3H,  $J=6.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.02 (m, 4H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.22 (m, 1H, CH), 5.72 (s, 1H, NH), 5.87 (s, 1H, OH), 6.93-7.63 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=201.1$  Hz, Ar-H), 8.84 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.45 (s, 1H, NOH) ppm

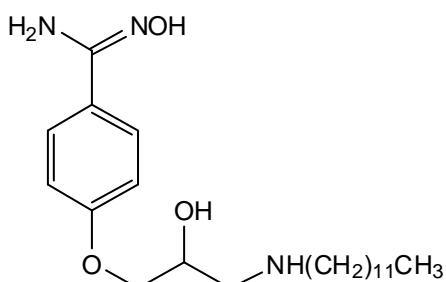
**MS (ESI):** m/z (%): 366 ( $\text{MH}^+$ , 11), 77 (100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3263, 2920, 2855, 1634, 1521, 1368, 1259, 1176, 1121, 1046, 926, 831  $\text{cm}^{-1}$

**ELEMENTNA ANALIZA** za  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$  ( $M=419,30$  g/mol):

Izračunano: 57.25 % C, 9.85 % H, 10.02 % N, izmerjeno: 57.55 % C, 9.25 % H, 9.90 % N

• **4-(3-(DODECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)-N'-HIDROKSI  
BENZIMIDAMID**

**11**

Dobili smo 1,45 g ( 3,69 mmol) belega praška.

$\eta$  (**11**)= 58 %

Mr= 393,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>=178-183 °C

R<sub>f</sub>= 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=7/1)

**Analize 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)-N'-hidroksibenzimidamida**

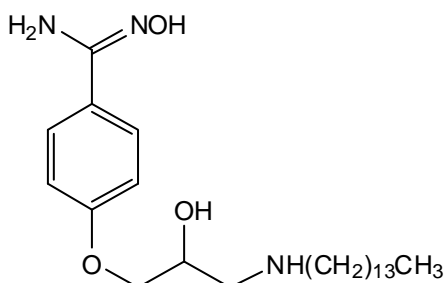
<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.86 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 1.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.02 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.18 (m, 1H, CH), 5.71 (s, 1H, NH), 5.82 (s, 1H, OH), 6.93-7.63 (AA'BB', 4H, *J*=9.0 Hz,  $\Delta\nu$ =202.0 Hz, Ar-H), 8.56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.44 (s, 1H, NOH) ppm

MS (ESI): *m/z* (%): 394 (MH<sup>+</sup>, 17), 77 (100)

IR (KBr):  $\nu$  3343, 2922, 2850, 1651, 1522, 1378, 1255, 1181, 1121, 1043, 923, 830 cm<sup>-1</sup>

HR-MS (FAB<sup>+</sup>): Izračunana za C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 394.3070, ugotovljena: 394.3058

• **4-(3-(TETRADECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)-N'-HIDROKSI  
BENZIMIDAMID**

**12**

Dobili smo 1,77 g (4,20 mmol) belega praška.

$\eta$  (**12**)= 67 %

Mr= 421,3 g/mol

Elementna analiza: C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>=186-189 °C

R<sub>f</sub>= 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=7/1)



**Analize 4-(3-(tetradecilamino)-2-hidroksipropoksi)-N'-hidroksibenzimidamida**

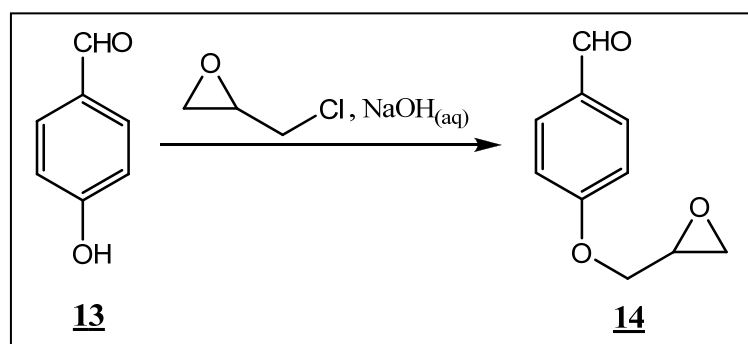
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.85 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (m, 22H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.02 (m, 4H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ); 3.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.21 (m, 1H, CH), 5.72 (s, 1H, NH), 5.87 (s, 1H, OH), 6.93-7.63 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=201.4$  Hz, Ar-H), 8.81 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.44 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):**  $m/z$  (%): 394 ( $\text{MH}^+$ , 3), 77 (100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3341, 2921, 2849, 1651, 1522, 1376, 1255, 1180, 1119, 1044, 830  $\text{cm}^{-1}$

**ELEMENTNA ANALIZA** za  $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_3 \times 5/2 \text{H}_2\text{O}$  ( $M=419,30$  g/mol):

Izračunano: 61.77 % C, 10.37 % H, 9.00 % N, izmerjeno: 61.84 % C, 9.98 % H, 8.87 % N

**7.4. SINTEZA 4-(OKSIRAN-2-ILMETOKSI)BENZALDEHIDA****Postopek:**

6,10 g (50,00 mmol) 4-hidroksibenzaldehyda smo raztopili v 2 g (50,00 mmol) NaOH in 30 ml vode. Med mešanjem na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 4,68 g (50,00 mmol) epiklorhidrina. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo dodali 50 ml diklorometana, fazi ločili in organsko fazo spirali z 3 x 40 ml 1M HCl, 40 ml vode, nasičeno raztopino NaCl ter sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tako dobljen produkt smo na koncu očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili petroleter/etilacetat = 2/1. Dobili smo 3,25 g (18,23 mmol) bele trdne spojine, ki smo jo uporabili v naslednji stopnji sinteze oksimov.

$\eta$  (**14**) = 36 %

$M_r = 178,1$  g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$

$T_t = 26-30$  °C

R<sub>f</sub> = 0,36 (silikagel, petroleter/etilacetat=2/1)

**Analize 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzaldehyda**

<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (m, 1H, CH), 3.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.47 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 7.14-7.88 (AA'BB', 4H, J=8.7 Hz, Δν=214.6 Hz, Ar-H), 9.88 (s, 1H, CHO) ppm

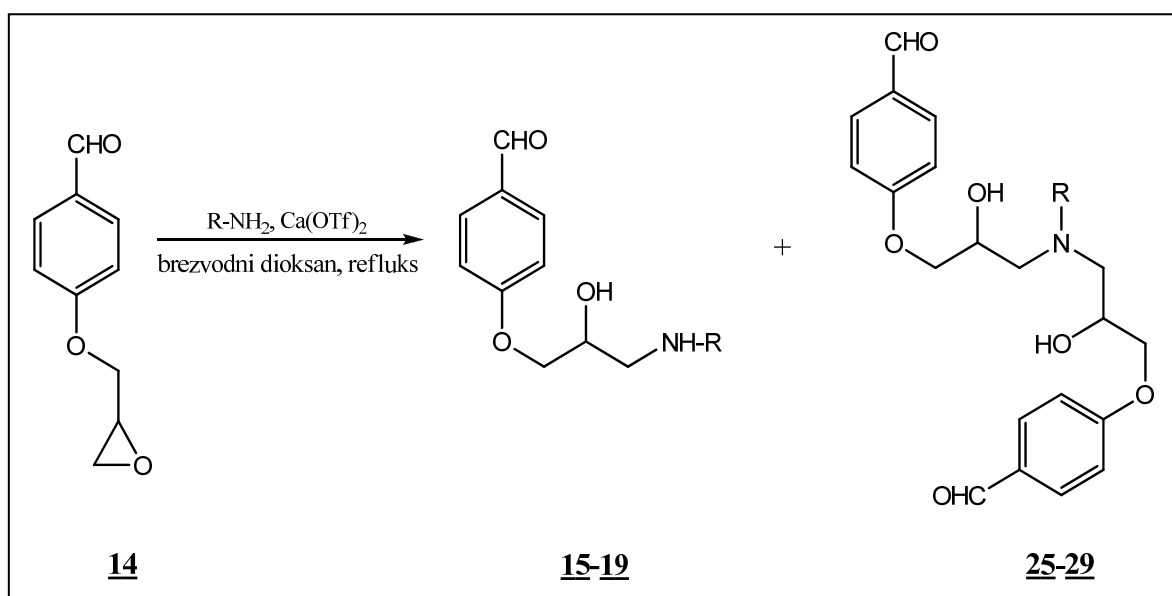
MS (EI): m/z (%): 178 (M<sup>+</sup>, 100)

IR (KBr): ν 3675, 3069, 1681, 1600, 1576, 1424, 1303, 1246, 1163, 1024, 911, 837 cm<sup>-1</sup>

ELEMENTNA ANALIZA za C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (M = 178,06 g/mol):

Izračunano: 67.41 % C, 5.66 % H, 0 % N, izmerjeno: 66.77 % C, 5.78 % H, 0 % N

**7.5. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO 4-(3-(ALKILAMINO)-2-HIDROKSI PROPOKSI)BENZALDEHIDA IN 4-(3-(ALKIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL) FENOKSI) PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHIDA**



Spojini 15 in 25: R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>

Spojini 16 in 26: R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>

Spojini 17 in 27: R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>

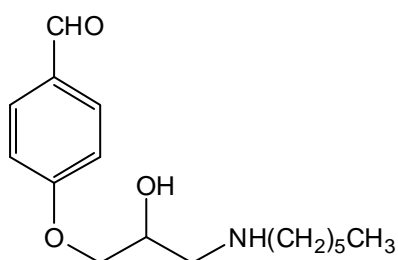
Spojini 18 in 28: R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>

Spojini 19 in 29: R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>

**Postopek:**

2,81 mmol 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzaldehyda, 1,41 mmol  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$  in (5,62 mmol) alkililamina smo raztopili v 15 ml brezvodnega dioksana ter 6 ur segrevali pri temperaturi vrenja. Potek reakcije smo spremljali s TLC in ugotovili, da sta se pojavili 2 lisi, obe nižje od izhodne spojine. Po končani reakciji smo oborino odfiltrirali s presesavanjem, matičnici pa pod znižanim tlakom odparili topilo. Tako dobljen produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze diklorometan/metanol = 20/1 ter pri tem dobili rumene oljnate tekočine (dimeri spojin **25-29**), ki so na TLC ploščici predstavljali zgornjo liso ter derivat monomera (rumena viskozna tekočina), spodnja lisa na TLC, ki smo mu dodali še 5 ml 1M HCl, segrevali ob refluxu 1 uro, uparili topilo, in tako dobili trdne monomere (**15-19**).

- **4-(3-(HEKSILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**15**

Dobili smo 0,34 g (1,22 mmol) svetlo rumene trdne spojine.

$\eta$  (**15**) = 43 %

Mr = 279,4 g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_3$

$T_f$  = 78-82 °C

$R_f$  = 0,20 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(heksilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyda**

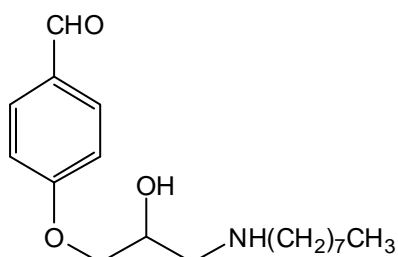
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.29 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 1.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.97 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.15 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 4.10 (d, 2H,  $J=5.1$  Hz,  $\underline{\text{CH}_2\text{-O}}$ ), 4.20 (m, 1H, CH), 5.91 (s, 1H, OH), 7.14-7.91 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=222.1$  Hz, Ar-H), 8.57 (širok signal, 1H, NH), 9.89 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 280 ( $\text{MH}^+$ , 20), 141(100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3479, 2957, 2860, 1685, 1606, 1582, 1509, 1249, 1161, 1039, 828  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_3$ : 280.1913, ugotovljena: 280.1902

• **4-(3-(OKTILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**16**

Dobili smo 0,59 g (1,92mmol) oranžne poltrdne spojine.

$\eta$  (**16**) = 34 %

$M_r = 307,2$  g/mol

Elementna sestava:  $C_{18}H_{29}NO_3$

$R_f = 0,20$  (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehida**

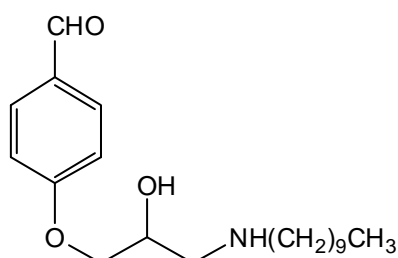
$^1H$  NMR (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.87 (t, 3H,  $J=6.3$  Hz,  $CH_3$ ), 1.27 (m, 10H,  $CH_2$ ), 1.64 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2.96 (m, 2H,  $\underline{CH_2}$ -NH), 3.16 (m, 2H,  $\underline{CH_2}$ -NH), 4.10 (d, 2H,  $J=5.1$  Hz,  $\underline{CH_2}$ -O), 4.22 (m, 1H,  $\underline{CH}$ - $CH_2$ -O), 5.91 (s, 1H, OH), 7.14-7.91 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta v=220.9$  Hz, Ar-H), 8.67 (širok signal, 1H, NH), 9.89 (s, 1H, CHO) ppm

MS (ESI):  $m/z$  (%): 308 ( $MH^+$ , 100)

IR (KBr):  $\nu$  3468, 2924, 2855, 1681, 1600, 1581, 1508, 1242, 1160, 1031, 829  $cm^{-1}$

HR-MS (FAB $^+$ ): Izračunana za  $C_{18}H_{30}NO_3$ : 308.2226, ugotovljena: 308.2226

• **4-(3-(DECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**17**

Dobili smo 0,95 g (2,83 mmol) rumeno oranžne trdne spojine.

$\eta$  (**17**) = 51 %

$M_r = 335,3$  g/mol

Elementna sestava:  $C_{20}H_{33}NO_3$

$T_f = 100-104$  °C

$R_f = 0,19$  (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyda**

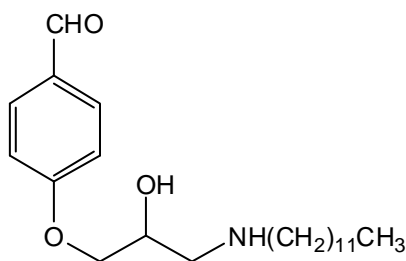
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.86 (t, 3H,  $J=6.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.26 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.96 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.14 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 4.11 (d, 2H,  $J=5.1$  Hz,  $\underline{\text{CH}_2\text{-O}}$ ), 4.24 (m, 1H,  $\underline{\text{CH-CH}_2\text{-O}}$ ), 5.93 (s, 1H, OH), 7.14-7.90 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=220.0$  Hz, Ar-H), 8.80 (širok signal, 1H, NH), 9.89 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 336 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3413, 2921, 2852, 1681, 1601, 1582, 1508, 1245, 1159, 1038, 830  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB $^+$ ):** Izračunana za  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NO}_3$ : 336.2539, ugotovljena: 336.2528

- **4-(3-(DODECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**18**

Dobili smo 1,26 g (3,47 mmol) blede rumene trdne spojine.

$\eta$  (**18**) = 62 %

$M_r = 363,3$  g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{NO}_3$

$T_f = 120\text{-}125$  °C

$R_f = 0,20$  (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyda**

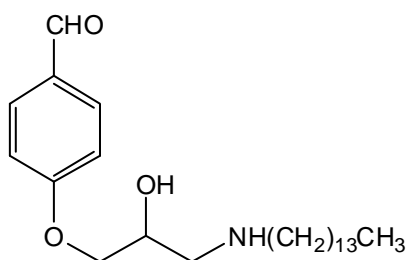
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.86 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (m, 18H,  $\text{CH}_2$ ), 1.63 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.94 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 3.15 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 4.11 (d, 2H,  $J=5.1$  Hz,  $\underline{\text{CH}_2\text{-O}}$ ), 4.23 (m, 1H,  $\underline{\text{CH-CH}_2\text{-O}}$ ), 5.92 (s, 1H, OH), 7.14-7.91 (AA'BB', 4H,  $J=9.0$  Hz,  $\Delta\nu=220.6$  Hz, Ar-H), 8.76 (širok signal, 1H, NH), 9.89 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 364 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3413, 2920, 2850, 1681, 1601, 1583, 1508, 1244, 1158, 1038, 832  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB $^+$ ):** Izračunana za  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{NO}_3$ : 364.2852, ugotovljena: 364.2845

• **4-(3-(TETRADECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**19**

Dobili smo 0,37 g (0,95 mmol) blede rumene trdne spojine.

$\eta$  (**19**) = 17 %

Mr= 391,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>= 69-74 °C

R<sub>f</sub>= 0,20 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(tetradecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehida**

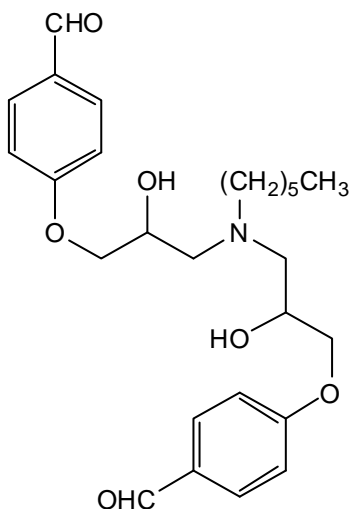
<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.86 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25 (m, 1H, 22H, CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.11 (d, 2H, *J*=5.1 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.17 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.93 (s, 1H, OH), 7.14-7.91 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =220.6 Hz, Ar-H), 8.74 (širok signal, 1H, NH), 9.89 (s, 1H, CHO) ppm

MS (ESI): m/z (%): 392 (MH<sup>+</sup>, 100)

IR (KBr):  $\nu$  2920, 2851, 1684, 1603, 1578, 1508, 1468, 1252, 1164, 1030, 832 cm<sup>-1</sup>

HR-MS (FAB<sup>+</sup>): Izračunana za C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>3</sub>: 392.3165, ugotovljena: 364.392.3163

• **4-(3-(HEKSIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**25**

Dobili smo 0,21 g (0,48 mmol) rumene oljnate tekočine.

$\eta$  (**25**) = 8 %

Mr= 457,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

R<sub>f</sub>=0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(heksil(2-hidroksi-3-(4-(formil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksi propoksi)benzaldehyda**

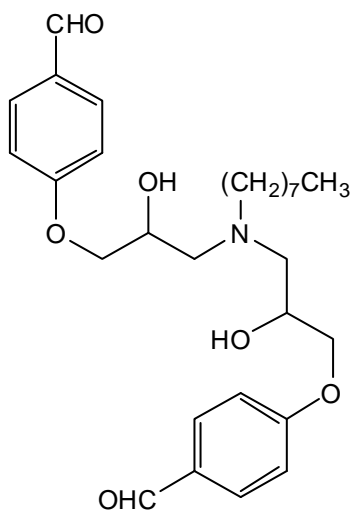
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.77 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.14 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.32 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.44 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.00 (m, 6H,  $\text{CH-CH}_2\text{-O}$ ); 4.93 (s, 2H, OH), 7.01-7.81 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=230.2$  Hz, Ar-H), 7.06-7.84 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=224.5$  Hz, Ar-H), 9.83 (s, 2H, CHO), 9.85 (s, 1H, CHO)

**MS (ESI):** m/z (%): 458 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3404, 2929, 2856, 1689, 1601, 1510, 1310, 1257, 1161, 1029, 832  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB $^+$ ):** Izračunana za  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_6$ : 458.2453, ugotovljena: 458.2525

• **4-(3-(OKTIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**



**26**

Dobili smo 0,87 g (1,79 mmol) rumene oljnate tekočine.

$\eta$  (**26**) = 16 %

$M_r$  = 485,3 g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6$

$R_f$  = 0,35 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(oktil(2-hidroksi-3-(4-(formil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyda**

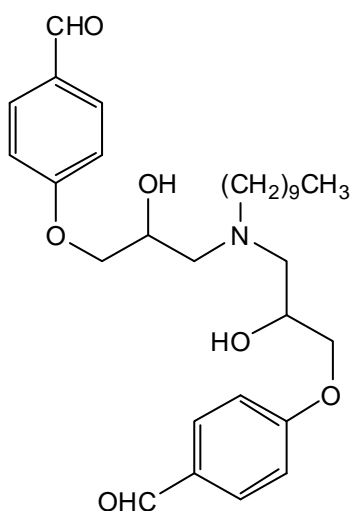
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.80 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.11 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1.34 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.43 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.00 (m, 6H,  $\text{CH-CH}_2\text{-O}$ ); 4.92 (s, 1H, OH), 4.94 (s, 1H, OH), 7.01-7.81 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=229.9$  Hz, Ar-H), 7.04-7.84 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=224.2$  Hz, Ar-H), 9.84 (s, 1H, CHO), 9.85 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 486 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3410, 2926, 2854, 1686, 1601, 1509, 1312, 1259, 1161, 1029, 832  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB $^+$ ):** Izračunana za  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_6$ : 486.2856, ugotovljena: 486.2858

- **4-(3-(DECIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

27

Dobili smo 0,55 g (1,07 mmol) rumene viskozne tekočine.

$\eta$  (**27**) = 10 %

Mr= 513,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

R<sub>f</sub>= 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(decil(2-hidroksi-3-(4-(formil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehida**

**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0.83 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (m, 14H, CH<sub>2</sub>), 1.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.48 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-N), 4.02 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.93 (s, 2H, OH), 7.01-7.81 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=229.9$  Hz, Ar-H), 7.06-7.84 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=223.9$  Hz, Ar-H), 9.83 (s, 1H, CHO), 9.85 (s, 1H, CHO) ppm

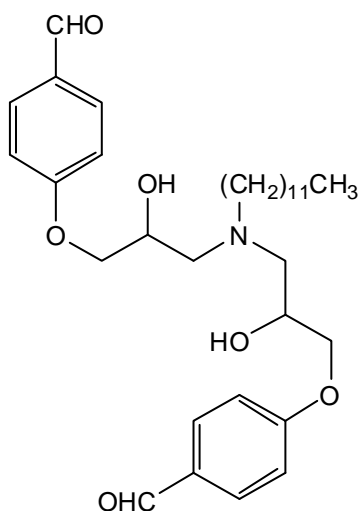
**MS (ESI):** m/z (%): 514 (MH<sup>+</sup>, 38), 77 (100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3412, 2925, 2853, 1690, 1601, 1510, 1311, 1257, 1161, 1030, 832 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 514.3169, ugotovljena: 514.3163



• **4-(3-(DODECIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL)FENOKSI)PROPILO)AMINO)-2-HIDROKSI-PROPOKSI)BENZALDEHID**



**28**

Dobili smo 0,33 g (0,61 mmol) rumena oljnatu viskozno tekočino.

$\eta$  (**28**) = 5 %

$M_r$  = 541,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>32</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

$R_f$  = 0,32 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(dodecil(2-hidroksi-3-(4-(formil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksi propoksi)benzaldehida**

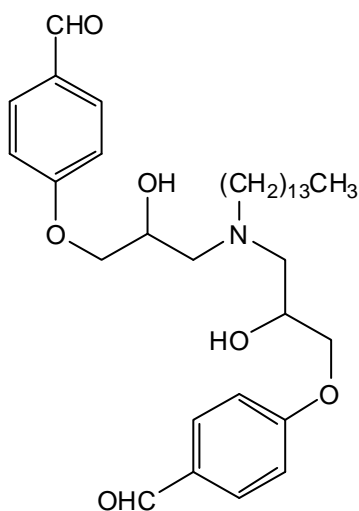
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0.84 (t, 3H,  $J$ =6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.16 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.43 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-N), 4.02 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.93 (s, 2H, OH), 7.01-7.78 (AA'BB', 4H,  $J$ =8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =229.9 Hz, Ar-H), 7.06-7.84 (AA'BB', 4H,  $J$ =8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =223.9 Hz, Ar-H), 9.83 (s, 1H, CHO), 9.85 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 542 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3409, 2925, 2853, 1689, 1601, 1509, 1311, 1259, 1161, 1030, 832 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 542.3482, ugotovljena: 542.3485

- **4-(3-(TETRADECIL(2-HIDROKSI-3-(4-(FORMIL)FENOKSI)PROPILO)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID**

**29**

Dobili smo 0,66 g (1,16 mmol) rumene oljnate viskozne tekočine.

$\eta$  (**29**) = 10 %

Mr= 569,4 g/mol

Elementna sestava: C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

R<sub>f</sub>= 0,35 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize** 4-(3-(tetradecil(2-hidroksi-3-(4-(formil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksi propoksi)benzaldehida

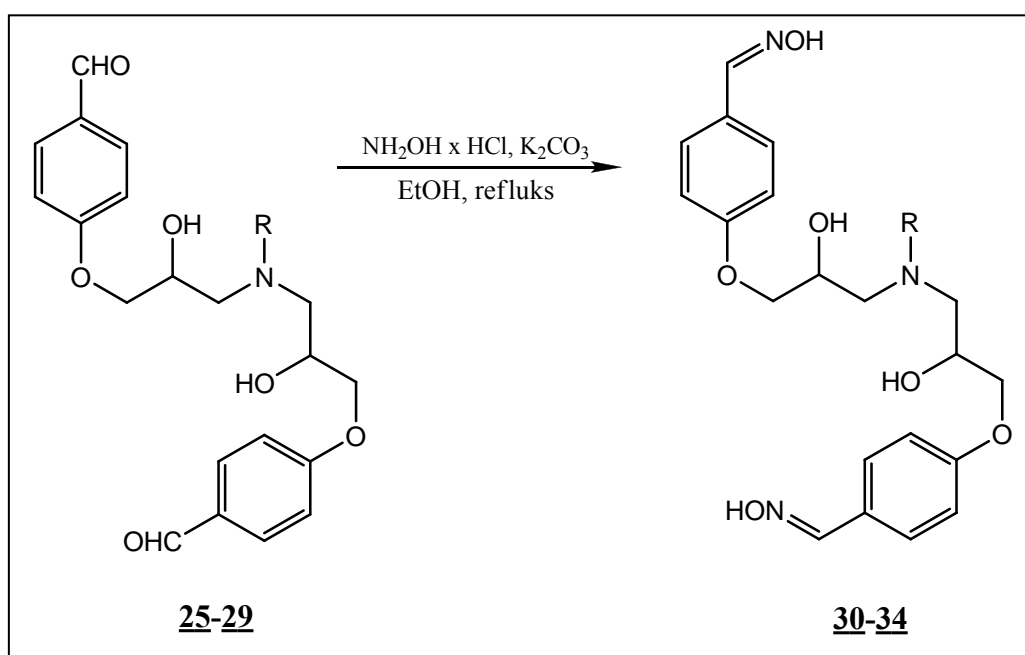
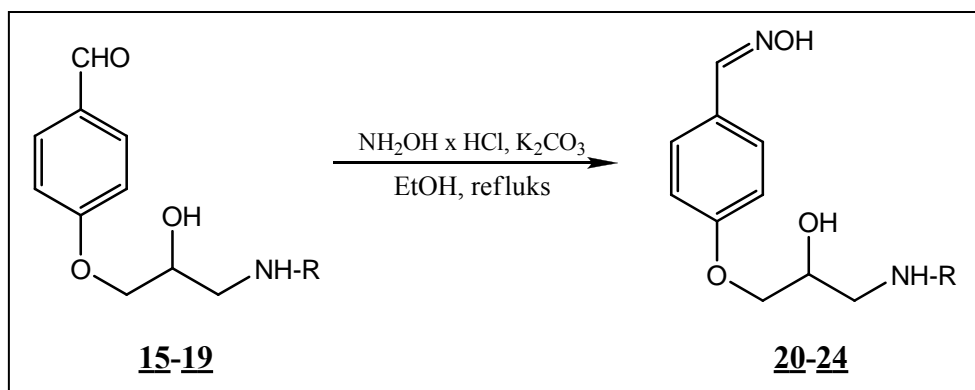
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0.85 (t, 3H,  $J=6.3$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.19 (m, 22H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N), 2.66 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-N); 4.02 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.94 (s, 2H, OH), 7.01-7.81 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=229.9$  Hz, Ar-H), 7.06-7.84 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=223.9$  Hz, Ar-H), 9.83 (s, 1H, CHO), 9.85 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 570 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3382, 2924, 2853, 1689, 1601, 1509, 1311, 1259, 1160, 1030, 832 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 570.3795, ugotovljena: 570.3807

## 7.6. SPLOŠNI PREDPIS SINTEZE OKSIMOV



Spojini **15**, **20**, **25** in **30**: R=  $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$

Spojini **16**, **21**, **26** in **31**: R=  $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

Spojini **17**, **22**, **27** in **32**: R=  $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$

Spojini **18**, **23**, **28** in **33**: R=  $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$

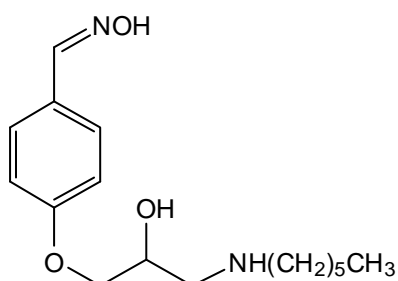
Spojini **19**, **24**, **29** in **34**: R=  $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

**Postopek:**

V bučko smo dodali 1,15 mmol ustreznega aldehida, prebitek hidrosilamonijevega klorida, kalijevega karbonata in 10 ml absolutnega etanola ter segrevali preko noči pri temperaturi vrenja. Reakcijsko zmes smo po končani reakciji ohladili, oborino odfiltrirali s presesavanjem, matičnici pa pod znižanim tlakom odparili topilo. Surov produkt smo pri

spojinah **20**, **21**, **24** ter **30-34** očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze diklorometan/metanol=20/1, spojini **22** in **23** pa smo prekrystalizirali iz etanola.

• **4-(3-(HEKSILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**



**20**

Dobili smo 0,19 g (0,65 mmol) svetlo rumenega praška.

$\eta$  (**20**)= 56 %

Mr= 294,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>= 104-109 °C

R<sub>f</sub>= 0,15 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(heksilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

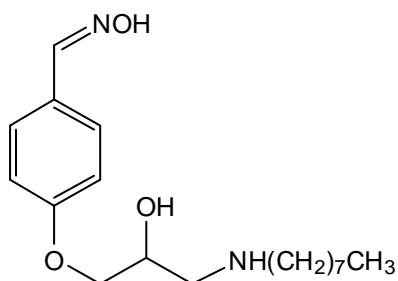
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J=6.6$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1.28 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.99 (d, 2H,  $J=5.4$  Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.12 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.75 (s, 1H, OH), 6.97-7.55 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=167.5$  Hz, Ar-H), 8.07 (s, 2H, CH-NOH), 8,61 (širok signal, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 295 (MH<sup>+</sup>, 70), 77 (100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3447, 2931, 2858, 1611, 1516, 1457, 1240, 1168, 1107, 1036, 965, 832 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 295.2022, ugotovljena: 295.2030

• **4-(3-(OKTILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**



**21**

Dobili smo 0,38 g (1,18 mmol) svetlo rumenega praška.

$\eta$  (**21**)= 62 %

Mr= 322,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>= 81-85 °C

R<sub>f</sub>= 0,16 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

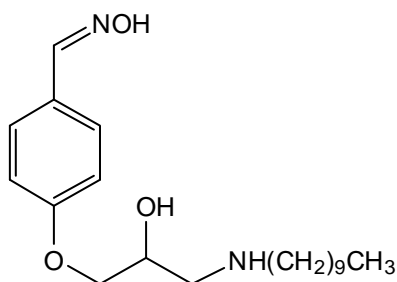
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.87 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.27 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.99 (d, 2H, *J*=5.1 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.12 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.76 (s, 1H, OH), 6.97-7.55 (AA'BB', 4H, *J*=9.0 Hz, Δ*v*=167.2 Hz, Ar-H), 8.07(s, 1H, CH-NOH), 8,61 (širok signal, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 323 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** ν 3446, 2926, 2856, 1610, 1516, 1457, 1238, 1171, 1113, 1035, 965, 832 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 323.2335, ugotovljena: 323.2328

- **4-(3-(DECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**22**

Dobili smo 0,46 g (1,31 mmol) belega praška.

η (**22**)= 46 %

Mr: 350,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>= 167-171 °C

R<sub>f</sub>= 0,17 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

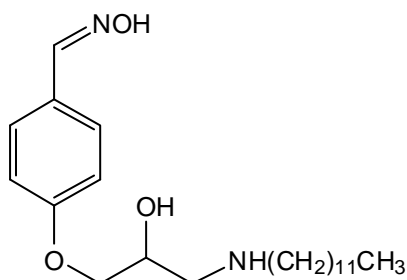
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.86 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 14H, CH<sub>2</sub>), 1.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.00 (d, 2H, *J*=5.1 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.21 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.88 (s, 1H, OH), 6.97-7.55 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz, Δ*v*=164.8 Hz, Ar-H), 8.07(s, 1H, CH-NOH), 8,76 (širok signal, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 351 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** ν 3394, 2924, 2852, 1609, 1518, 1466, 1250, 1176, 1119, 1046, 939, 816 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 351.2648, ugotovljena: 351.1647

• **4-(3-(DODECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**23**

Dobili smo 0,81 g (2,14 mmol) belega praška.

$\eta$  (**23**)= 62 %

Mr: 378,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>= 172-175 °C

R<sub>f</sub>= 0,15 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

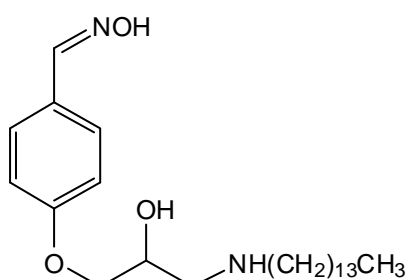
<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.86 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 1.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.00 (d, 2H, *J*=5.4 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 4.19 (m, 1H, CH), 5.86 (s, 1H, OH), 6.97-7.55 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =166.0 Hz, Ar-H), 8.07 (s, 1H, CH-NOH), 8.63 (širok signal, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NOH) ppm

MS (ESI): m/z (%): 379 (MH<sup>+</sup>, 100)

IR (KBr):  $\nu$  3410, 2923, 2850, 1609, 1517, 1465, 1249, 1175, 1115, 1045, 939, 815 cm<sup>-1</sup>

HR-MS (FAB<sup>+</sup>): Izračunana za C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 379.2961, ugotovljena: 379.2956

• **4-(3-(TETRADECILAMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**24**

Dobili smo 0,21 g (0,52 mmol) svetlo rumenega praška.

$\eta$  (**24**)= 55 %

Mr: 406,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>f</sub>= 83-87 °C

R<sub>f</sub>= 0,16 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(tetradecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.86 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 22H, CH<sub>2</sub>), 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 3.98 (d, 2H, *J*=4.8 Hz,

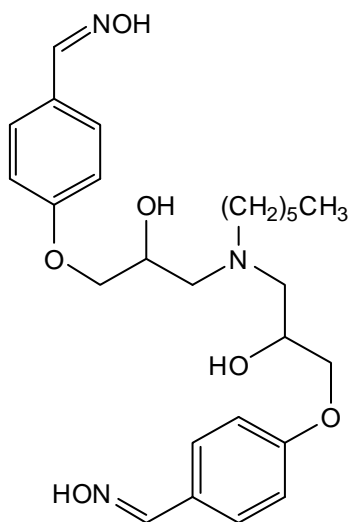
CH<sub>2</sub>-O), 4.08 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 5.75 (s, 1H, OH), 6.96-7.55 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=167.5$  Hz, Ar-H), 8.07 (s, 1H, CH-NH), 8.62 (širok signal, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 407 (MH<sup>+</sup>, 60), 77 (100)

**IR (KBr):**  $\nu$  3436, 2919, 2850, 1610, 1516, 1469, 1240, 1167, 1037, 966, 833 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 407.3274, ugotovljena: 407.3264

- **4-(3-(HEKSIL(2-HIDROKSI-3-(4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**



**30**

Dobili smo 0,19 g (0,39 mmol) svetlo rumene poltrdne spojine.

$\eta$  (**30**)= 48 %

Mr= 487,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

R<sub>f</sub>= 0,22 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(heksil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

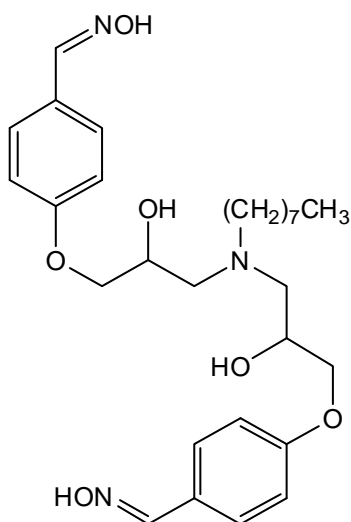
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0.78 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N), 2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N); 3.97 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O), 4.86 (s, 2H, OH), 6.87-7.49 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=177.4$  Hz, Ar-H), 6.90-7.50 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta\nu=172.0$  Hz, Ar-H), 8.04 (s, 1H, CH-NOH), 8.05 (s, 1H, CH-NOH), 10.92 (s, 2H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 488 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3307, 2928, 1606, 1514, 1458, 1302, 1249, 1173, 1035, 953, 830 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 488.2682, ugotovljena: 488.2714

- **4-(3-(OKTIL(2-HIDROKSI-3-(4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**31**

Dobili smo 0,49 g (0,95 mmol) rumenega poltrdnega oksima.

$\eta$  (**31**)= 53 %

Mr= 515,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

R<sub>f</sub>= 0,30 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize** 4-(3-(oktil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima

<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.81 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.18 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 1.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N), 2.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 3.94 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.85 (m, 2H, OH), 6.87-7.49 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =177,4 Hz, Ar-H), 6.87-7.49 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =172,3 Hz, Ar-H), 8.04 (s, 1H, CH-NOH), 8.05 (s, 1H, CH-NOH), 10.92 (s, 2H, NOH) ppm

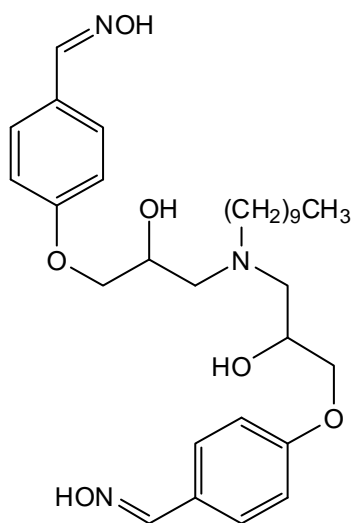
**MS (ESI):** m/z (%): 516 (MH<sup>+</sup>, 60), 77 (100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3308, 2926, 2854, 1607, 1514, 1458, 1303, 1250, 1173, 1037, 955, 830 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 516.3074 , ugotovljena: 516.3074



- **4-(3-(DECIL(2-HIDROKSI-3-(4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**32**

Dobili smo 0,28 g (0,52 mmol) bele trdne spojine.

$\eta$  (**32**)= 47 %

Mr= 543,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

T<sub>f</sub>= 88-92 °C

R<sub>f</sub>= 0,25 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize** 4-(3-(decil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima

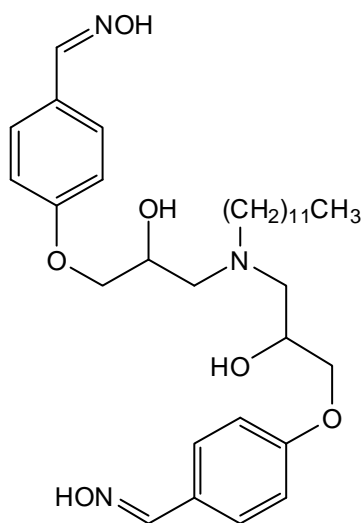
<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.83 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.14 (m, 14H, CH<sub>2</sub>), 1.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.42 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N), 2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 3.94 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.85 (m, 2H, OH), 6.87-7.49 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =177,4 Hz, Ar-H), 6.90-7.50 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =172,0 Hz, Ar-H), 8.04 (s, 1H, CH-NOH), 8.05 (s, 1H, CH-NOH), 10.92 (s, 2H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 544 (MH<sup>+</sup>, 15), 77 (100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3308, 2924, 2853, 1606, 1514, 1458, 1302, 1250, 1173, 1036, 830 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 544.3389, ugotovljena: 544.3387

- **4-(3-(DODECIL(2-HIDROKSI-3-(4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**33**

Dobili smo 0,10 g (0,18 mmol) bele trdne spojine.

$\eta$  (**33**)= 28 %

Mr= 571,4 g/mol

Elementna sestava: C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

T<sub>f</sub>= 92-95 °C

R<sub>f</sub>= 0,28 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(dodecil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

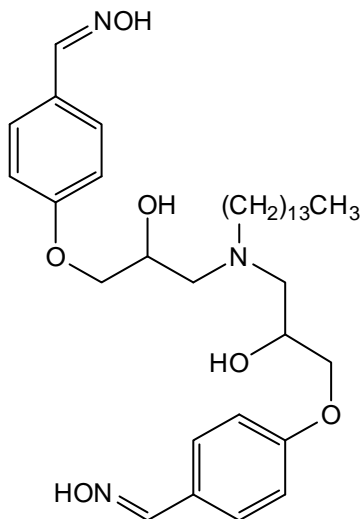
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0.85 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.17 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 1.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N), 2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.93 (m, 6H, CH-CH<sub>2</sub>-O); 4.86 (m, 2H, OH), 6.87-7.49 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =176,8 Hz, Ar-H), 6.90-7.50 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =171,7 Hz, Ar-H), 8.03 (s, 1H, CH-NOH), 8.04 (s, 1H, CH-NOH), 10.92 (s, 2H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 572 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  3308, 2923, 2852, 1606, 1514, 1458, 1302, 1250, 1173, 1035, 954, 830 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: 532.3700 , ugotovljena: 532.3690

- **4-(3-(TETRADECIL(2-HIDROKSI-3-(4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENOKSI)PROPIL)AMINO)-2-HIDROKSIPROPOKSI)BENZALDEHID OKSIM**

**34**

Dobili smo 0,23 g (0,38 mmol) bele trdne končne spojine.

$\eta$  (**34**)= 60 %

$M_r$ = 599,4 g/mol

Elementna sestava:  $C_{34}H_{53}N_3O_6$

$T_f$ = 98-102 °C

$R_f$ = 0,23 (silikagel, diklorometan/metanol=20/1)

**Analize 4-(3-(tetradecil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksima**

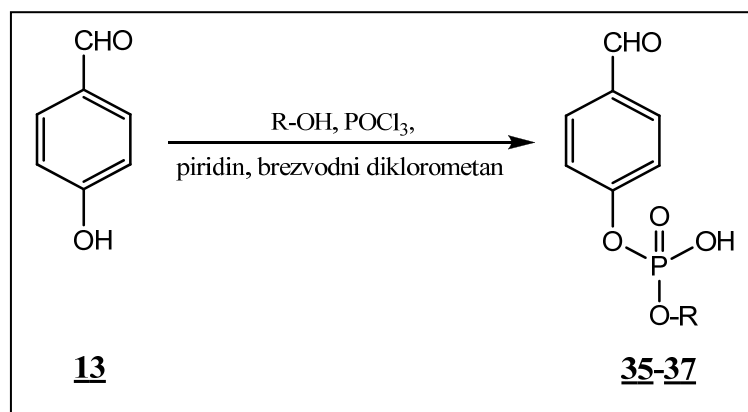
$^1H$  NMR (300,15 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.85 (m, 3H,  $CH_3$ ), 1.18 (m, 22H,  $CH_2$ ), 1.34 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2.41 (m, 4H,  $\underline{CH_2}$ -N), 2.67 (m, 2H,  $\underline{CH_2}$ -N), 3.93 (m, 6H,  $\underline{CH}$ - $\underline{CH_2}$ -O); 4.85 (m, 2H, OH), 6.87-7.48 (AA'BB', 4H,  $J=9.0$  Hz,  $\Delta v=176.5$  Hz, Ar-H), 6.90-7.50 (AA'BB', 4H,  $J=8.7$  Hz,  $\Delta v=171,4$  Hz, Ar-H), 8.03 (s, 1H,  $\underline{CH}$ -NOH), 8.04 (s, 1H,  $\underline{CH}$ -NOH), 10.91 (s, 2H, NOH) ppm

MS (ESI): m/z (%): 600 ( $MH^+$ , 100)

IR (NaCl):  $\nu$  3307, 2924, 2852, 1606, 1514, 1458, 1302, 1250, 1173, 1036, 954, 829  $cm^{-1}$

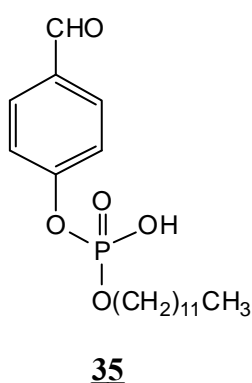
HR-MS (FAB $^+$ ): Izračunana za  $C_{34}H_{54}N_3O_6$ : 600.4013, ugotovljena: 600.4023

## 7.7. SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO ALKIL 4-FORMILHIDROGENFOSFATOV

**Postopek:**

Raztopino ustreznega alkohola (16,1 mmol) in piridina (10 ml) v brezvodnem diklorometanu (30 ml) smo po kapljicah dodajali raztopini fosforjevega oksiklorida (18,0 mmol) v brezvodnem diklorometanu (15 ml) pri 0°C. Na ledeni kopeli smo mešali še 2uri, nato pa po kapljicah dodali še 4-hidroksibenzaldehid (25,0 mmol), raztopljen v piridinu in pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo dodali 20 ml vode ter narahlo premešali. Organsko fazo smo ločili od vodne ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom ter produkt nato čistili še s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze diklorometan/metanol = 9/1.

- **DODECIL 4-FORMILFENILHIDROGENFOSFAT**



Dobili smo 1,40 g (3,78 mmol) rumene oljnate tekočine.

$\eta$  (**35**) = 10 %

Mr = 370,4 g/mol

Elementna sestava: C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>P

R<sub>f</sub> = 0,33 (silikagel, etilacetat/metanol=2/1)

**Analize dodecil 4-formilfenilhidrogenfosfata**

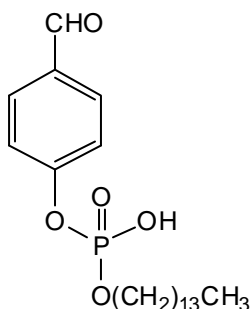
<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.89 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 1.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 7.39-7.82 (AA'BB', 4H, *J*=8.4 Hz,  $\Delta\nu$ =120,7 Hz, Ar-H), 9.91 (s, 1H, CHO) ppm

$^1\text{H NMR}$  ( $^{31}\text{P}$ ): -157 ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 369 ((M-H)<sup>+</sup>, 43), 121 (50)

**IR (NaCl):**  $\nu$  2923, 2853, 1702, 1599, 1505, 1466, 1234, 1159, 1079, 908, 836  $\text{cm}^{-1}$

• **TETRADECIL 4-FORMILHIDROGENFOSFAT**



**36**

Dobili smo 1,35 g (3,39 mmol) rumeno-oranžne oljnate tekočine.

$\eta$  (**36**)= 10 %

Mr= 398,2 g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{P}$

$R_f$ = 0,33 (silikagel, etilacetat/metanol=2/1)

**Analize tetradecil 4-formilfenilhidrogenfosfa**

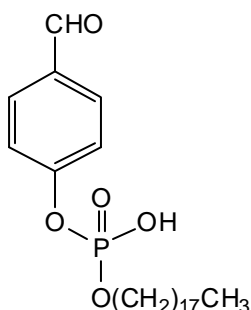
$^1\text{H NMR}$  (300,15 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.89 (t, 3H,  $J$ =6.3 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.26 (m, 22H,  $\text{CH}_2$ ), 1.61 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.05 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-O}}$ ), 7.40-7.42 (AA'BB', 4H,  $J$ =86.9 Hz,  $\Delta\nu$ =115.6 Hz, Ar-H), 9.91(s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 397 ((M-H)<sup>+</sup>, 100)

**IR (NaCl):**  $\nu$  2921, 2849, 1697, 1599, 1503, 1465, 1234, 1158, 1035, 907, 835  $\text{cm}^{-1}$

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{P}$ : 397.2144, ugotovljena: 397.2149

• **OKTADECIL 4-FORMILHIDROGENFOSFAT**



**37**

Dobili smo 3,05 g (6,71 mmol) oranžno rjave trdne spojine.

$\eta$  (**37**)= 21 %

Mr= 454,3 g/mol

Elementna sestava:  $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{O}_5\text{P}$

$T_i$ = 40-44 °C

$R_f$ = 0,25 (silikagel, etilacetat/metanol=2/1)

**Analize oktadecil 4-formilfenilhidrogenfosfa**

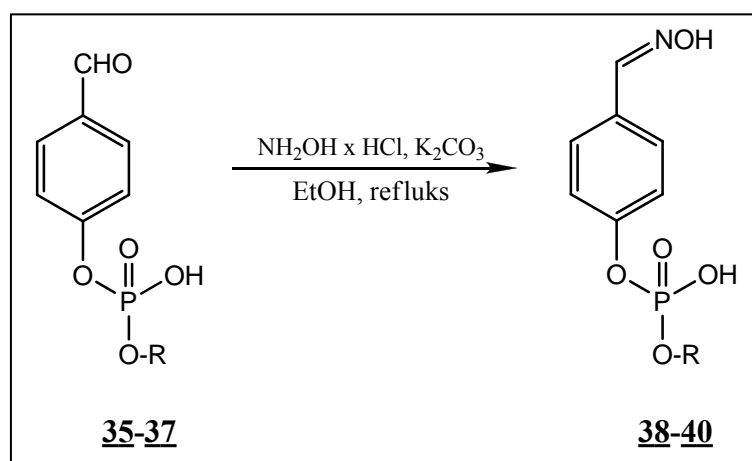
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.87 (t, 3H, *J*=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25 (m, 30H, CH<sub>2</sub>), 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 7.40-7.78 (AA'BB', 4H, *J*=4.5 Hz, Δ*v*=112.0 Hz, Ar-H), 9.88 (s, 1H, CHO) ppm

**MS (ESI):** *m/z* (%): 453 ((M-H)<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** *v* 3467, 2916, 2850, 1701, 1600, 1506, 1469, 1238, 1160, 1097, 902, 838 cm<sup>-1</sup>

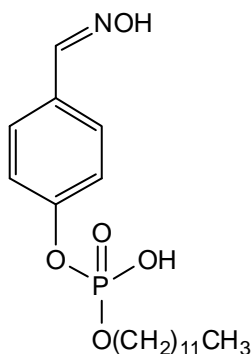
**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>P: 453.2770, ugotovljena: 453.2778

## 7.8. SPLOŠNI PREDPIS SINTEZE ALKIL 4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENIL HIDROGENFOSFATA

**Postopek:**

Zmes alkil 4-formilfenilhidrogenfosfata (9,98 mmol), 14,97 mmol hidrosilamonijevega klorida, 9,98 mmol kalijevega karbonata in 50 ml absolutnega etanola smo segrevali preko noči pri temperaturi vrenja. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkta **38** in **39** smo očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze diklorometan/metanol=9/1. Produkt **40** pa smo prelili z 10 ml diklorometana ter dali v hladilnik, da je izpadla oborina, ki smo jo nato odfiltrirali s presesavanjem.

• **DODECIL 4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENILHIDROGENFOSFAT**



Dobili smo 0,73 g (1,89 mmol) blede rumenega praška.

$\eta$  (**38**)= 19 %

Mr= 385,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>P

T<sub>f</sub>= 65-69 °C

R<sub>f</sub>= 0,35 (silikagel, etilacetat/metanol=2/1)

**38**

**Analize dodecil 4-((hidroksiimino)metil)fenilhidrogenfosfata**

<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.85 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20 (m, 18H, CH<sub>2</sub>), 1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 7.13-7.46 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz,  $\Delta\nu$ =90.0 Hz, Ar-H), 8.04 (s, 1H, CH=NOH), 10.24 (s, 1H, P-OH), 10.98 (s, 1H, NOH) ppm

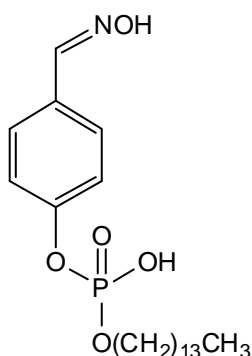
<sup>1</sup>H NMR (<sup>31</sup>P): -149 ppm

MS (ESI): m/z (%): 386 (MH<sup>+</sup>, 100)

IR (KBr):  $\nu$  2922, 2852, 1701, 1602, 1510, 1467, 1233, 1174, 1080, 910, 841 cm<sup>-1</sup>

HR-MS (FAB<sup>+</sup>): Izračunana za C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>5</sub>P: 386.2096, ugotovljena: 386.2077

• **TETRADECIL 4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENILHIDROGENFOSFAT**



Dobili smo 0,32 g (0,77 mmol) umazano belega praška.

$\eta$  (**39**)= 23 %

Mr= 413,2 g/mol

Elementna sestava: C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub>P

T<sub>f</sub>= 73-77 °C

R<sub>f</sub>= 0,35 (silikagel, etilacetat/metanol=2/1)

**39**

**Analize tetradecil 4-((hidroksiimino)metil)fenilhidrogenfosfata**

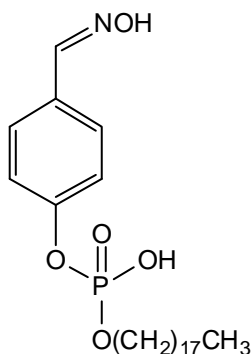
**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.85 (t, 3H, *J*=6.0 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20 (m, 22H, CH<sub>2</sub>), 1.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 7.12-7.44 (AA'BB', 4H, *J*=8.7 Hz, Δ*v*=86.7 Hz, Ar-H), 8.02(s, 1H, CH=NOH), 10.22 (s, 1H, P-OH), 10.94 (s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 412 ((M-H)<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** ν 2921, 2851, 1605, 1513, 1468, 1240, 1174, 1094, 906, 826 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>5</sub>P: 412.2266, ugotovljena: 412.2247

- OKTADECIL 4-((HIDROKSIIMINO)METIL)FENILHIDROGEN FOSFAT**



Dobili smo 2,97 g (6,32 mmol) belega praška.

η (**40**)= 94 %

Mr= 468,3 g/mol

Elementna sestava: C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>5</sub>P

T<sub>f</sub>= 79-83 °C

R<sub>f</sub>= 0,36 (silikagel, etilacetat/metanol=2/1)

**40****Analize oktadecil 4-((hidroksiimino)metil)fenilhidrogenfosfata**

**<sup>1</sup>H NMR (300,15 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.85 (t, 3H, *J*=5.7 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.21 (m, 30H, CH<sub>2</sub>), 1.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 7.14-7.48 (AA'BB', 4H, *J*=8.4 Hz, Δ*v*=95.4 Hz, Ar-H), 8.04 (s, 1H, CH=NOH), 10.27 (s, 1H, OH-P), 11.00(s, 1H, NOH) ppm

**MS (ESI):** m/z (%): 468 ((M-H)<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** ν 2919, 2849, 1701, 1605, 1512, 1468, 1239, 1173, 1070, 916, 826 cm<sup>-1</sup>

**HR-MS (FAB<sup>+</sup>):** Izračunana za C<sub>25</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>5</sub>P: 468.2879, ugotovljena: 468.2882

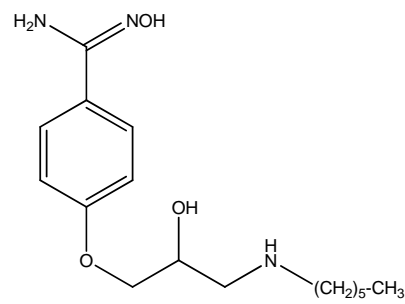
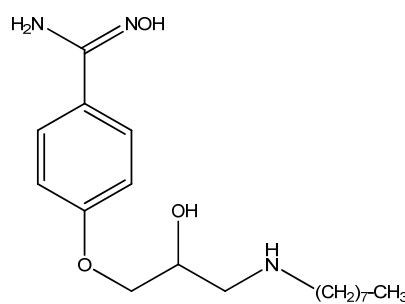
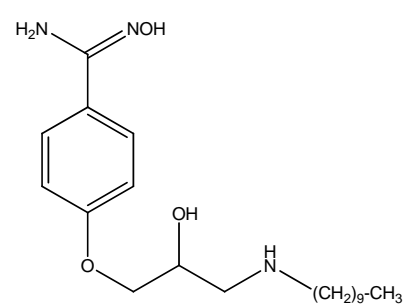


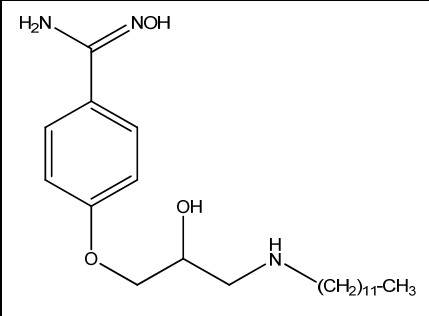
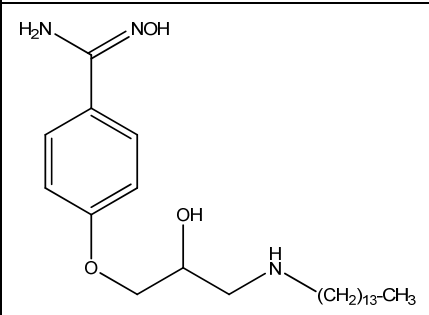
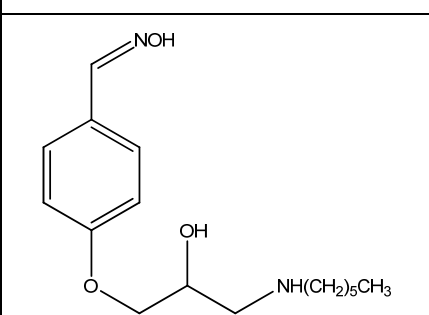
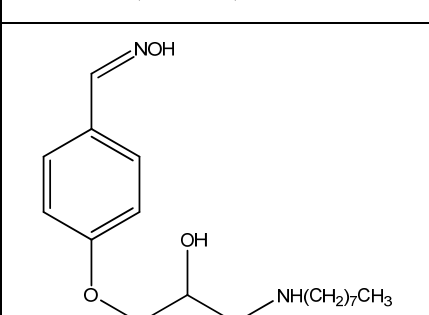
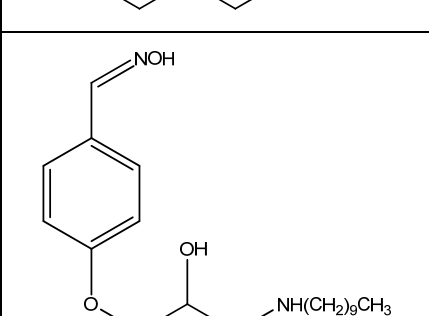
## 8. REZULTATI IN DISKUSIJA

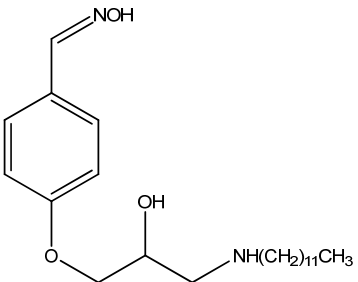
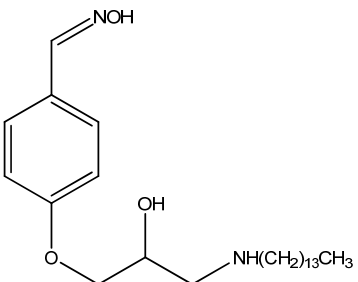
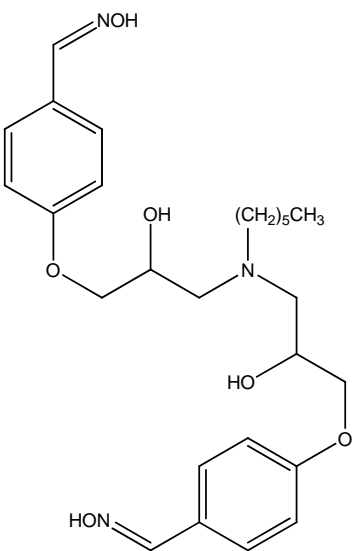
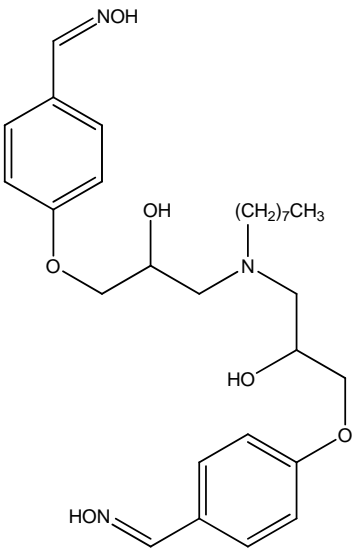
### 8.1. REZULTATI IN DISKUSIJA SINTEZE SPOJIN

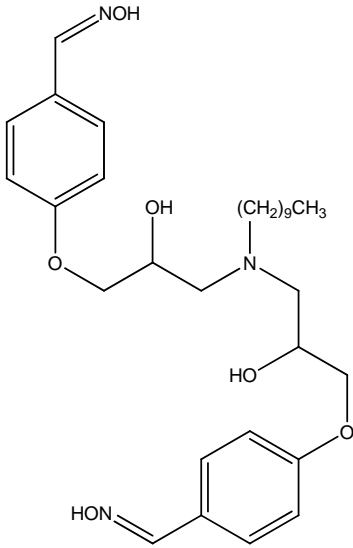
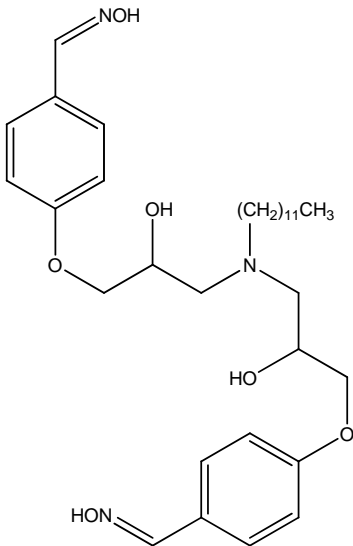
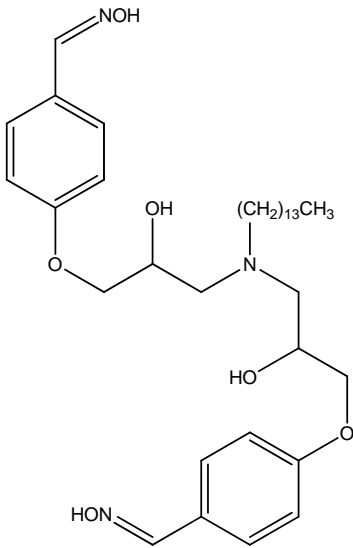
#### 8.1.1. REZULTATI

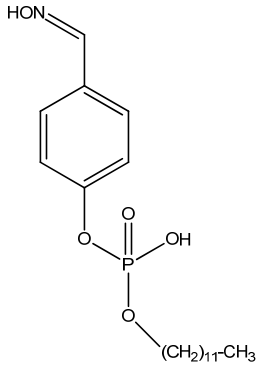
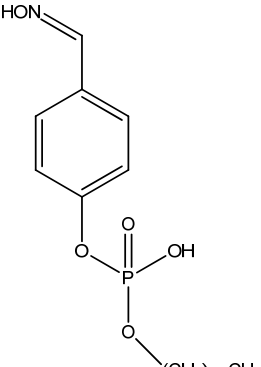
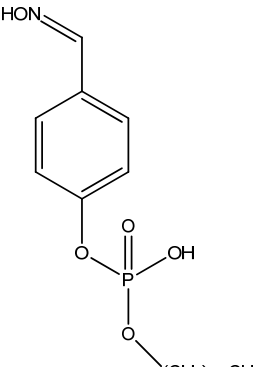
V okviru diplomske naloge smo sintetizirali sledeče spojine, za katere domnevamo, da bodo izkazovale antioksidativne lastnosti.

| STRUKTURA SPOJINE   | ŠTEVILKA SPOJINE | STRAN     |
|---|------------------|-----------|
|   | <b><u>8</u></b>  | <b>29</b> |
|  | <b><u>9</u></b>  | <b>29</b> |
|  | <b><u>10</u></b> | <b>30</b> |

|   |                  |           |
|---|------------------|-----------|
| <br><chem>CCCCCCCCCCCCCNCC(O)COc1ccc(N=O)cc1N</chem> | <b><u>11</u></b> | <b>31</b> |
| <br><chem>CCCCCCCCCCCCCNCC(O)COc1ccc(N=O)cc1N</chem> | <b><u>12</u></b> | <b>31</b> |
| <br><chem>CCCCCNCC(O)COc1ccc(N=O)cc1</chem>         | <b><u>20</u></b> | <b>43</b> |
| <br><chem>CCCCCNCC(O)COc1ccc(N=O)cc1</chem>        | <b><u>21</u></b> | <b>43</b> |
| <br><chem>CCCCCNCC(O)COc1ccc(N=O)cc1</chem>        | <b><u>22</u></b> | <b>44</b> |

|   |                  |           |
|---|------------------|-----------|
|    | <b><u>23</u></b> | <b>45</b> |
|    | <b><u>24</u></b> | <b>45</b> |
|   | <b><u>30</u></b> | <b>46</b> |
|  | <b><u>31</u></b> | <b>47</b> |

|   |                  |           |
|---|------------------|-----------|
|  <p>Chemical structure 32: A bisphenol derivative with two hydroxyl groups and two aldehyde groups. The aldehyde groups are in their oxime form (NOH). The hydroxyl groups are part of a chain that includes a nitrogen atom substituted with a <math>(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3</math> group.</p> | <p><u>32</u></p> | <p>48</p> |
|  <p>Chemical structure 33: Similar to structure 32, but with a <math>(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3</math> group on the nitrogen atom.</p>   | <p><u>33</u></p> | <p>49</p> |
|  <p>Chemical structure 34: Similar to structure 32, but with a <math>(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3</math> group on the nitrogen atom.</p>  | <p><u>34</u></p> | <p>50</p> |

|   |                  |           |
|---|------------------|-----------|
|    | <u><b>38</b></u> | <b>54</b> |
|    | <u><b>39</b></u> | <b>54</b> |
|  | <u><b>40</b></u> | <b>55</b> |

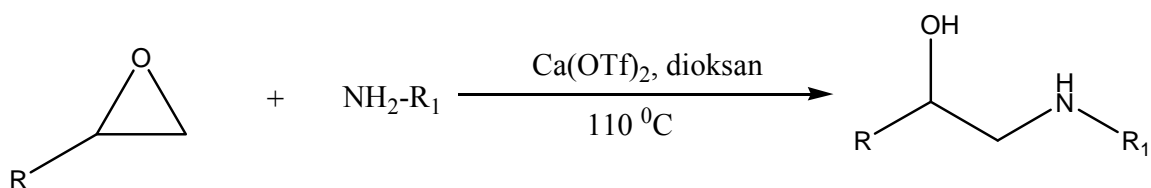
## 8.1.2. RAZPRAVA

### 8.1.2.1. Razprava k sintezi 4-(oksiran-2-iletoksi)benzoničila (**2**) in alkilamino-2-hidroksipropilnih etrov benzoničila (**3-7**)

Pri sintezi smo izhajali iz 4-cianofenola, ki smo mu z vodno raztopino NaOH povečali nukleofilnost fenolne OH za napad na najbolj elektrofilni C-atom epiklorhidrina. Reakcijo, pri kateri se je tvoril 4-(oksiran-2-iletoksi)benzoničil (**2**) smo spremljali s TLC. Pod UV-svetilko pri  $\lambda=245$  je iz TLC bilo razvidno, da sta se pojavili 2 novi lisi, obe nižje od

izhodne spojine. Pri ekstrakciji organske faze smo odstranili preostanek izhodne spojine in druge v vodi topne nečistote. Spojino smo nato čistili še s kolonsko kromatografijo, kjer smo lovili zgornjo, od dveh novonastalih lis. Spodnje lise kljub spektroskopskim podatkom nismo mogli natančno okarakterizirati, zgornja lisa pa je predstavljala 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzonitril.

Odpiranje oksiranskega (epoksidnega) obroča smo izvajali z različno dolgimi primarnimi amini. Mehanizem reakcije je nukleofilna substitucija. Nukleofil je  $\text{NH}_2$  skupina, ki napade sterično manj oviran C-atom v epoksidnem obroču, kar prikazuje spodnja reakcija:



Pri vseh reakcijah odpiranja epoksidnega obroča smo uporabili katalizator  $\text{Ca}(\text{OTf})_2$  za aktivacijo epoksida, čeprav so epoksidi relativno reaktivne spojine, saj reakcija kljub segrevanju, brez triflata ni potekla. Zaradi velike obročne napetosti (izračunana energija napetosti je  $54 \text{ KJ/mol}$ ) v prisotnosti močnih nukleofilov pride do odpiranja tričlenskega obroča (21).

Triflatni anion,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ , je ena najmočnejših poznanih kislin in je zelo dobra izstopajoča skupina. Katalizator napade metilensko  $\text{CH}_2$  skupino v oksiranskem obroču, ki je sterično manj ovirana. Tričlenski obroč se odpre in nastane aktiviran intermediat. V naslednji stopnji pride do nukleofilnega napada amino skupine na aktiviran C-atom. Pri tem poteče zamenjava amino skupine z dobro izstopajočo skupino. Možen je tudi nastanek stranskega produkta kot posledica napada nukleofila na sterično bolj oviran C-atom v oksiranskem obroču, vendar ga v našem primeru nismo detektirali (22).

Reakcija med epoksidom in primarnimi amini je običajna metoda za pripravo  $\beta$ -hidroksiaminov. Kot glavni produkt nastane sekundarni amin, v manjši meri pa dobimo tudi stranske produkte. Sekundarni amin ohrani nukleofilnost, zato lahko le ta napade drugo molekulo epoksida in zopet poteče nukleofilna substitucija. Nastali stranski produkt pa je terciarni amin.

Prisotnih nečistot smo se znebili s kolonsko kromatografijo pri čemer smo uporabili mobilno fazo diklorometan/metanol=20/1. Na koncu smo dobili bele trdne produkte s

tališčem okrog 60 °C za spojino z najkrajšo verigo, do okrog 73 °C za spojino z najdaljšo verigo.

Pri <sup>1</sup>H NMR spektru spojine **2** smo opazili, da so se vodikovi protoni CH<sub>2</sub> skupine, kljub temu, da so magnetno ekvivalentni, ločili. V IR spektru smo pri vseh spojinah (**2**, **3-7**) lahko opazili signal pri okoli 2230 cm<sup>-1</sup>, ki je značilen za ciano skupino.

#### **8.1.2.2. Razprava k sintezi amidoksimov (**8-12**)**

Sintezo smo izvajali iz alkilamino-2-hidroksipropilnih etrov benzonitrila, ki smo jim dodali hidroksilamonijev klorid ter bazo (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) za nevtralizacijo sproščene kisline (HCl).

Potekla je adicija nukleofilnega dušikovega atoma hidroksilamonijevega klorida na ciano skupino. Preostanek baze, ki je služila za nevtralizacijo sproščene kisline (HCl), smo odstranili s filtriranjem, ostale nečistote pa s prekrizalizacijo iz etanola.

Končne spojine smo dobili v obliki belih praškov z visokim tališčem (okrog 190 °C) in širokim intervalom taljenja. Pri vseh amidoksimih je v IR spektru izginil signal pri okoli 2230 cm<sup>-1</sup>, značilen za CN funkcionalno skupino, saj se je ta pretvorila v amidoksimsko skupino.

#### **8.1.2.3. Razprava k sintezi 4-(oksiran-2-ilmetoksi)benzaldehyda (**14**) ter monomerov in dimerov alkilamino-2-hidroksipropilnih etrov benzaldehyda (**20-24 (monomeri) in 30-34 (dimeri)**)**

Postopek sinteze in izolacije spojine **14** je bil identičen kot v primeru ciano derivatov. Tudi tu smo po končani reakciji na TLC detektirali 2 lisi, obe nižje od izhodne spojine, in pri čiščenju s kolonsko kromatografijo lovili zgornjo, ki je ustrezala našemu produktu. Na analize smo dali tudi spodnjo liso, za katero se je izkazalo, da po NMR-u ne ustreza naši spojini, ima pa enako molekularno maso, kot naš produkt. Strukture stranskega produkta nam kljub številnim spektroskopskim podatkom ni uspelo določiti.

Pri reakciji s primarnimi amini (mehanizem reakcije je opisan že pod točko 8.1.2.1.) smo s TLC ugotovili, da sta nastala dva produkta, ki smo jima določili strukturo in ju ločili s pomočjo kolonske kromatografije. Zgornje lise so pripadale dimerom, rumene zelo viskozne tekočine, spodnje pa sekundarnim aminom, pri katerih je potekla tudi kondenzacija formilne skupine in alkilamina. Po dodatku 1M HCl je potekla hidroliza imina in dobili smo monomere alkilamino-2-hidroksipropilnih etrov benzaldehyda, s temperaturo tališča od 70 do 125 °C.

#### 8.1.2.4. Razprava k sintezi alkilfosfatnih estrov benzaldehida (35-37)

Pri sintezi smo izhajali iz 4-hidroksibenzaldehida, ki smo mu dodali raztopino ustreznega alkohola ter fosforjevega oksiklorida. Pri reakciji fosforjevega oksiklorida z alkoholom poteče nukleofilna substitucija. Nukleofilna alkoholna OH skupina napade elektrofilni fosfor, izstopi pa delno izstopajoča skupina Cl. V nadaljnji reakciji s 4-hidroksibenzaldehidom se tvori ester, pri čemer pride do eliminacije vode. V IR spektru smo opazili signal za aldehydno skupino pri  $1600\text{ cm}^{-1}$ .

#### 8.1.2.5. Razprava k sintezi oksimov (20-24, 30-34 in 38-40)

Postopek sinteze in izolacije oksimov je identičen kot pri amidoksimih. Nukleofilni dušikov atom se adira na aldehydno skupino, sledi eliminacija vode in nastanek oksima. Produktom, ki smo jih na koncu očistili s kolonsko kromatografijo ali jih prekrystalizirali iz etanola, smo določili tališča in ugotovili, da imajo najnižja tališča okrog  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  oksimi s hidrogenfosfatnim distančnikom, sledijo jim dimeri (z izjemo najkrajših dveh 30 in 31, ki sta imela poltrdno konsistenco) s tališči okrog  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  in nato monomeri oksimov z aminoprapandiolnim distančnikom, pri katerih so se tališča gibala od  $81\text{ }^{\circ}\text{C}$  pa vse do  $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 8.2. UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE SPOSOBNOSTI OKSIMOV IN AMIDOKSIMOV Z DPPH METODO

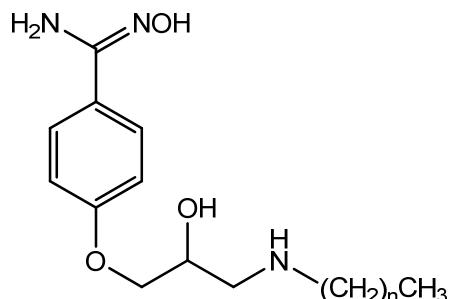
Z DPPH metodo smo preverili antioksidativne lastnosti oksimov in amidoksimov štirih strukturno različnih skupin, ki smo jih predhodno sintetizirali. Te skupine so:

- ✓ amidoksimi z aminoprapandiolnim distančnikom (9,10 in 11) ter
- ✓ tri skupine oksimov:
  - monomeri oksimov z aminoprapandiolnim distančnikom (21, 22 in 23),
  - dimeri oksimov z aminoprapandiolnim distančnikom (31 in 33) in
  - monomeri oksimov s hidrogenfosfatnim distančnikom (38).



### 8.2.1. Amidoksimi z aminopropandiolnim distančnikom (9, 10 in 11)

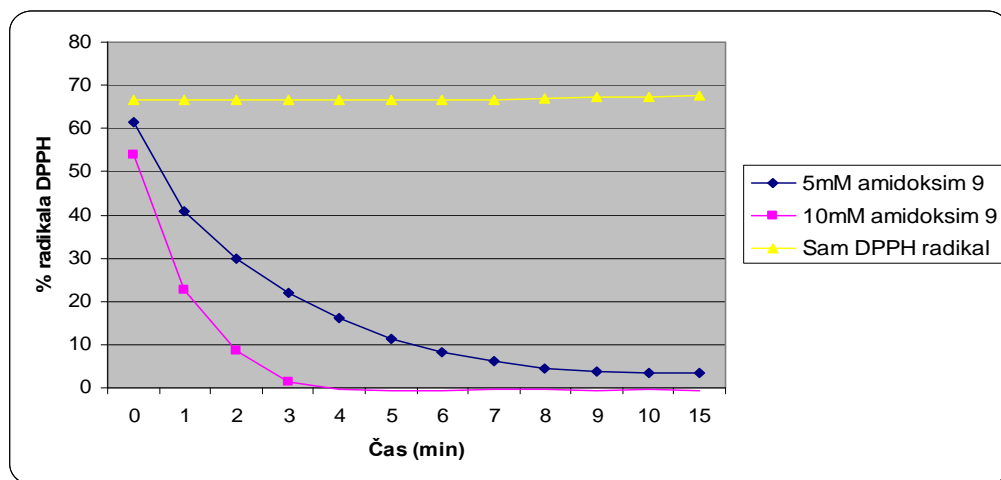
Na sliki 6 je predstavljena osnovna strukturna formula amidoksimov. Amidoksimi 9, 10 in 11 se med sabo razlikujejo le v dolžini lipofilne verige.



Slika 6: Strukturna formula amidoksimov 9 ( $n=7$ ), 10 ( $n=9$ ) in 11 ( $n=11$ ).

- 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)-*N'*-hidroksibezimidamin (9)

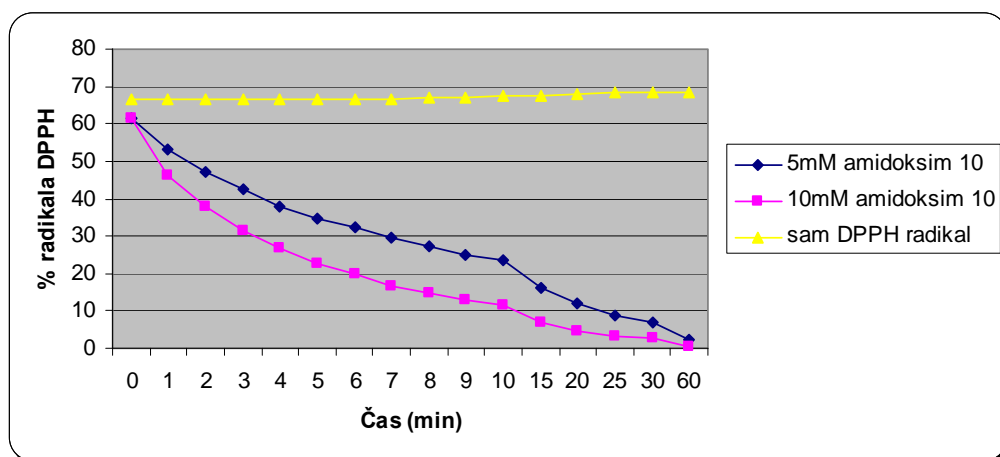
Uporabili smo dve različni koncentraciji amidoksima 9, rezultati so prikazani na sliki 7.



Slika 7: Zmanjševanje vsebnosti (%) DPPH<sup>•</sup> v odvisnosti od različnih koncentracij amidoksima 9 v času 15min.

- 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)-*N'*-hidroksibezimidamin (10)

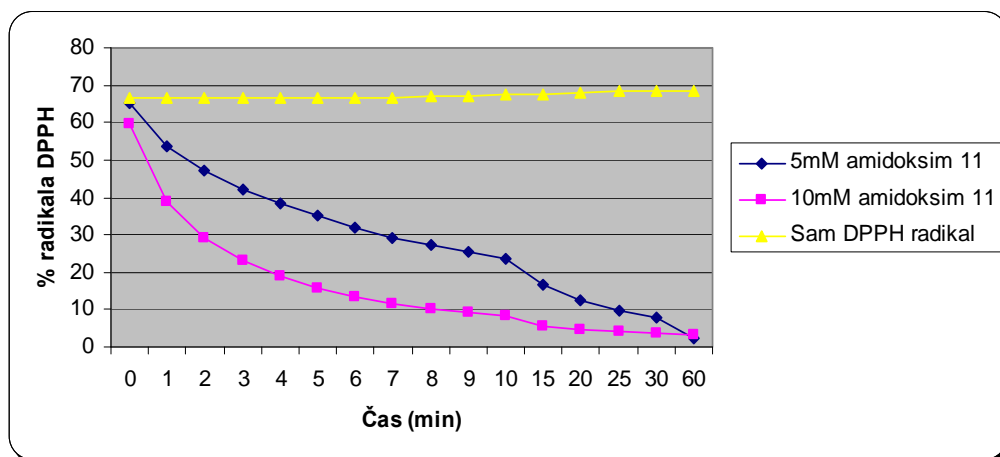
Uporabili smo dve različni koncentraciji amidoksima 10, rezultati so prikazani na sliki 8.



*Slika 8: Zmanjševanje vsebnosti (%) DPPH' v odvisnosti od različnih koncentracij amidoksima 10 v času 60min.*

- **4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)-N'-hidroksibezimidamin (11)**

Uporabili smo dve različni koncentraciji amidoksima 11, rezultati so prikazani na sliki 9.



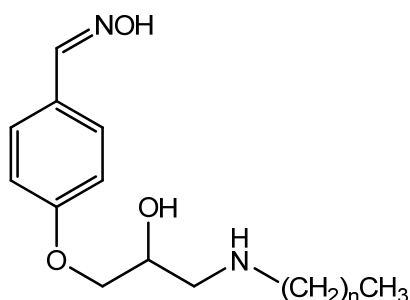
*Slika 9: Zmanjševanje vsebnosti (%) DPPH' v odvisnosti od različnih koncentracij amidoksima 11 v času 60min.*

Iz slik 7, 8 in 9 je razvidno, da se pri obeh koncentracijah (5mM in 10mM) amidoksimov 9, 10 in 11 vsebnost DPPH' s časom zmanjšuje, kar potrjuje, da omenjeni amidoksimi delujejo kot antioksidanti. Antioksidativna aktivnost amidoksimov je odvisna od njihove koncentracije; višja kot je koncentracija, močnejše je antioksidativno delovanje. Najučinkovitejši antioksidant je amidoksim 9, ki pri koncentraciji 10 mM reducira celoten

DPPH<sup>•</sup> v treh minutah oziroma petnajstih pri nižji testirani koncentraciji. Amidoksima **10** in **11** sta manj učinkovita, ravnotežno stanje nastopi po šestdesetih minutah.

### 8.2.2. Monomeri oksimov z aminopropandiolnim distančnikom (**21**, **22** in **23**)

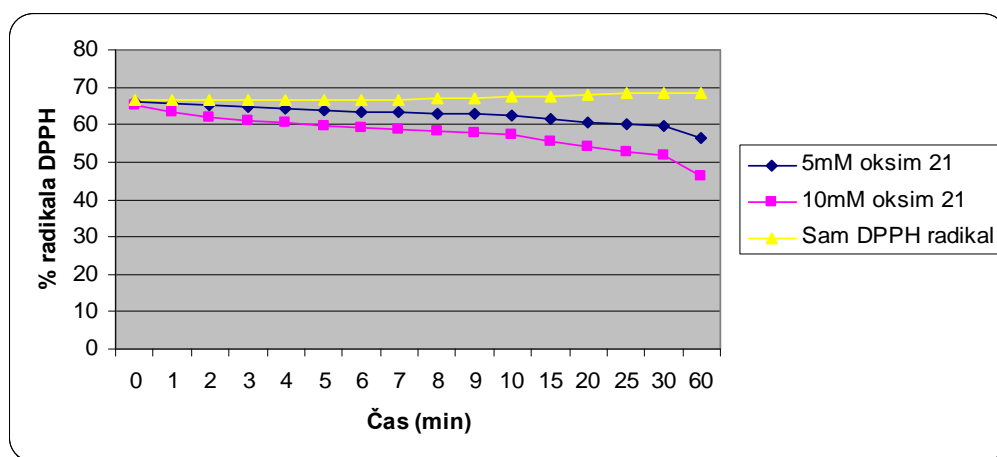
Splošna struktura testiranih oksimov, in sicer monomerov, je predstavljena na sliki 10. Oksimi **21**, **22** in **23** se med seboj razlikujejo v dolžini lipofilne verige, ki je pripeta na aromatski obroč.



Slika 10: Splošna struktura oksimov (monomerov) **21** ( $n=7$ ), **22** ( $n=9$ ) ter **23** ( $n=11$ ).

- 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksim (**21**)

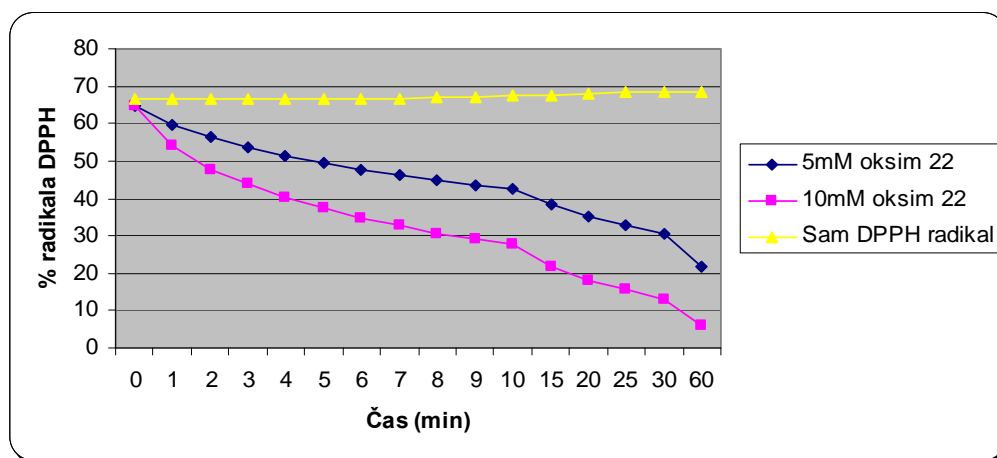
Uporabili smo dve različni koncentraciji oksima **21**, rezultati so prikazani na sliki 11.



Slika 11: Zmanjševanje vsebnosti (%) DPPH<sup>•</sup> v odvisnosti od različnih koncentracij oksima **21** v času 60min.

- 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksim (22)

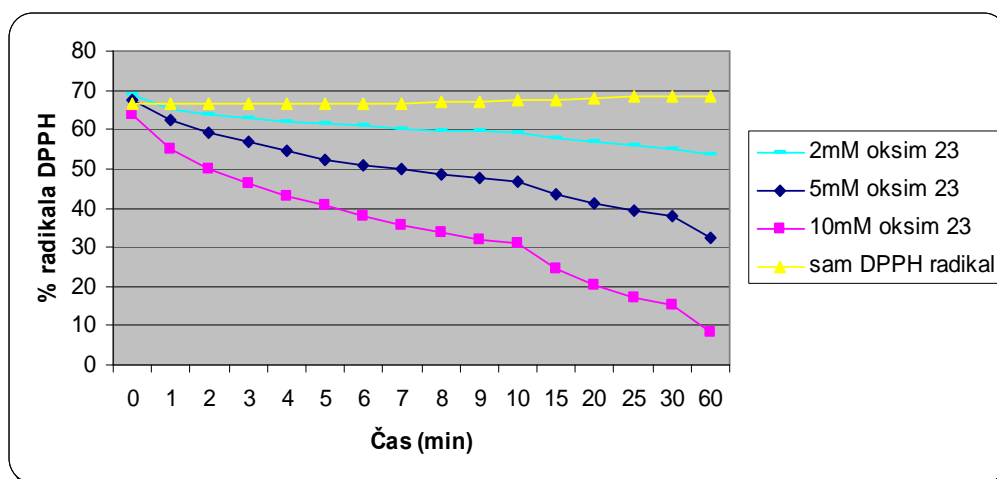
Uporabili smo dve različni koncentraciji oksima 22, rezultati so prikazani na sliki 12.



Slika 12: Zmanjševanje vsebnosti (%) DPPH v odvisnosti od različnih koncentracij oksima 22 v času 60min.

- 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksim (23)

Uporabili smo tri različne koncentracije oksima 23, rezultati so prikazani na sliki 13.

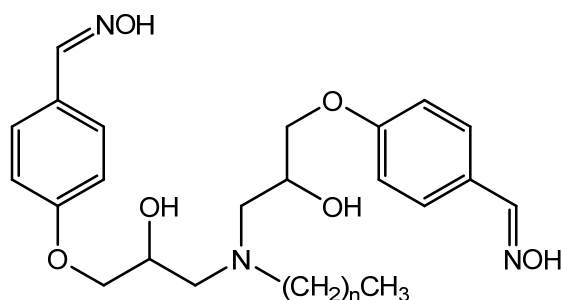


Slika 13: Zmanjševanje vsebnosti (%) DPPH v odvisnosti od različnih koncentracij oksima 23 v času 60min.

Iz slik 11, 12 in 13 je razvidno, da se pri vseh koncentracijah (5mM in 10mM, pri oksimu **23** tudi 2mM) oksimov **21**, **22** in **23** vsebnost DPPH<sup>•</sup> zmanjšuje, kar potrjuje, da omenjeni oksimi delujejo kot antioksidanti, in sicer obratno sorazmerno v odvisnosti od koncentracije. Oksima **22** in **23** sta približno enako učinkovita, medtem ko je oksim **21** s krajšo verigo slabši antioksidant, iz česar lahko sklepamo, da so antioksidativne sposobnosti odvisne tudi od dolžine verige.

### 8.2.3. Dimeri oksimov z aminopropandiolnim distančnikom (**31** in **33**)

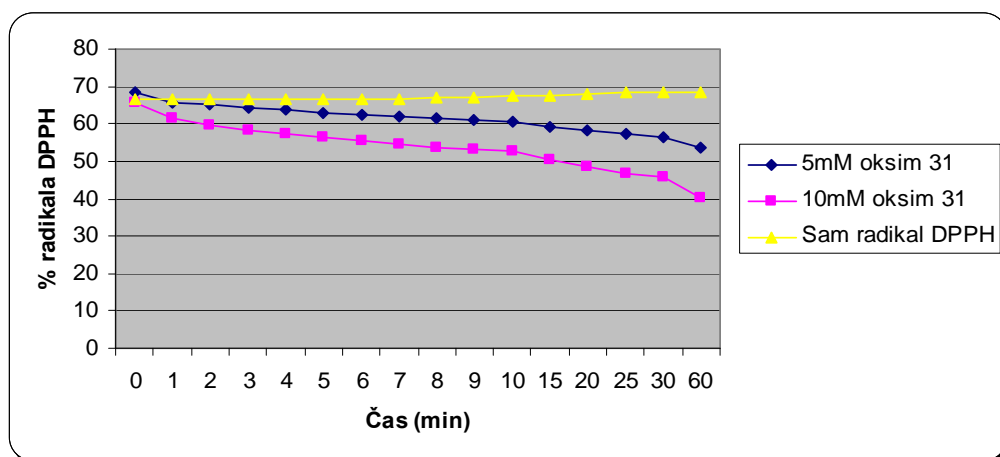
V nadaljevanju smo testirali oksime, ki se glede na prejšnjo skupino oksimov (7.2.2.) razlikujejo v tem, da gre za dimere. Verigi, ki sta pripeti na dušik v stranski verigi, pa sta enaki kot pri oksimu **21** oziroma **23**, tj. pri dimeru **31** ( $n=7$ ) in dimeru **21** ( $n=11$ ). Splošna struktura spojin tega tipa je prikazana na sliki 14.



*Slika 14: Splošna struktura oksimov (dimerov) **31** ( $n=7$ ) ter **33** ( $n=11$ ).*

- **4-(3-(dodecil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksim (**31**)**

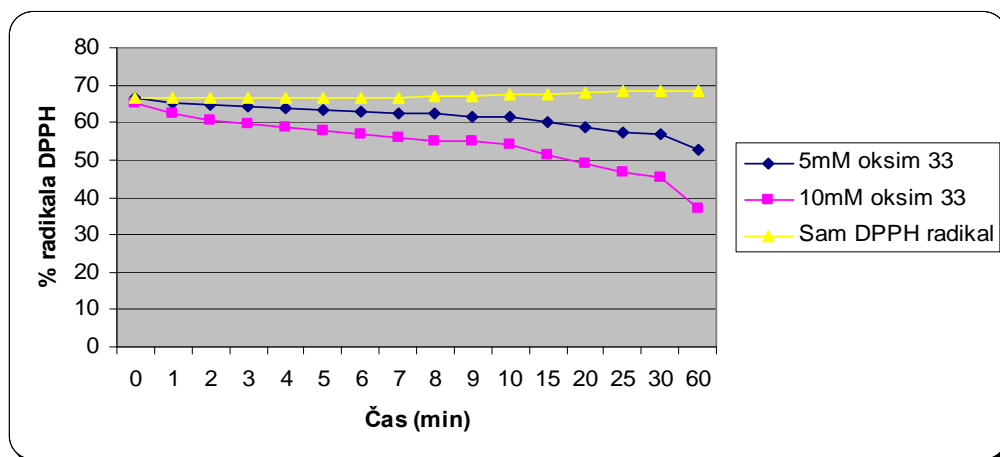
Uporabili smo dve različni koncentraciji oksima **31**, rezultati so prikazani na sliki 15.



*Slika 15: Zmanjševanje vsebnosti (%)DPPH' v odvisnosti od različnih koncentracij oksima 31 v času 60min.*

- **4-(3-(dodecil(2-hidroksi-3-(4-((hidroksiimino)metil)fenoksi)propil)amino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehyd oksim (33)**

Uporabili smo dve različni koncentraciji oksima 33, rezultati so prikazani na sliki 16.



*Slika 16: Zmanjševanje vsebnosti (%)DPPH' v odvisnosti od različnih koncentracij oksima 33 v času 60min.*

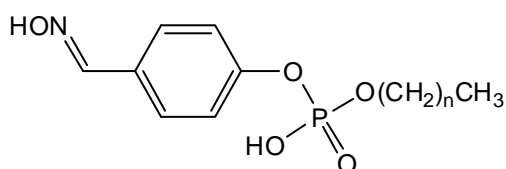
Iz slik 15 in 16 je razvidno, da se pri obeh koncentracijah (5mM in 10mM,) oksimov 31 in 33 vsebnost DPPH' zmanjšuje, torej imata antioksidativno delovanje. Oksima 31 in 33 sta

približno enako učinkovita, iz česar lahko sklepamo, da dolžina verige pri dimerih nima bistvenega vpliva na njihovo antioksidativno sposobnost.

#### 8.2.4. Monomeri oksimov s hidrogenfosfatnim distančnikom (38)

Kot zadnje potencialne antioksidante smo testirali oksime, ki imajo na para mestu benzenovega obroča alkilno verigo pripeto preko fosfatnega distančnika, ki je pri fizioloških pH vrednostih v ionski obliki. Osnovna struktura je prikazana na sliki 17.

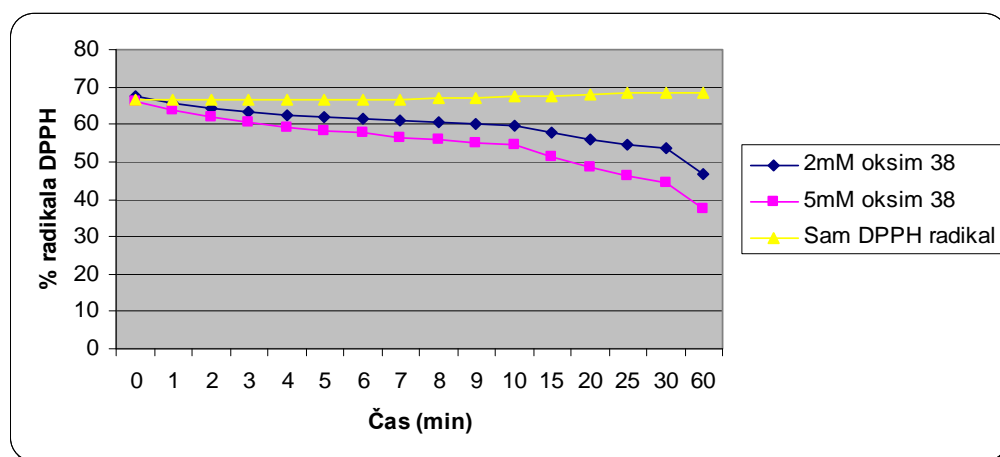
Iz te skupine oksimov smo antioksidativno sposobnost preverili le eni spojini, in sicer oksimu 38 pri koncentracijah 2mM in 5mM, pri višjih koncentracijah kakor tudi pri ostalih oksimih te skupine pa smo bili omejeni s topnostjo.



*Slika 17: Osnovna struktura oksimov s hidrogenfosfatno skupino, na katero je pripeta različno dolga veriga ogljikovih atomov; oksim 38 ( $n=11$ ).*

- **Dodecil 4-((hidroksiimino)metil)fenilhidrogenfosfat (38)**

Uporabili smo dve različni koncentraciji oksima 38, rezultati so prikazani na sliki 18.

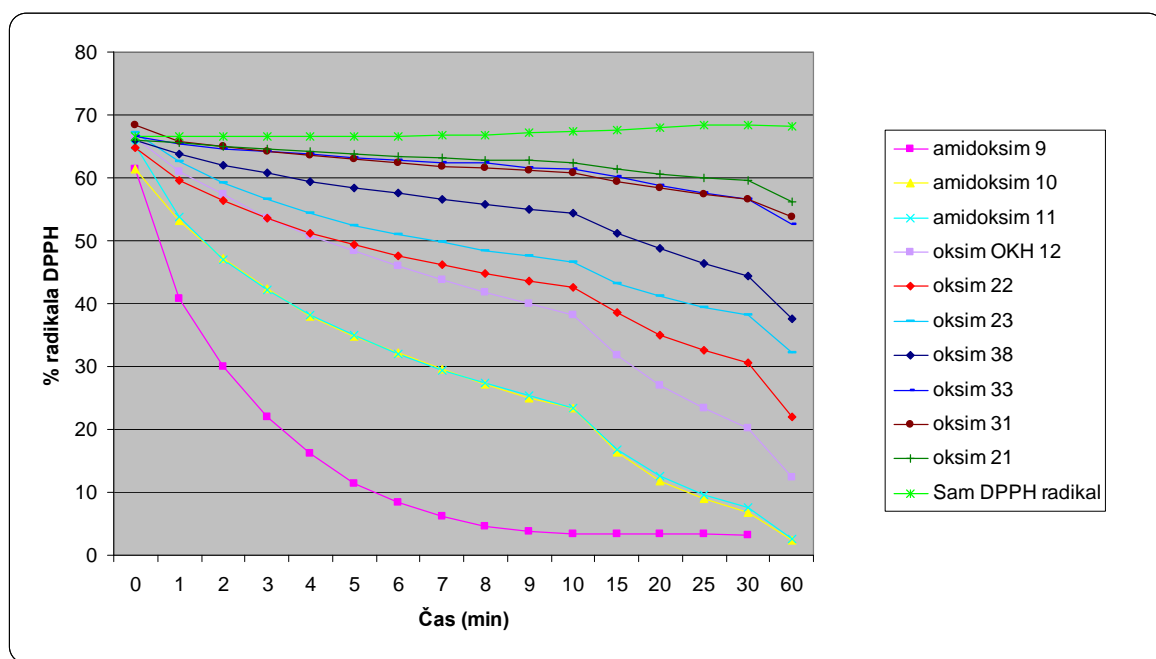


*Slika 18: Zmanjševanje vsebnosti (%)DPPH<sup>•</sup> v odvisnosti od različnih koncentracij oksima 38 v času 60min.*

Iz slike 18 je razvidno, da se pri obeh koncentracijah (2mM in 5mM,) oksima **38** vsebnost DPPH<sup>\*</sup> zmanjšuje, kar potrjuje, da omenjen oksim deluje kot antioksidant, ponovno je to delovanje bolj izrazito pri višji koncentraciji.

### 8.2.5. Primerjava antioksidativnega delovanja oksimov in amidoksimov pri koncentraciji 5mM

Antioksidativne sposobnosti vseh oksimov in amidoksimov smo preverili pri koncentraciji 5mM; za lažjo primerjavo njihove antioksidativne učinkovitosti smo rezultate posameznih spojin združili (slika 19). Na sliki 19 je dodan tudi oksim OKH 12 (4-(trideciloksi)-benzaldehyd oksim), ki ga je testirala že Katarina Horvat v diplomski nalogi z naslovom Proučevanje delovanja oksima OKH 12 v povezavi s stabilnostjo askorbilpalmitata v mikroemulzijah (23).



*Slika 19: Zmanjševanje vsebnosti (%)DPPH<sup>\*</sup> različnih oksimov ter amidoksimov pri koncentraciji 5mM v času 60minut.*

Iz slike 19 je razvidno, da se vsebnost DPPH<sup>\*</sup> najhitreje zmanjšuje pri amidoksimu **9**, kar potrjuje, da omenjen amidoksim izmed izbranih deluje kot najboljši antioksidant. Sledita mu preostala dva amidoksima **10** in **11**, nato oksimi **22**, **23** in **38**, kot najslabši



antioksidanti pa so se izkazali dimera oksimov **33** in **31** ter monomer oksima **21**. Iz slike prav tako vidimo, da je pri amidoksimih najučinkovitejši antioksidant amidoksim **9**, ki ima najkrajšo verigo, medtem ko je pri oksimih učinkovitejši tisti oksim znotraj posamezne skupine, ki ima daljšo verigo, in sicer sta oksima **22** in **23** sta bolj učinkovita kot oksim **21** z najkrajšo verigo.

V primerjavi s predhodno testiranim oksimom OKH 12 vidimo, da so vsi na novo sintetizirani oksimi slabši antioksidanti kot oksim OKH 12, medtem ko so se amidoksimi izkazali za bolj učinkovite.

Zaključimo lahko, da so se kot potencialni antioksidanti najbolj izkazali amidoksimi, sledijo monomeri oksimov, medtem ko so dimeri oksimov najslabši antioksidanti.

## 9. SKLEP

Številne zdravilne učinkovine so podvržene oksidativnemu kvarjenju, kar lahko povzroči izgubo učinka ali celo nastanek toksičnih intermediatov, zato so izjemnega pomena pogoji shranjevanja teh učinkovin ter ustrezna zaščita z uporabo antioksidantov. Antioksidanti so snovi, ki že v nizkih koncentracijah zavrejo ali preprečijo delovanje škodljivih kisikovih spojin, zato jih uporabljamo za zaščito učinkovin in pomožnih snovi pred oksidativnim kvarjenjem. Dodajamo jih v same zdravilne pripravke, kjer zapadejo v procese oksidacije prej kot sama učinkovina oziroma pomožne snovi.

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali nove amfifilne antioksidante oksimskega in amidoksimskega tipa, ki so primerni za uporabo v dvofaznih sistemih, kot so emulzije O/V ali V/O in izkazujejo lastnosti površinsko aktivnih snovi.

Za dosego tega cilja smo upoštevali določene zakonitosti, ki so nujne pri načrtovanju amfifilnih molekul z antioksidativnim delovanjem. Polarni del molekule predstavljajo aminopropandiolni oziroma hidrogenfosfatni distančnik in funkcionalna skupina z antioksidativnim delovanjem (oksimska oziroma amidoksimska), nepolarni del molekule pa različno dolge alkilne verige.

Antioksidativne lastnosti sintetiziranih spojin smo na koncu ovrednotili še s pomočjo difenilpikrilhidrazilne (DPPH) metode. Ugotovili smo, da se je pri vseh testiranih spojinah vsebnost DPPH' s časom zmanjšala, kar potrjuje dejstvo, da te spojine delujejo kot antioksidanti.

Med testiranimi spojinami so se za najučinkovitejše antioksidante izkazali amidoksimi, sledijo jim monomeri oksimov, medtem ko so se za najslabše antioksidante izkazali dimeri oksimov. V primerjavi z že predhodno testiranim oksimom OKH 12, pa smo ugotovili, da so vsi amidoksimi učinkovitejši antioksidanti kot omenjen oksim, medtem ko so se vsi na novo sintetizirani oksimi izkazali za manj učinkovite.

## 10. VIRI IN LITERATURA:

1. Kmetec V, Roškar R: Vaje iz stabilnosti zdravil, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2002: 25-26
2. Kreft S, Pečar S: Vloga radikalov pri obolenjih, Farmaceutski vestnik 1998; 49: 469-481
3. Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih, Farm Vestnik 2001; 52: 133-144
4. Šuput D, Kamarič L: Izvor in reakcije prostih radikalov. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije - 9.izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 2005: 15 – 25
5. Pečar S: Koža in prosti radikali. Koža-sonce-zdravje-lepota, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; Podiplomsko izobraževanje; 2004: 23-33
6. Pečar S: Radikali v našem okolju, Kemija v šoli 2006; 18(2): 26-30
7. Pečar S: Radikali v našem življenju, Kemija v šoli 2006; 18(3): 13-19
8. McCord M.J: The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress, Excerpta Medica 2000; 108: 652-659
9. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine, 4<sup>th</sup> Ed. Oxford University Press 2007: 80,110-115
10. Sennequier N, Boucher J.L, Battioni P, Mansuy D: Superoxide Anion Efficiently Performs the Oxidative Cleavage of C=NOH Bonds of Amidoximes and N-hidroksiguanidines with Formation of Nitrogen Oxides; Tetrahedron Letters, 1995; Vol. 36, No. 34, pp. 6059-6062
11. Jaroš F, Straka T, Dobešová Z, Pintérova M, Chalupsky K, Kuneš J, Entlicher G, Zicha J: Vasorelaxant activity of some oxime derivatives, European Journal of Pharmacology, 2007; 575: 122-126
12. Irvine C.J, Ritchie H.R, Favaloro L.J, Andrews L.K, Widdop E.R, Kemp-Harper K.B: Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story, Cell 2008: 601-608
13. Donzelli S, Espey M.G, Flores-Santana W, Switzer H.C, Yeh C.G, Huang J, Stueher J.D, Bruce King S, Miranda M.K, Wink A.D: Generation of nitroxyl by

- heme preotin-mediated peroxidation of hydroxylamine but not *N*-hidroksi-L-arginin, *Free Radical Biology and Medicine*, 2008; 45: 578-584
14. Lopez E.B, Shinyashiki M, Han H.T, Fukuto M.J: Antioxidant action of nitroxyl (HNO); *Free Radical Biology and Medicine*, 2007; 42: 482-491
  15. Puntel O.G, de Carvalho R.N, Gubert P, Palma S.A, Dalla Corte L.C, Ávila S.D, Pereira E.M, Carratu S. V, Bresolin L, Batista Teixeira da Rocha J, Antunes Soares A.F: Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: An oxime with antioxidant properties, *Chemico-Biological Interactions* 2009; 177(2): 153-160
  16. De Lima Portella R, Barcelos P.R, Fabro de Bern A, Santana Carratu V, Bresolin L, Batista Teixeira da Rocha J, Antunes Soares A.F: Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation, *Life Science* 2008; 83: 878-885
  17. Srivastava M.R, Brinn M.I, Machuaca-Herrera O.J, Faria B.H, Carpenter B.G, Andrade D, Venkatesh G.C, de Morais P.F.L: Benzamidoximes: structural, conformational and spectroscopic studies. I, *Journal of Molecular Structure* 1997; 406: 159-167
  18. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004; 26(2): 212-219
  19. Villaño D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Trosoco AM, Garcia-Parrilla MC: Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta* 2007, 71: 230-235
  20. Sanchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F: Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International* 1999; 32: 407-412
  21. Tišler M: *Organska kemija*, DZS, Ljubljana 1991: 410
  22. Sollner Dolenc M, Pečar S: *Vaje iz farmacevtske kemije* 3, 2000: 49-53
  23. Horvat K: Proučevanje mehanizma delovanja oksima OKH 12 v povezavi s stabilnostjo askorbilpalmitata v mikroemulzijah, *Diplomska naloga*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008