

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE BORIŠEK

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE BORIŠEK

**SINTEZA L-*IDO* BIS-EPOKSIDA IN AMFIFILNIH
OKSIMSKIH DERIVATOV D-GALAKTOZE**

**SYNTHESIS OF L-*IDO* BIS-EPOXIDE AND AMPHIPHILIC
OXIME DERIVATES OF D-GALACTOSE**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Analize NMR so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, masne analize pa na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za strokovno vodenje in vsestransko pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela in nasvete pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Jure Borišek

Ljubljana, 2011

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član komisije: doc. dr. Barbara Ostanek

VSEBINA

1. POVZETEK	IV
2. ABSTRACT	V
3. SEZNAM OKRAJŠAV	VI
4. UVOD	1
4.1 POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI	1
4.1.1 PAS, ki temeljijo na sladkorjih	2
4.1.2 Biološke membrane	2
4.2 RADIKALI	4
4.2.1 Lipidna peroksidacija	5
4.2.2 Oksidativni stres	6
4.2.3 Avtooksidacije	7
4.3 ANTIOKSIDANTI	9
4.3.1 Oksimi kot antioksidanti	9
5. NAČRT DELA	11
5.1 REAKCIJSKE SHEME	12
5.1.1 Reakcijska shema I	12
5.1.2 Reakcijska shema II	14
6. MATERIALI IN METODE	16
6.1 MATERIALI	16
6.2 METODE	16
6.2.1 Kromatografske metode	16
6.2.2 Spektroskopske metode	17
7. EKSPERIMENTALNI DEL	18
7.1 SINTEZA (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1,2-BIS((<i>R</i>)-2,2-DIMETIL-1,3-DIOKSOLAN-4-IL)ETAN-1,2-DIOLA	18

7.2 SINTEZA (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-BIS(BENZILOKSI)-1,2-BIS((<i>R</i>)-2,2-DIMETIL-1,3-DIOKSOLAN-4-IL)ETANA (SINTEZA L-IDO BIS-EPOKSIDA)	20
7.3 SINTEZA (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-BIS(BENZILOKSI)HEKSAN-1,2,5,6-TETRAOLA	22
7.4 SINTEZA (6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-7,8-BIS(BENZILOKSI)-2,2,3,3,12,12,13,13-OKTAMETIL-4,11-DIOKSA-3,12-DISILATETRADEKAN-6,9-DIOLA.....	24
7.5 SINTEZA (6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-7,8-BIS(BENZILOKSI)-2,2,3,3,12,12,13,13-OKTAMETIL-4,11-DIOKSA-3,12-DISILATETRADEKAN-6,9-DIILDIMETANSULFONATA	26
7.6 SINTEZA (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-BIS(BENZILOKSI)-1,2-DI((<i>S</i>)-OKSIRAN-2-IL)ETANA (SINTEZA L-IDO BIS-EPOKSIDA)	28
7.7 SINTEZA ((3 <i>aR</i> ,5 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> ,8 <i>bR</i>)-2,2,7,7-TETRAMETILTETRAHIDRO-3 <i>aH</i> -BIS[1,3]DIOKSOLO[4,5- <i>b</i> :4',5'- <i>d</i>]PIRAN-5-IL)METANOLA	30
7.8 SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO (3 <i>aR</i> ,5 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> ,8 <i>bR</i>)-2,2,7,7-TETRAMETIL-5-(ALKILOKSIMETIL)TETRAHIDRO-3 <i>aH</i> -BIS[1,3]DIOKSOLO[4,5- <i>b</i> :4',5'- <i>d</i>]PIRANOV	32
7.9 SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO (2(<i>R/S</i>), 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-(ALKILOKSIMETIL)TETRAHIDRO-2 <i>H</i> -PIRAN-2,3,4,5-TETRAOLOV.....	37
7.10 SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO (1(<i>E/Z</i>),2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,3,4,5-TETRAHIDROKSI-6-(ALKILOKSI)HEKSANAL OKSIMOV	41
8. REZULTATI IN RAZPRAVA O SINTEZI SPOJIN	46
8.1 REZULTATI	46
8.2 RAZPRAVA	48
8.2.1 Razprava k sintezi L- <i>ido</i> bis-epoksida.....	48
8.2.1.1 Razprava k sintezi zaščite hidroksilnih skupin v obliki diacetonida	48
8.2.1.2 Razprava k sintezi zaščite hidroksilne skupine v obliki benzilnega etra	48
8.2.1.3 Razprava k sintezi hidrolize diacetonida	49
8.2.1.4 Razprava k sintezi zaščite hidroksilne skupine v obliki TBDMS etra	49
8.2.1.5 Razprava k sintezi aktivacije hidroksilnih skupin z mesilatom.....	50
8.2.1.6 Razprava k sintezi epoksidacije do L- <i>ido</i> bis-epoksida.....	50
8.2.2 Razprava k sintezi amfifilnih derivatov D-galaktoze	51
8.2.2.1 Razprava k sintezi zaščite hidroksilnih skupin v obliki diacetonida	51
8.2.2.2 Razprava k sintezi pripenjanja alkilnih verig	51

8.2.2.3 Razprava k sintezi hidrolize diacetonida	51
8.2.2.4 Razprava k sintezi tvorbe oksima	52
9. SKLEP	53
10. VIRI IN LITERATURA	54

1. POVZETEK

Površinsko aktivne snovi so spojine, ki jih pogosto uporabljamo v vsakdanjem življenju. Uporabljamo jih kot detergente, emulgatorje, močljivce v različnih vrstah industrije. Prednost neionogenih površinsko aktivnih snovi, ki imajo kot polarni del sladkorni derivat je, da so fiziološko sprejemljive, so malo toksične in delujejo manj dražeče, poleg tega se pridobivajo iz obnovljivih virov.

Preprečevanje oksidacij v zdravilih je izrednega pomena, saj lahko nastanejo številni oksidativni produkti, ki so lahko toksični oziroma spremenijo organoleptične lastnosti zdravila. Prav tako je oksidativni proces v celicah udeležen v etiologiji številnih bolezenskih stanj. Pri obeh aspektih je ustrezna zaščita z uporabo antioksidantov ključnega pomena.

Tekom diplomskega dela smo sintetizirali nove mimetike glikolipidov oksimskega tipa, ki so potencialno primerni za uporabo tako v bioloških sistemih kot tudi v dvofaznih sistemih v farmacevtski tehnologiji, kot so mikroemulzije in emulzije O/V ali V/O. Pri predhodnih eksperimentih so amfifilne spojine z oksimsko skupino izkazovale antioksidativne lastnosti. Produkate vseh sinteznih stopenj smo ustrezno očistili in ovrednotili z NMR, MS in IR.

Za vse pripravljene spojine je značilno, da imajo polarno glavo in nepolarni rep. Hidrofilni del molekule predstavlja modificirana sladkorna molekula, lipofilni del molekule pa predstavljajo različno dolge alkilne verige. Sintetizirali smo dva tipa spojin z modificirano sladkorno molekulo: spojine s petčlenskim obročem na osnovi riboze in spojine s šestčlenskim obročem na osnovi galaktoze. Pri spojinah na osnovi riboze smo kot izhodno spojino uporabili manitol. V petih sinteznih stopnjah smo sintetizirali *L-ido* bis-epoksid. Zaradi zapletov pri izolaciji bis-epoksida, nadaljnja sinteza amfifilnih antioksidantov na osnovi riboze ni bila mogoča. Pri spojinah na osnovi šestčlenskega obroča smo kot izhodno spojino uporabili D-galaktozo, ki smo jo kemično modificirali in nanjo pripeli različno dolge alkilne verige. Pripravili smo 5 končnih spojin, ki jih bodo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo ovrednotili kot potencialne antioksidante.

2. ABSTRACT

Surfactants are compounds commonly used in everyday life. As detergents, emulsifiers, wetting agents they are used in various types of industries. Nonionogenic surfactants with sugar derivatives as a polar head have several advantages. They are physiologically acceptable, nontoxic, less irritant than ionogenic surfactants and in addition, they are obtained from renewable sources.

To prevent or slow the oxidation processes in drugs is of paramount importance as different oxidative products occur with potential toxic effects. Also, the oxidative processes in cells are involved in the etiology of many diseases. In both of these aspects protection with antioxidants is very important.

Through the process of experimental work in the laboratory we have synthesized new glycolipid mimetics with oxime group, which could be potentially used in both biological systems as well as in two-phase systems in the pharmaceutical industry, such as emulsions O/W or W/O, microemulsions. In earlier experiments the amphiphilic compounds with oxime group showed antioxidant properties. Products of synthesis were properly cleaned and characterized by NMR, MS and IR.

All the newly synthesized compounds have polar and lipophilic residues. The hydrophilic head is represented by modified sugar, the lipophilic part of the molecule contains an alkyl chain of varying length. We have synthesized two types of compounds using a modified sugar molecule: the compounds with five membered ring on the basis of ribose and compounds with six membered ring on the basis of D-galactose. Mannitol was used as a starting compound for compounds based on ribose. In five stages we prepared *L-ido* bis-epoxide. Due to complications with the isolation of bis-epoxide further synthesis of amphiphilic antioxidants on the basis of ribose was not possible. For compounds based on the six-member ring D-galactose was used as a starting compound, which was chemically modified. In this case alkyl chain of different lengths were attached to the scaffold. We prepared five final compounds, which will be further evaluated at the Department of Pharmaceutical Technology as potential antioxidants.

3. SEZNAM OKRAJŠAV

d	dublet (NMR)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EI	elektronska ionizacija (MS)
ESI	elektrosprej ionizacija (MS)
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta (NMR)
LP	lipidna peroksidacija
m	multiplet (NMR)
Mr	molekulska masa
MS	masna spektrometrija
NMR	jedrska magnetna resonanca
O/V	emulzije tipa olje/voda, hidrofilne emulzije
PAS	površinsko aktivne spojine
ppm	en del na milijon delov
Rf	retencijski faktor
s	singlet (NMR)
t	triplet (NMR)
TLC	tankoplastna kromatografija
Tt	temperatura tališča
V/O	emulzije tipa voda/olje, lipofilne emulzije
η	izkoristek reakcije
λ	valovna dolžina

4. UVOD

4.1 POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI

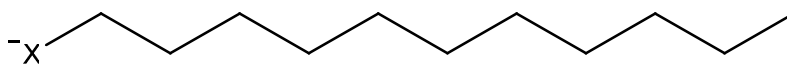
Površinsko aktivne snovi (PAS) so široko razširjene spojine v vsakdanjem življenju. Uporabljajo se v farmacevtski, kozmetični, prehrabni, naftni, papirni industriji kot detergenti, emulgatorji, solubilizatorji, močljivci. Letno svetovno proizvodnjo merimo v milijonih ton.

PAS so molekule, ki imajo v svoji kemijski strukturi hidrofobno in hidrofilno področje, so torej amfifilne spojine (1).

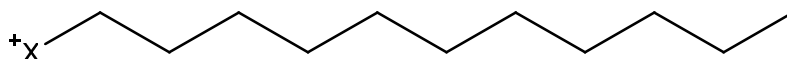
Z naraščanjem koncentracije PAS v sistemu vodna raztopina / nepolarno topilo ali zrak pada površinska napetost, dokler molekule zapolnjujejo mejno površino med obema fazama. Pri določeni koncentraciji se te površine nasitijo in PAS se pričnejo združevati in tvoriti agregate, ki jih imenujemo miceli. Hidrofobne skupine, ki tvorijo jedra teh struktur, so obdane s hidrofilnimi skupinami kar omogoča topnost PAS v vodi tudi pri višjih koncentracijah. Koncentracijo, pri kateri se pričnejo tvoriti miceli, imenujemo kritična micelska koncentracija. Najpogostejše imajo miceli obliko diska ali ploščato elipsoidno obliko (2).

Hidrofobni deli molekule so najpogostejše nasičene ali nenasičene verige ogljikovodikov in manj pogosto heterociklični ali aromatski obroči. Hidrofilna področja molekule so lahko kationska, anionska ali neionska. PAS razdelimo v skupine glede na naravo hidrofilnega dela molekule (2,3):

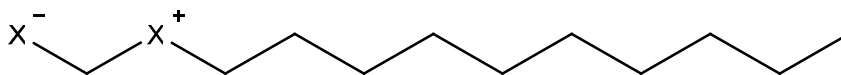
- anionske PAS – hidrofilni del molekule predstavlja negativno nabita skupina (soli sulfonskih kislin, soli karboksilnih kislin, soli fosfornih kislin, soli žveplove(VI) kisline)



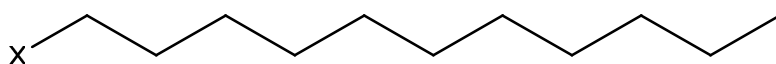
- kationske PAS – hidrofilni del molekule predstavlja pozitivno nabita skupina (kvaterne amonijeve spojine, piridinijeve spojine)



- amfiionske PAS – hidrofilni del molekule predstavljata negativno in pozitivno nabiti skupini (*N*-dodecilalanin, lecitin)



- neionske PAS – hidrofilni del spojine je brez naboja (delni estri večvalentnih alkoholov, monosaharidi)



Na mejni površini voda – olje so molekule PAS orientirane tako, da so hidrofobni deli obrnjeni stran od molekul vode, s čimer dosežejo stanje z najnižjo prosto energijo. Privlačne sile med skupinami, ki so zamenjale molekule vode na površini, so manjše kot med molekulami vode, zaradi česar se zniža tudi površinska napetost (2).

4.1.1 PAS, ki temeljijo na sladkorjih

Pri površinsko aktivnih snoveh, ki temeljijo na sladkorjih, predstavlja hidrofilni del sladkorna komponenta ali pa njeni derivati, hidrofobni del pa alkilna veriga. Prednosti teh PAS so, da so biorazgradljive, neagresivne do kože in da se pridobivajo iz obnovljivih virov. Raziskave so pokazale, da so tudi termostabilne, saj tvorijo vodikove vezi z vodo, ki preprečujejo dehidracijo sladkorne enote v širšem temperaturnem območju. PAS, ki temeljijo na sladkorjih, so lahko v tekočem ali trdnem agregatnem stanju. Uporabljajo jih pri ekstrakcijah, čiščenju in izolaciji membranskih proteinov in za povečanje koloidne stabilnosti liposomov (4, 5).

4.1.2 Biološke membrane

Biološka membrana razmejuje celico od zunajceličnega prostora in omejuje predelke v celici. Uravnava prehajanje snovi v celico in iz nje, zagotavlja ohranjanje konstantnega notranjega okolja v celici in omogoča komunikacijo celice z okoljem. Osnovno ogrodje

biološke membrane je fosfolipidni dvosloj, ki je sestavljen iz fosfolipidov, glikolipidov in holesterola (6).

Fosfolipidi so estri fosforjeve(V) kisline. Alkoholna komponenta estra je glicerol, ki ima dve –OH skupini, zaestreni z maščobnima kislinama, eno pa s fosforjevo(V) kislino, na katero je vezana še organska baza holin (7). Glikolipidi se od fosfolipidov razlikujejo po tem, da ne vsebujejo fosforjeve kisline, temveč sladkor. Običajno je to galaktoza, redkeje glukoza, lahko pa je sladkorjev tudi več (5). Glikolipidi se nahajajo le na zunanji plasti lipidnega dvosloja biološke membrane in imajo poleg oblikovanja strukture membrane tudi druge posebne naloge: prepoznavanje na celični površini, naloge pri tkivno specifičnem povezovanju celic in naloge pri prevajanju živčnih impulzov (7, 8).

Holesterol je policiklični alkohol z eno dvojno vezjo v ciklopentanoperhidrofenantrenskem skeletu. Z vrivanjem med sosednji molekuli fosfolipida v lipidnem dvosloju uravnava fluidnost bioloških membran (9).

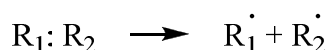
Membranski lipidi imajo skupno značilnost, amfifilnost, ki omogoča njihovo združevanje v vodnem okolju v stabilno dvoslojno razporeditev, ki jo vzdržujejo hidrofobne interakcije (6). Po Singer-Nicholsonovem modelu tekočega mozaika je biološka membrana dinamična delno tekoča struktura iz mozaično in asimetrično razporejenih molekul lipidov in preoteinov, ki se razmeroma lahko gibljejo predvsem v lateralni smeri, medtem ko so premiki v vertikalni smeri iz ene plasti lipidov v drugo bolj omejeni (6).

4.2 RADIKALI

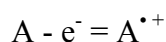
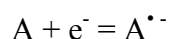
Radikali so atomi, ioni, molekule ali kompleksi, ki vsebujejo vsaj en nesparjen elektron. Imajo lahko pozitiven ali negativen naboj, lahko pa so nevtralni. Zaradi nesparjenega elektrona so zelo reaktivni in posledično nestabilni. Radikali imajo v človeškem telesu dvojno naravo. So intermediati v encimskih reakcijah, reaktivni dejavniki v obrambnem sistemu in so vpleteni v prenos signalov. Po drugi strani so radikali škodljivi, saj so začetniki mnogih patoloških procesov ter povzročajo številne celične poškodbe.

Radikali nastajajo pri homolitski cepitvi kovalentnih vezi, pri redoks reakcijah in pri ionizaciji:

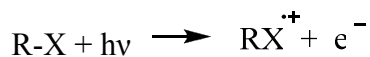
- homolitska cepitev kovalentne vezi



- redoks reakcije

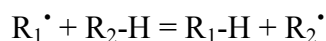


- ionizacija

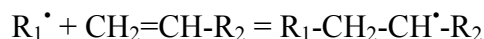


Radikalske reakcije so na splošno zelo hitre, razvejane, stalno prisotne in nanje ne vplivajo okoliški pogoji. Za radikalske reakcije je značilno, da pri njih nastanejo novi radikali, ki spet reagirajo naprej in tako sprožijo verižno reakcijo. Na tak način povzročijo v telesu veliko škodo. Produkt radikalskih reakcij je lahko nov radikal ali pa v primeru reakcije dveh radikalov neradikalni produkt:

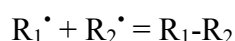
- odtegnitev vodikovega atoma



- adicija na dvojno vez



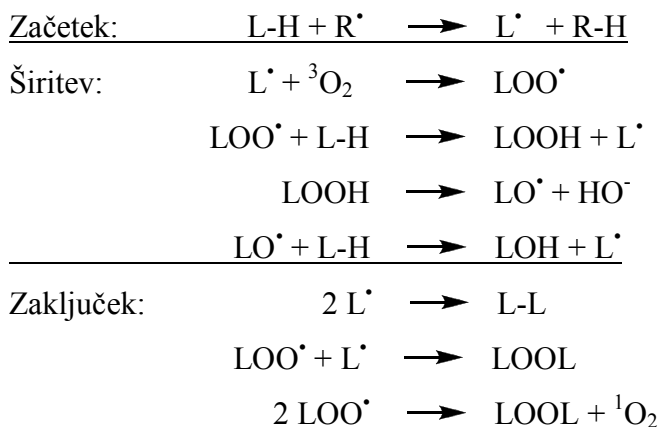
- reakcija dveh radikalov



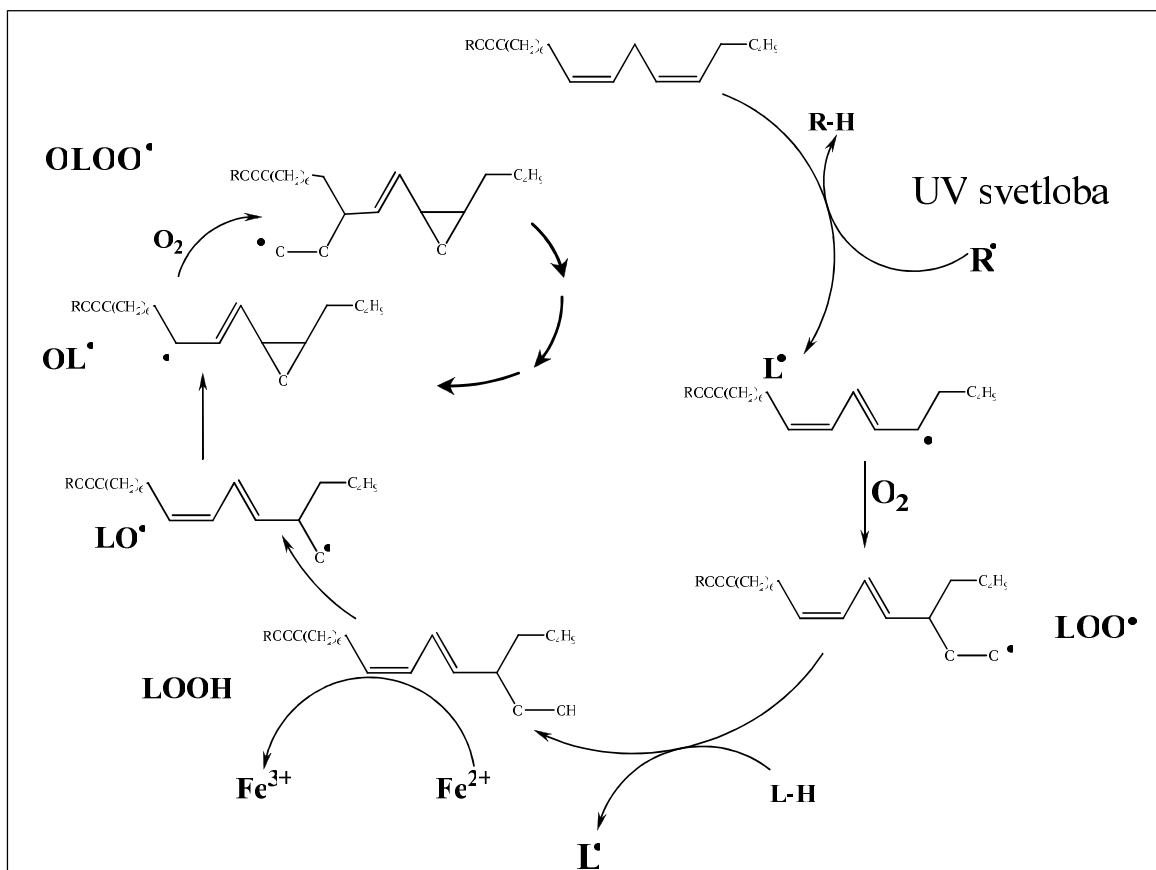
Radikali stalno nastajajo, so stalno prisotni, so kratkoživi, se hitro pretvarjajo, stalno povzročajo poškodbe deoksiribonukleinske kisline (DNA), proteinov in lipidov (10, 11, 12, 13).

4.2.1 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LP) je nekontrolirana oksidacija lipidov v biološki membrani, ki se začne kot radikalska reakcija in se nadaljuje v kompleksen in prepleten sistem oksidacij, ki na koncu privede do propada celične membrane (slika 1). Sprožitev LP lahko sproži hidroksilni radikal oziroma vsak radikal, ki je sposoben odvzeti atom vodika molekuli lipida. K širitvi LP pomembno prispevajo lipidni in drugi sekundarno nastali radikali, bakrovi in železovi ioni. Verižne reakcije lipidne peroksidacije so naslednje:



L-H = polinenasičene maščobne kisline



Slika 1: primer lipidne peroksidacije.

LP poteka na nenasičenih maščobnih kislinah fosfolipidov, retinolu in holesterolu. Posledice LP so strukturne in funkcionalne spremembe bioloških membran:

- spremenjena fluidnost membrane in funkcija ionskih kanalov
- spremenjena funkcija membransko vezanih encimov
- povečana permeabilnost

Produkti lipidne peroksidacije (aldehidi, ketoni, epoksidi, nižje maščobne kisline, številni kratki ogljikovodiki,...) tvorijo adukte in prečne povezave s proteini in DNA, ker se izraža v poškodbah DNA in mutagenizi (12).

4.2.2 Oksidativni stres

Če je v celici preveč oksidantov, oziroma je porušeno ravnotežje med oksidanti in antioksidativno obrambo, nastopi oksidativni stres, kar vodi v poškodbe pomembnih biomolekul in celic s potencialnim vplivom na celo telo. Oksidativni stres lahko resno poškoduje življenjsko pomembne molekule kot so lipidi, DNA, proteini in, če pride do

neravnovesja med prisotnostjo/tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo. Slednja sestoji iz množice neencimskih in encimskih antioksidantov, ki morajo biti prisotni v predelih telesa, kjer poteka oksidacija (14). V bolezenskih stanjih je endogena produkcija radikalov in/ali reaktivnih kisikovih spojin povečana in poteka nenadzorovano na mestu poškodbe ali obolenja (12). Do oksidativnega stresa pride zaradi povečanega nastajanja radikalov in drugih reaktivnih zvrsti, ki so posledica:

- pomanjkanja encimov: superoksid-dismutaze, katalaze, glutathion peroksidaze
- pomanjkanja antioksidantov v hrani
- kroničnega vnetja
- radioaktivnega sevanja
- psihičnega stresa in ekstremne fizične obremenitve

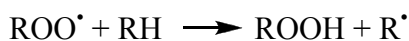
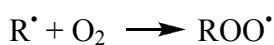
Oksidativni proces je udeležen v etiologiji številnih bolezenskih stanj, kot so degenerativne bolezni, rak, vnetne bolezni, srčne bolezni, hemokromatoze, mišična distrofija, emfizem, želodčne razjede, ateroskleroza in številne druge bolezni (12, 13).

4.2.3 Avtooksidacije

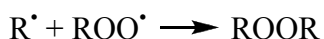
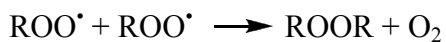
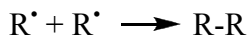
Avtooksidacija je ireverzibilna verižna reakcija, kjer se spojina počasi oksidira ob prisotnosti kisika zlasti v lipofilnih sistemih. Verižna reakcija poteka v treh stopnjah: iniciacija, propagacija in terminacija. V fazi iniciacije nastajajo radikali pod vplivom svetlobe, toplote ali sledov ionov prehodnih elementov.



Nastali radikali v fazi propagacije reagirajo s kisikom in tvorijo peroksi radikale $ROO^{\bullet}$. Peroksi radikali odvzamejo vodik 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.



Propagacija se lahko nadaljuje do celotne porabe organske spojine ali kisika v sistemu, vendar ponavadi pride prej do terminacije, kjer radikali reagirajo med seboj in tvorijo neaktivne produkte.



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

Preprečevanje oksidacij v zdravilih je izrednega pomena, saj lahko nastanejo številni oksidativni produkti. 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 (15).

4.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so spojine, ki lahko večinoma že v nizkih koncentracijah upočasnijo, prekinejo ali preprečijo verižne reakcije in druge nekontrolirane reakcije oksidacije, ki jih sprožajo bodisi reaktivni radikali bodisi druge reaktivne zvrsti kisika in dušika (10).

Antioksidanti so bodisi endogenega izvora (kot npr. encimi: superoksid-dismutaza, katalaza; drugi proteini in peptidi: albumin, transferin, ceruloplazmin, haptoglobin, hemopeksin, glutation; nepeptidne spojine: koencim Q₁₀, sečna kislina, lipojska kislina, melatonin) ali pa jih pridobimo izključno s hrano (tokoferol (vit. E), askorbinska kislina (vit. C), karotenoidi, polifenoli, flavonoidi). Endogena sinteza nekaterih antioksidantov (npr. koencim Q₁₀) se s starostjo zmanjšuje, zato postanejo vse bolj pomembni eksogeni viri (14).

Vpletenost antioksidantov v preprečevanju razvoja patoloških procesov in procesov zaviranja staranja povečuje pomen razvoja antioksidantov kot zdravilnih učinkovin. Z njihovo pravilno uporabo bi razvoj mnogih bolezni preprečili ali upočasnili že na samem začetku (16).

Antioksidante uporabljamo tudi pri zaščiti učinkovin pred oksidativnim kvarjenjem. Imeti morajo ustrezne lastnosti: biti morajo fiziološko sprejemljivi tako v oksidirani kot tudi v reducirani obliki, ne smejo reagirati z učinkovino, pomožnimi snovmi ali embalažo in morajo delovati v širokem pH in temperaturnem območju (15).

4.3.1 Oksimi kot antioksidanti

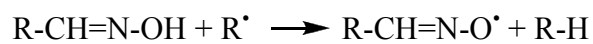
Oksimi so spojine, ki jih v farmaciji največ uporabljamo za ponovno aktivacijo z organofosfati ireverzibilno zavrtih acetilholinesteraz (AChE). Organofosfati so klasični zaviralci holinesteraz, ki jih uporabljamo kot pesticide in lahko povzročijo oksidativni stres pri podganah, miših in v človeškem organizmu, 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 (17).

Pri ugotavljanju antioksidativnih lastnosti spojine butan-2,3-dion tiosemikarbazon oksim so ugotovili, da oksim reagira z radikali in drugimi reaktivnimi kisikovimi zvrstmi ter kelira kovinske ione. Oksim tudi nevtralizira lipidno peroksidacijo, povzročeno z

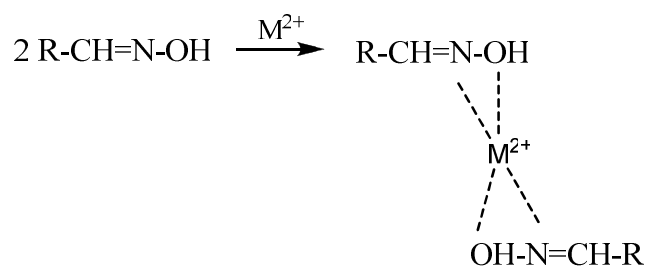
različnimi oksidativnimi spojinami. Poleg tega lahko oksimi preprečijo serumsko oksidacijo in oksidacijo LDL ter s tem nastanek in razvoj ateroskleroze (18).

Oksimi delujejo antioksidativno na dva načina:

- neposredno reagirajo z radikali



- kelirajo kovinske ione



5. NAČRT DELA

Namen te diplomske naloge je načrtovanje in sinteza amfifilnih oksimskih antioksidantov. Za doseg tega cilja bomo upoštevali zakonitosti, ki so potrebne pri načrtovanju in sintezi amfifilnih molekul z antioksidativnim delovanjem. Polarni del molekule bodo predstavljale modificirane molekule sladkorja in funkcionalna skupina z antioksidativnim delovanjem, nepolarni del pa različno dolge alkilne verige. Sintetizirali bomo dva tipa spojin z modificirano sladkorno molekulo: spojine s petčlenskimi obroči na osnovi riboze in spojine s šestčlenskimi obroči na osnovi galaktoze.

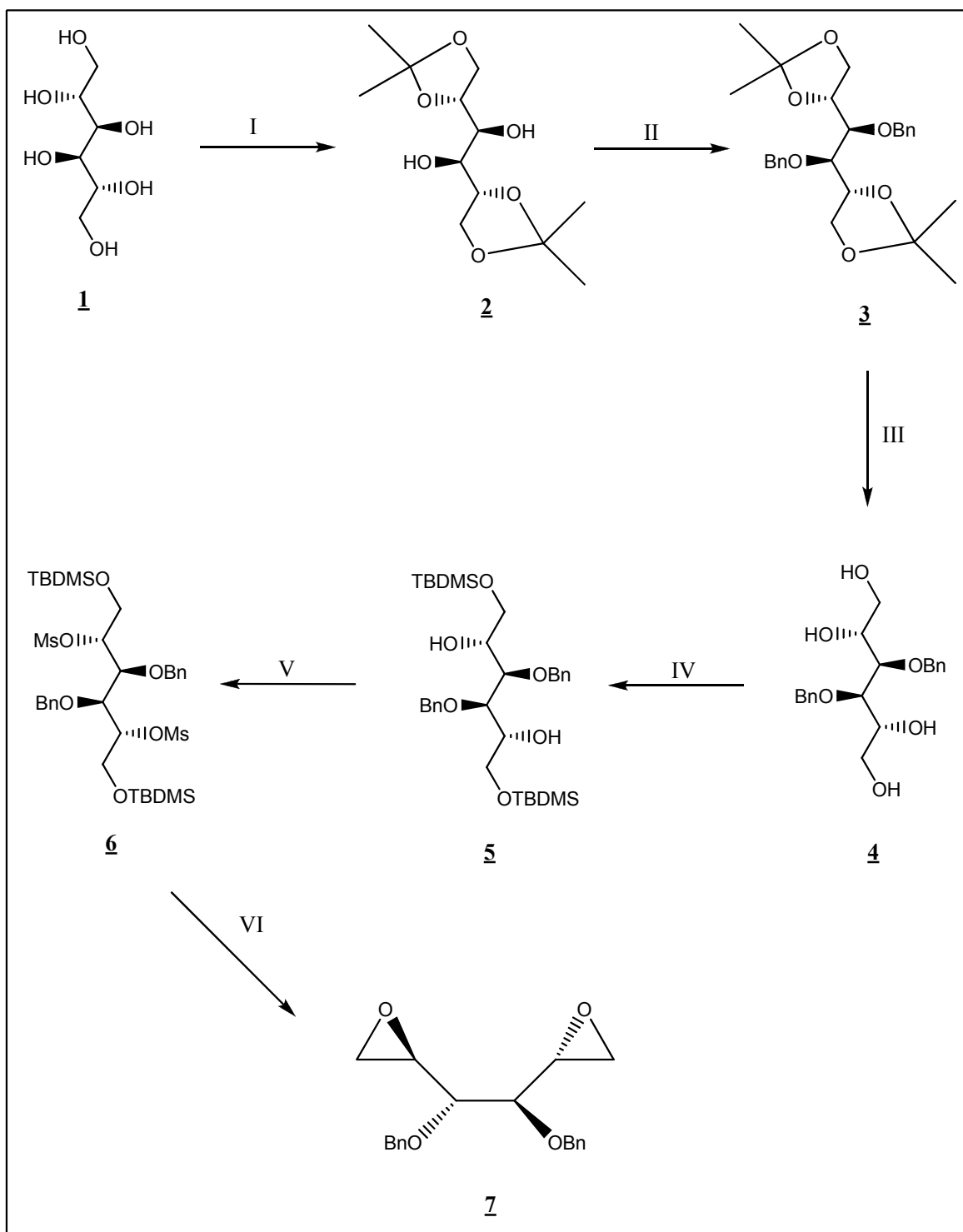
Pri spojinah na osnovi riboze bomo kot izhodno spojino uporabili manitol. V prvi stopnji bomo zaščitili hidroksilne skupine na mestih 1,2 in 5,6 manitola v obliki acetonida z 2,2-dimetoksiopropanom. Nato bomo z benzilbromidom zaščitili še ostali hidroksilni skupini na mestih 3 in 4. Sledila bo hidroliza diacetonida z očetno kislino in regioselektivna zaščita hidroksilnih skupin s terc-butildimetilsililkloridom na mestih 1 in 6. Hidroksilni skupini na mestih 2 in 5 bomo pretvorili v dobri izstopajoči skupini z mesilkloridom. V zadnji stopnji bomo najprej hidrolizirali sililni eter s koncentrirano klorovodikovo kislino in nato po dodatku kalijevega hidroksida v bazičnem okolju sintetizirali bis-epoksid.

Pri spojinah na osnovi šestčlenskega obroča bomo kot izhodno spojino uporabili D-galaktozo. Najprej bomo zaščitili hidroksilne skupine na mestih 2,3 in 4,5 D-galaktoze v obliki acetonida. Nato bomo alkilirali preostalo nezaščiteno hidroksilno skupino na mestu 6 z ustreznim alkilbromidom. Sledila bo odščita hidroksilnih skupin na mestih 2,3 in 4,5 s trifluoroocetno kislino. V zadnji stopnji bomo s hidroksilaminom v piridinu na mestu anomerne hidroksilne skupine tvorili oksim. Produkta vseh sinteznih stopenj bomo ustrezno očistili in ovrednotili z NMR, MS in IR.

Dobljene produkte bomo poslali raziskovalcem na Katedro za farmacevtsko tehnologijo, ki jih bodo ovrednotili z vidika njihovega antioksidativnega delovanja.

5.1 REAKCIJSKE SCHEME

5.1.1 Reakcijska shema I



I: 2,2-dimetoksipropan, 1,2-dimetoksietan, SnCl_2

II: NaH, imidazol, THF, $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{I}^-$, BnBr

III: $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$

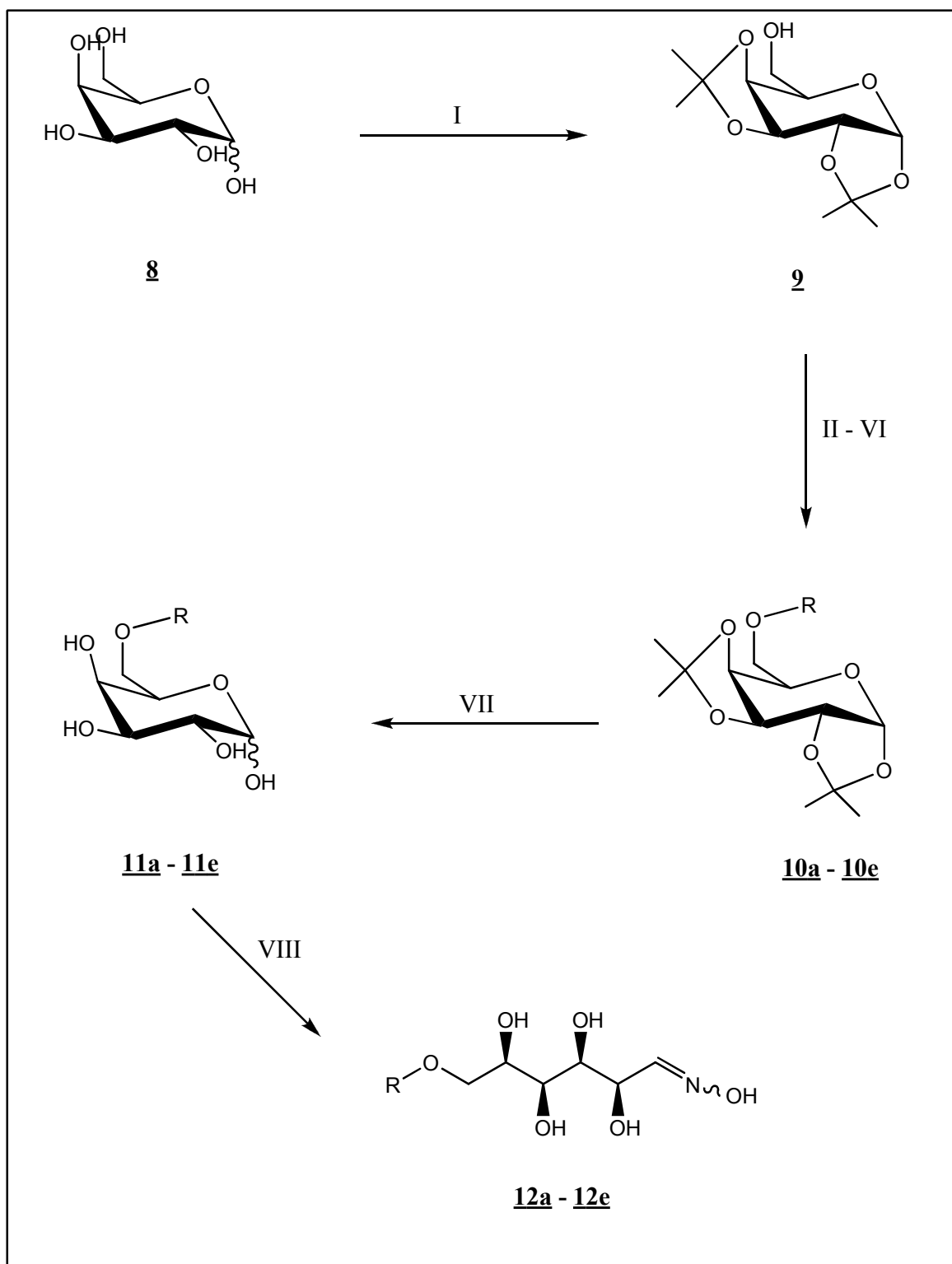
IV: TBDMSCl, Imidazol, THF

V: Et_3N , MsCl, CH_2Cl_2

VI: 1. HCl (12M), CH_3OH

2. KOH (20%)

5.1.2 Reakcijska shema II



I: aceton, CuSO_4 , H_2SO_4

II: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$, dioksan, NaH, 15-Crown-5, imidazol

III: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Br}$, dioksan, NaH, 15-Crown-5, imidazol

IV: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$, dioksan, NaH, 15-Crown-5, imidazol

V: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{Br}$, dioksan, NaH, 15-Crown-5, imidazol

VI: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{Br}$, dioksan, NaH, 15-Crown-5, imidazol

VII: $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O} = 4/1$

VIII: NH_2OH , piridin

6. MATERIALI IN METODE

6.1 MATERIALI

Kemikalije in topila

Pri sinteznem delu smo uporabili reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, Sigma – Aldrich, Fluka in Merck.

Aparature

Standardna laboratorijska oprema: rotavapor, laboratorijska tehcnica, UV – lučka, magnetni mešalnik, eksikator

Risanje struktur

Za risanje spojin in za pomoč pri razlaganju ^1H spektrov smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

6.2 METODE

6.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabili smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF₂₅₄ z 0,25 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Uporabljali smo različne mobilne faze ki so navedene pri vsaki spojini posebej. Za detekcijo spojin smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino $\lambda = 254 \text{ nm}$ in orositveni reagent s fosformolibdenovo kislino.

6.2.2 Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre so nam posneli na spektrometru Bruker AVANCE DPX₃₀₀ pri 300,15 MHz na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, NMR center. Uporabljali smo devterirana topila: DMSO – d₆, CDCl₃ ali piridin – d₅.

Masna spekrometrija (MS)

Masne spektre so nam posneli na spektrometru Varian – MAT 311 A z EI, ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Infrardeča Spektroskopija (IR)

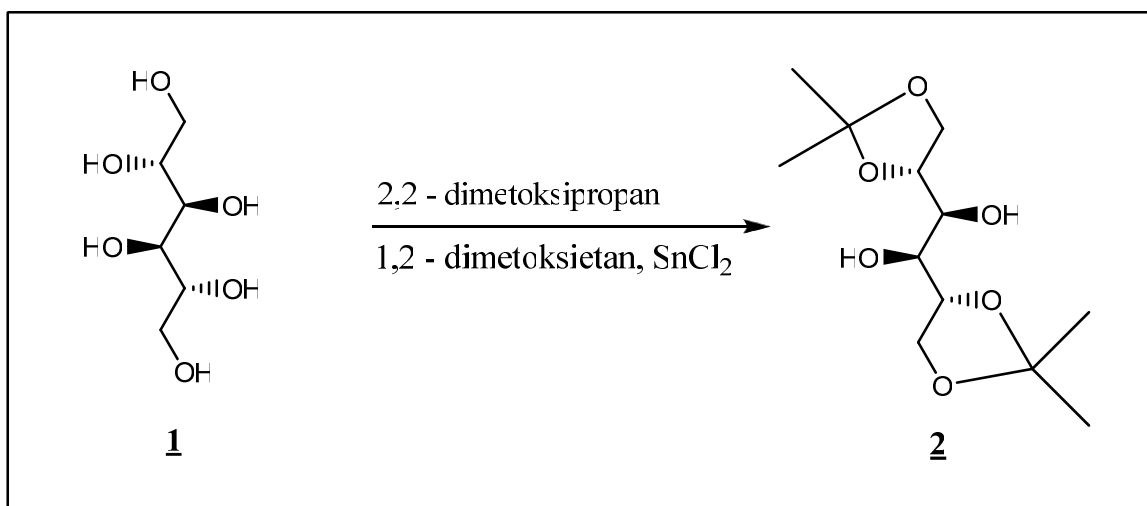
IR spektre so posneli na spektrometru Perkin Elmer 1600 FT – IR System, Spectrum BX na fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Tališče

Temperaturo tališč spojin smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico znamke Leica. Temperature tališč niso korigirane.

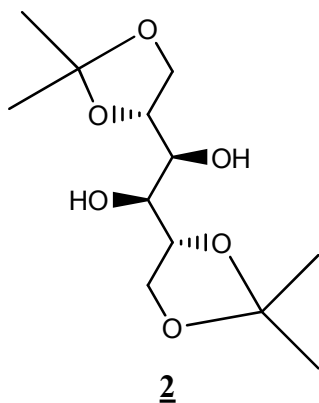
7. EKSPERIMENTALNI DEL

7.1 SINTEZA (1*S*,2*S*)-1,2-BIS((*R*)-2,2-DIMETIL-1,3-DIOKSOLAN-4-IL)ETAN-1,2-DIOLA



Postopek:

75,0 g (0,41 mol) D-manitola in 120 mL (0,98 mol) predhodno destiliranega 2,2-dimetoksiopropana smo dodali k 180 mL (1,73 mol) 1,2-dimetoksietana. Po mešanju smo dodali še 0,075 g (0,4 mmol) kositrovega klorida in segrevali na 74°C za 90 minut, oziroma dokler se raztopina ni zbistrila. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli (0°C), dodali 0,09 mL (114 mmol) piridina in pod znižanim tlakom odparili topila. Bel, surov produkt smo ohladili in suspendirali v 540 mL diklorometana. Po eni uri mešanja smo oborino odfiltrirali s presesavanjem. Topila smo odparili pri znižanem tlaku. Tako dobljen produkt smo prekrizalizirali iz diizopropiletra, posušili na zraku in nato še na turbo črpalki do konstantne mase. Dobili smo 42,3 g (0,161 mol) belih kristalov.

(1*S*,2*S*)-1,2-bis((*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)etan-1,2-diol

$$\eta = 0,39$$

$$M_r = 262,30$$

Elementna sestava: C₁₂H₂₂O₆

$$T_t = 120 - 122\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$R_f = 0,4 \text{ (cikoheksan/ EtOAc = 1/1)}$$

Beli kristali

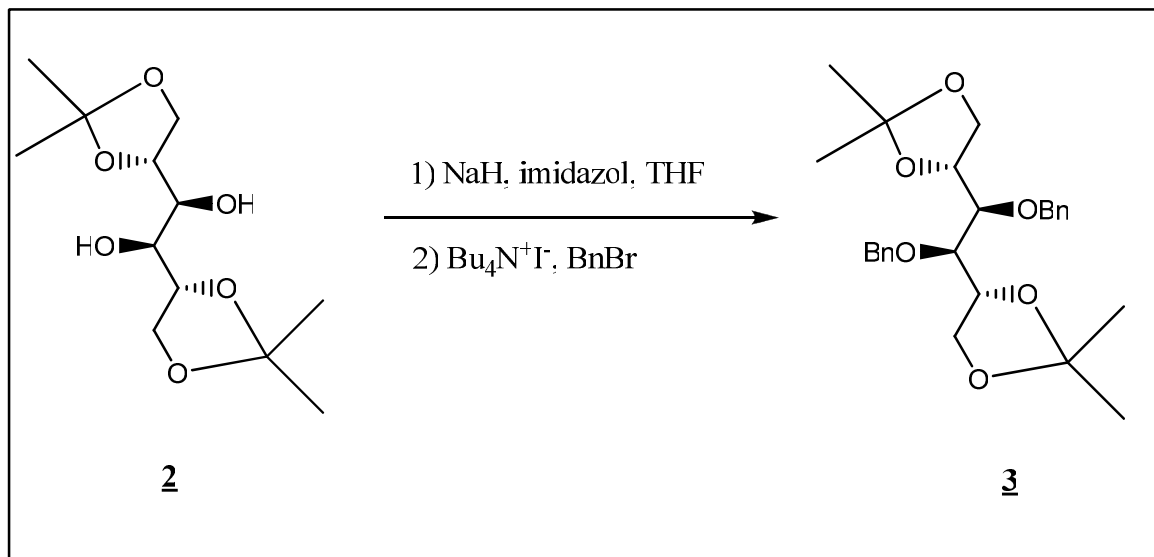
Analize (1*S*,2*S*)-1,2-bis((*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)etan-1,2-diola

¹H – NMR (300,15 MHz, DMSO – d₆): δ 1,26 (s, 6H, 2 x CH₃); 1,29 (s, 6H, 2 x CH₃); 3,44 (t, 2H, J=7,87 Hz, 2 OH); 3,87 (m, 2H, 2 x CH-OH); 4,00 (m, 4H, 2 x CH₂); 4,68 (d, J=7,68 Hz, 2H, 2 x CH-O-) ppm

MS ESI: m/z (%): 285 ((M+Na)⁺, 35), 579 ((2M+Na)⁺, 34), 147(100)

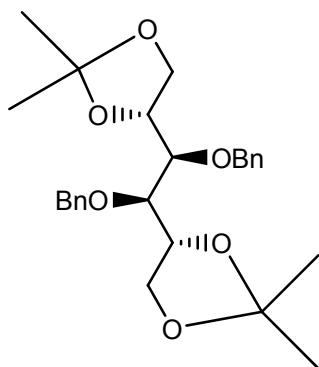
IR (KBr): ν 3403, 2933, 2935, 2894, 2367, 2345, 1690, 1492, 1386, 1373, 1262, 1213, 1160, 1126, 1069, 1041, 1011 cm⁻¹

7.2 SINTEZA (1R,2R)-1,2-BIS(BENZILOKSI)-1,2-BIS((R)-2,2-DIMETIL-1,3-DIOKSOLAN-4-IL)ETANA (SINTEZA L-IDO BIS-EPOKSIDA)



Postopek:

V 186 mL predhodno destiliranega tetrahidrofurana (THF) smo dali 42,3 g (0,161 mol) spojine 1 in nekaj kristalčkov imidazola. Reakcijski zmesi smo ob mešanju na ledeni kopeli (0 °C) postopoma in previdno dodali 9,7g (405 mmol) natrijevega hidrida. Po dveh urah mešanja pri 0 °C smo dodali 2,98 g (8,075 mmol) tetra-n-butilamonijevega jodida in po kapljicah 49 mL (0,404 mol) benzilbromida. Reakcijsko zmes smo čez noč mešali pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo v rumeno reakcijsko mešanico dodali 300 mL metanola in odparili topila pri znižanem tlaku. Dodali smo 400 mL diklorometana, fazi ločili in organsko fazo spirali z 2 x 170 mL prečiščene vode ter 1 x 170 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. Sušili smo z natrijevim sulfatom in odparili topila pri znižanem tlaku. Dobili smo 70.5 g (0,159 mol) rumenega olja.

(1*R*,2*R*)-1,2-bis(benziloksi)-1,2-bis((*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)etan**3** $\eta = 0,99$ $M_r = 442,54$ Elementna sestava: $C_{26}H_{34}O_6$ $R_f = 0,65$ (cikloheksan/ EtOAc = 1/1)

Rumeno olje

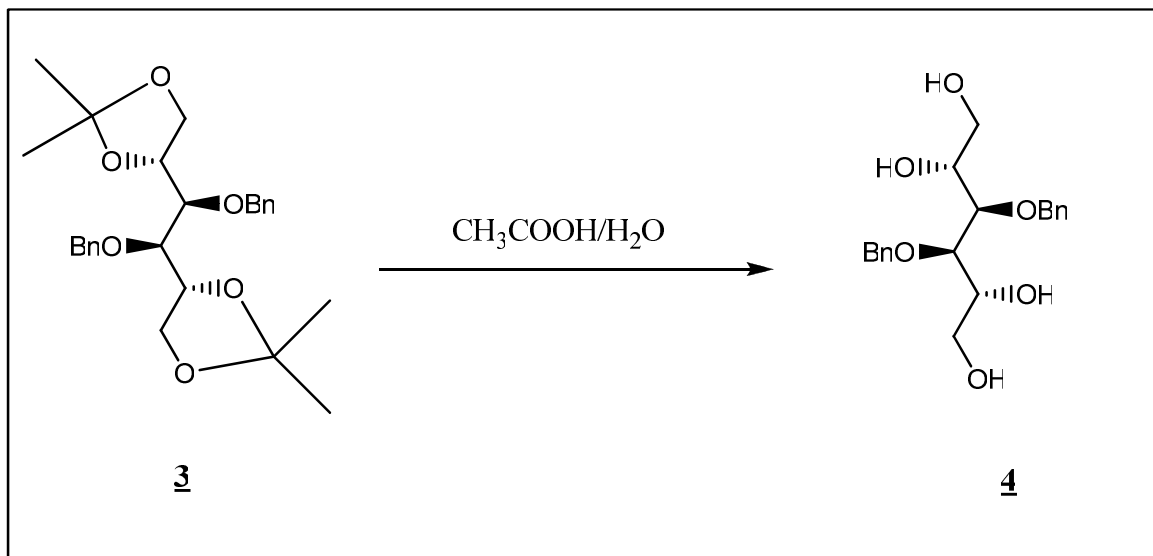
Analize (1*R*,2*R*)-1,2-bis(benziloksi)-1,2-bis((*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioksolan-4-il)etana

1H – NMR (300,15 MHz, DMSO – d_6): δ 1,28 (s, 6H, 2 x $\underline{CH_3}$); 1,35 (s, 6H, 2 x $\underline{CH_3}$); 3,68 (m, 4H, 2 x $\underline{CH_2-O-}$); 3,95 (t, 2H, $J=6,55$ Hz, 2 x $\underline{CH-OH}$); 4,24 (m, 2H, 2 x $\underline{CH-O-}$); 4,64 (m, 4H, 2 x $\underline{CH_2-Ar}$); 7,31 (m, 10H, H_{Ar} , 2 x Ph) ppm

MS ESI: m/z (%): 443 (MH^+ , 20), 460 ($(M+NH_4)^+$, 8), 465 ($(M+Na)^+$, 4), 481 ($(M+K)^+$, 2), 242 (100)

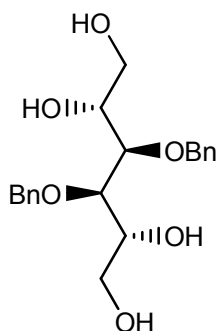
IR (NaCl): ν 3482, 3089, 3064, 3031, 2986, 2934, 2879, 2361, 2344, 1953, 1870, 1811, 1702, 1605, 1541, 1497, 1454, 1380, 1371, 1346, 1309, 1249, 1213, 1163, 1126, 1071, 1029 cm^{-1}

7.3 SINTEZA (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-BIS(BENZILOKSI)HEKSAN-1,2,5,6-TETRAOLA



Postopek:

800 mL 70% (V/V) očetne kisline smo previdno dodali k 70,5 g (0,159 mol) spojine **3**. Reakcijsko zmes smo mešali 5 ur pri temperaturi 45 °C in prekrystalizirali iz 300 mL dietiletra. Zaradi slabega izkoristka prekrystalizacije smo matičnico očistili s kolonsko kromatografijo. Dobili smo 36,2 g (0,10 mol) rumenega olja.

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benziloksi)heksan-1,2,5,6-tetraol

$$\eta = 0,63$$

$$M_r = 362,17$$

Elementna sestava: C₂₀H₂₆O₆

$$R_f = 0,27 \text{ (EtOAc)}$$

Rumeno olje

4

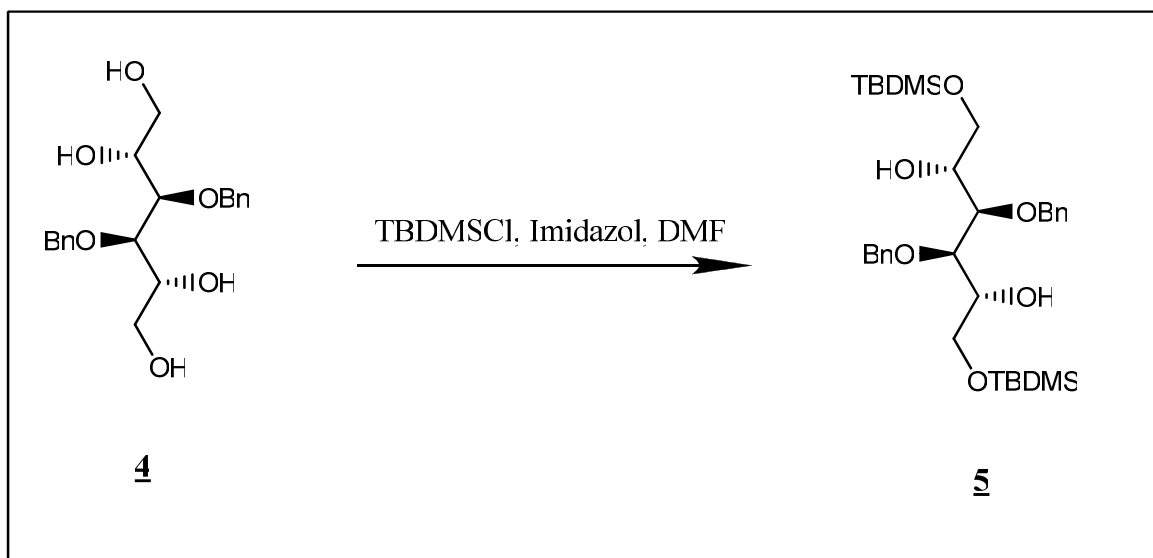
Analize (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benziloksi)heksan-1,2,5,6-tetraola

¹H – NMR (300,15 MHz, DMSO – d₆): δ 3,50(m, 2H, 2 x CH-O-); 3,70 (m, 4H, 4 x CH₂-OH); 3,77 (d, 2H, J=8,65 Hz, 2 x CH-OH); 4,47 (t, 2H, J=10,8 Hz, 2x -OH); 4,56 (d, 2H, J=11,1 Hz, 2 x OH); 4,67 (t, 4H, J=5,6 Hz, 2 x CH₂-Ar); 7,30 (m, 10H, H_{Ar}, 2 x Ph) ppm

MS ESI: m/z (%): 363 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3401, 3089, 3065, 3033, 2993, 2899, 2875, 2364, 2345, 1951, 1624, 1497, 1455, 1420, 1396, 1345, 1280, 1222, 1180, 1096, 1072, 1056, 1028, 1002 cm⁻¹

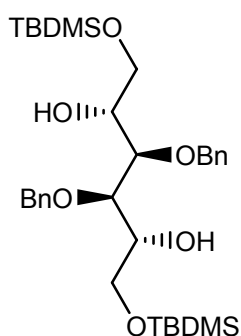
7.4 SINTEZA (6*R*,7*R*,8*R*,9*R*)-7,8-BIS(BENZILOKSI)-2,2,3,3,12,12,13,13-OKTAMETIL-4,11-DIOKSA-3,12-DISILATETRADEKAN-6,9-DIOLA



Postopek:

36,2 g (0,1 mol) spojine **4** smo raztopili v 100 mL dimetilformamida in na ledeni kopeli (0 °C) dodali 25 g (0,37mol) imidazola ter 33,2 g (0,22 mol) *tert*-butildimetilsililklorida. Po dveh urah mešanja na 0 °C smo dodali 200 mL raztopine amonijevega klorida. Vodno fazo smo ekstrahirali s 3 x 150 mL diklorometana. Združili smo organske faze, sušili z natrijevim sulfatom in odparili topila pri znižanem tlaku. Dobili smo 45,11 g (0,076 mol) rumenega olja.

(6*R*,7*R*,8*R*,9*R*)-7,8-bis(benziloksi)-2,2,3,3,12,12,13,13-oktametil-4,11-dioksa-3,12-disilatetradekan-6,9-diol



$\eta = 0,76$

$M_r = 590,94$

Elementna sestava: $C_{32}H_{54}O_6Si_2$

$R_f = 0,39$ (cikloheksan/EtOAc = 85/15)

Rumeno olje

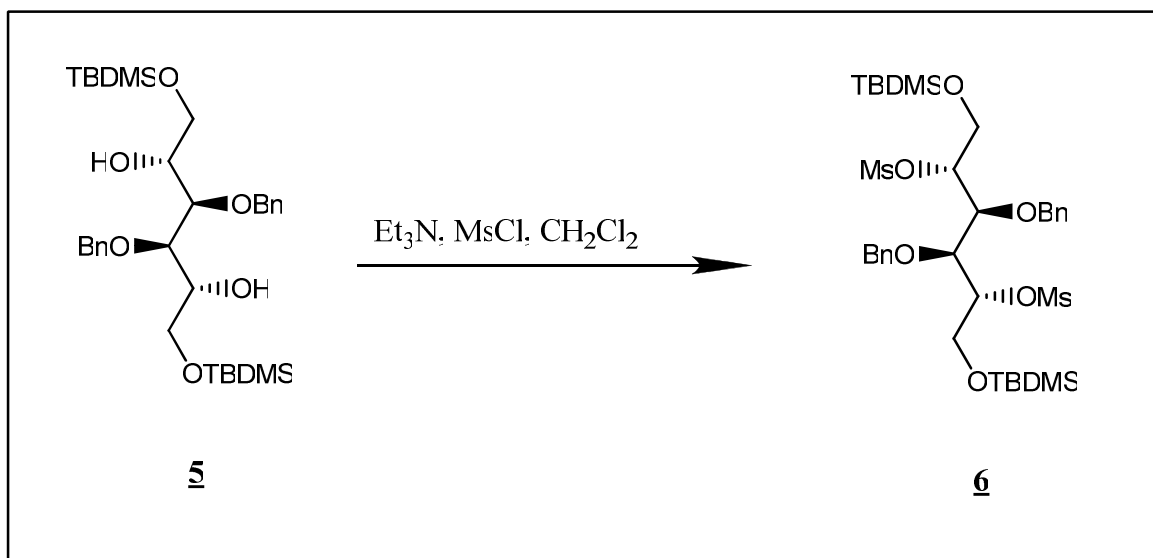
5

Analize (6*R*,7*R*,8*R*,9*R*)-7,8-bis(benziloksi)-2,2,3,3,12,12,13,13-oktametil-4,11-dioksa-3,12-disilatetradekan-6,9-diola

1H – NMR (300,15 MHz, DMSO – d_6): δ 0,05 (d, 12H, $J=3,87$ Hz, 4 x Si-CH₃); 0,88 (s, 18H, 6 x CH₃C); 3,5 (m, 2H, 2 x CH-O-); 3,7 (m, 4H, 2 x CH₂); 3,77 (d, 2H, $J=8,64$ Hz, 2 x CH-OH); 4,56 (d, 2H, $J=11,1$ Hz, 2 x -OH); 4,67 (t, 4H, $J=5,61$ Hz, 2 x CH₂-Ar), 7,30 (m, 10H, H_{Ar}, 2 x Ph) ppm

MS ESI: m/z (%): 592 (MH⁺, 100)

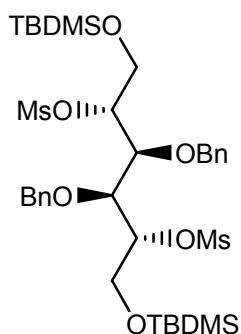
7.5 SINTEZA (6*R*,7*S*,8*S*,9*R*)-7,8-BIS(BENZILOKSI)-2,2,3,3,12,12,13,13-OKTAMETIL-4,11-DIOKSA-3,12-DISILATETRADEKAN-6,9-DIILDIMETANSULFONATA



Postopek:

K 45,11 g (0,076 mol) spojine **5** smo dodali 120 mL diklorometana in 41,1 mL (0,30 mol) trietilamina, ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in po kapljicah dodali 16,6 mL (0,21 mol) mezilklorida. Reakcijsko zmes smo mešali eno uro pri sobni temperaturi. Dodali smo 200 mL vode, ekstrahirali s 3 x 200 mL diklorometana in 1 x 100 mL nasičene raztopine natrijevega klorida ter dodali sušilno sredstvo natrijev sulfat. Diklorometan smo odparili pri znižanem tlaku. Dobili smo 51,4 g (0,069 mol) rumenega olja.

(6*R*,7*S*,8*S*,9*R*)-7,8-bis(benziloksi)-2,2,3,3,12,12,13,13-oktametil-4,11-dioksa-3,12-disilatetradekan-6,9-diildimetansulfonat



$$\eta = 0,90$$

$$M_r = 747,12$$

$$\text{Elementna sestava: } C_{34}H_{58}O_{10}S_2Si_2$$

$$R_f = 0,65 \text{ (cikloheksan/EtOAc = 7/3)}$$

Rumeno olje

6

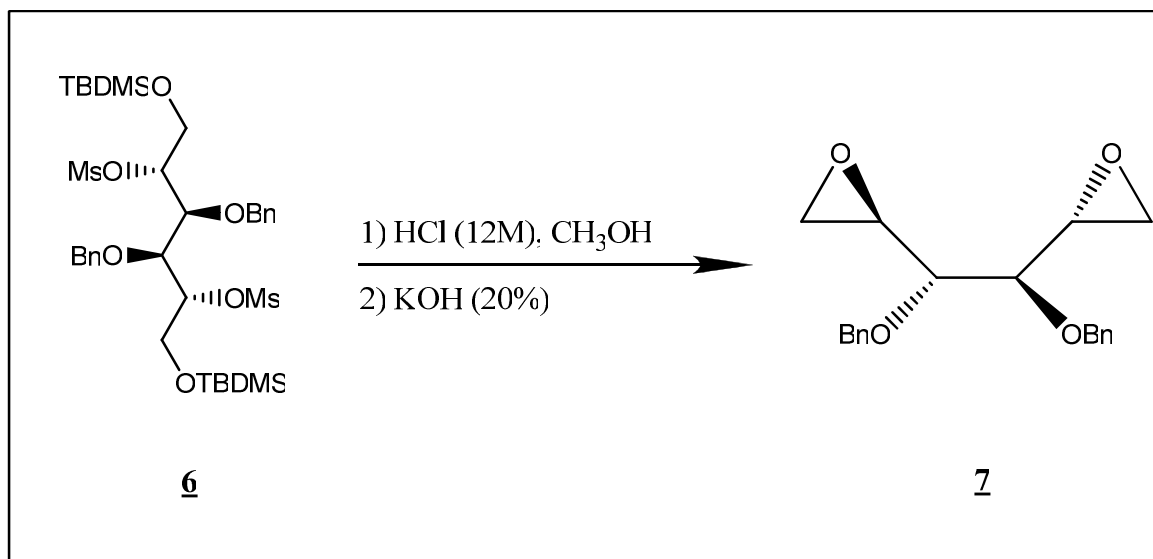
Analize (6*R*,7*S*,8*S*,9*R*)-7,8-bis(benziloksi)-2,2,3,3,12,12,13,13-oktametil-4,11-dioksa-3,12-disilatetradekan-6,9-diildimetansulfonata

¹H – NMR (300,15 MHz, DMSO – d₆): δ 0,08 (m, 12H, 4 x Si-CH₃); 0,86 (m, 18H, 6 x CH₃C); 3,17 (m, 6H, 2 x SO₃CH₃); 3,37 (s, 2H, 2 x CH-O-CH₂-); 3,96 (m, 4H, 2 x CH₂-O-); 4,69 (m, 4H, 2 x CH₂-Ar); 5,75 (s, 2H, 2 x CH-O-Ms); 7,32 (m, 10H, H_{Ar}, 2 x Ph) ppm

MS ESI: m/z (%): 747(MH⁺, 61), 783(100)

IR (NaCl): ν 3391, 3157, 3094, 3065, 3030, 2955, 2933, 2885, 2859, 2362, 2344, 1740, 1589, 1530, 1541, 1497, 1471, 1455, 1353, 1253, 1217, 1174, 1073, 1047, 1005 cm⁻¹

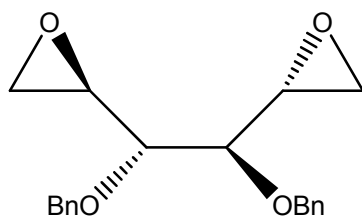
7.6 SINTEZA (1*R*,2*R*)-1,2-BIS(BENZILOKSI)-1,2-DI((*S*)-OKSIRAN-2-IL)ETANA (SINTEZA L-*IDO* BIS-EPOKSIDA)



Postopek:

51,41 g (0,069 mol) spojine **6** smo raztopili v 115 mL metanola, ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in po kapljicah dodali 13,6 mL (0,19 mol) vodne raztopine koncentrirane klorovodikove kisline. Mešali smo dve uri pri sobni temperaturi. Na ledeni kopeli (0 °C) smo previdno dodali še 230 mL (0,84 mol) 20% kalijevega hidroksida. Bazičnost reakcijske zmesi smo nadzorovali s pH papirčki in uravnavali z dodajanjem 20% kalijevega hidroksida. Po treh urah mešanja pri sobni temperaturi smo dodali 350 mL vode in ekstrahirali s 3 x 200 mL diklorometana. Združene organske faze smo ekstrahirali z 1 x 100 mL nasičene raztopine natrijevega klorida. Dodali smo sušilno sredstvo natrijev sulfat in odparili diklorometan pri znižanem tlaku. Surov produkt **7** smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili cikloheksan/EtOAc = 7/3. Nato smo še drugič očistili spojino **7** s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili cikloheksan/EtOAc = 9/1. Dobili smo 5,92 g (181 mmol) brezbarvnega olja.

(1*R*,2*R*)-1,2-bis(benziloksi)-1,2-di((*S*)-oksiran-2-il)etan (krajše trivialno ime je **L-ido bis-epoksid**)



7

$\eta = 0,26$

$M_r = 326,39$

Elementna sestava: $C_{20}H_{22}O_4$

$R_f = 0,35$ (cikloheksan/EtOAc = 7/3)

Brezbarvno olje

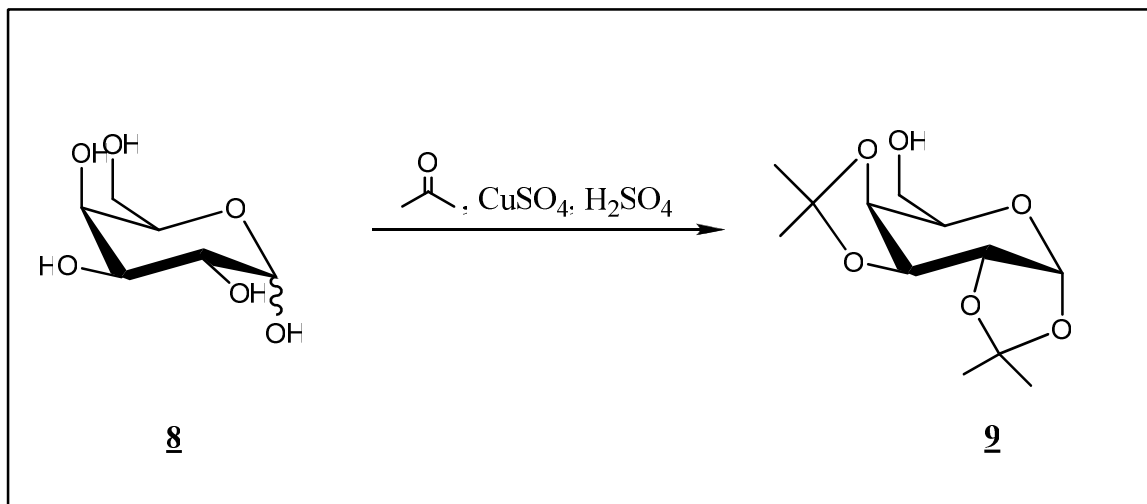
Analize (1*R*,2*R*)-1,2-bis(benziloksi)-1,2-di((*S*)-oksiran-2-il)etana

1H – NMR (300,15 MHz, DMSO – d_6): δ 2,59 (m, 2H, $\underline{CH_2}$); 2,74 (t, 2H, $J=4,62$ Hz, - $\underline{CH_2}$); 3,23 (m, 4H, 4 x $\underline{CH}$); 4,65 (m, 4H, 2 x $\underline{CH_2}$ -Ar); 7,32 (m, 10H, H_{Ar} , 2 x Ph) ppm

MS ESI: m/z (%): 327 (MH^+ , 38), 344 ($(M+NH_4)^+$, 75), 349 ($(M+Na)^+$, 64), 365 ($(M+K)^+$, 48), 509 (100)

IR (KBr): $\nu = 3504, 3087, 3062, 3031, 2998, 2926, 2877, 2360, 2343, 1956, 1880, 1812, 1750, 1606, 1586, 1541, 1496, 1454, 1391, 1355, 1329, 1307, 1254, 1207, 1176, 1091, 1076, 1028\text{ cm}^{-1}$

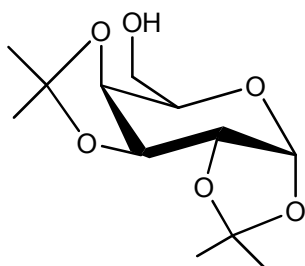
7.7 SINTEZA ((3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-TETRAMETILTETRAHIDRO-3a*H*-BIS[1,3]DIOKSOLO[4,5-*b*:4',5'-*d*]PIRAN-5-IL)METANOLA



Postopek:

Prežarili smo 53 g (333 mmol) bakrovega sulfata do rjavo – sive barve z vročim zrakom na vakuumski črpalki. K zmesi 53 g (333 mmol) bakrovega sulfata, 25 g (139 mmol) D-galaktoze in 530 mL brezvodnega acetona smo dodali 2,7 mL koncentrirane žveplove (VI) kisline. Bučko smo zamašili s septumom in opremili z balončkom z argonom. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo odfiltrirali s presesavanjem (čez stekleni nuč) bakrov sulfat in sprali z nekaj acetona. K raztopini smo dodali ekvivalentno količino 15,4 g (48,6 mmol) barijevega hidroksida. Dodali smo še 6 žlic natrijevega karbonata in 4 žlice kalcijevega oksida. Fino, belo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem, zaostanek smo sprali z nekaj acetona. Topilo smo nato odparili pod znižanim tlakom, da je zaostalo rumeno olje. Rumeno olje smo destilirali pri 1-2 mbar in temperaturi 135 °C. Dobili smo 21.38 g (82,1 mmol) skoraj brezbarvnega olja.

((3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran-5-il)metanol



2

$\eta = 0,25$

$M_r = 260,13$

Elementna sestava: $C_{12}H_{20}O_6$

$R_f = 0,35$ (cikloheksan/EtOAc = 7/3)

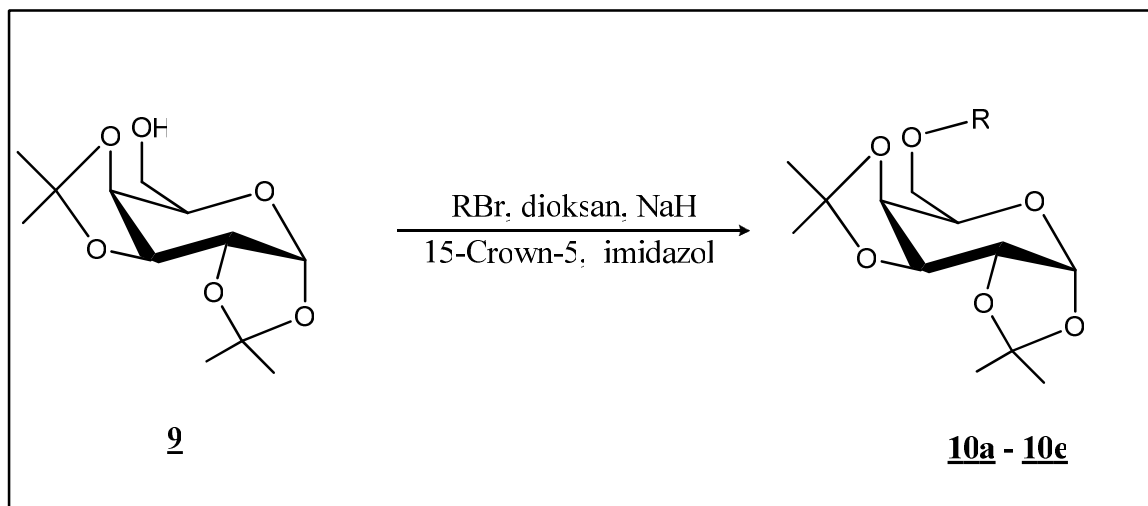
Skoraj brezbarvno olje

Analize ((3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran-5-il)metanola

1H – NMR (300,15 MHz, $CDCl_3$): δ 1,347 (s, 6H, 2 x $\underline{CH_3}$ -C-); 1,467 (s, 3H, $\underline{CH_3}$ -C-); 1,542 (s, 3H, $\underline{CH_3}$ -C-); 2,22 (m, 1H, - $\underline{OH}$); 3,76 (m, 1H, - $\underline{CH_2-CH}$); 3,90 (m, 2H, $\underline{CH_2}$); 4,32 (m, 2H, 2 x $\underline{CH-O-}$); 4,62 (m, 1H, -O- $\underline{CH-CH(O-)_2}$); 5,64 (d, 1H, $J=4,80$ Hz, -O- $\underline{CH-O-}$) ppm

MS ESI: m/z (%): 261 (MH^+ , 100)

7.8 SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO (3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-TETRAMETIL-5-(ALKILOKSIMETIL)TETRAHIDRO-3a*H*-BIS[1,3]DIOKSOLO[4,5-*b*:4',5'-*d*]PIRANOV



Spojina **10a**: R = $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

Spojina **10b**: R = $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$

Spojina **10c**: R = $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$

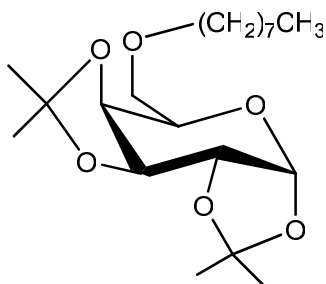
Spojina **10d**: R = $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

Spojina **10e**: R = $-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$

Postopek:

1,5 g (5,76 mmol) Spojine **9** smo raztopili v dioksanu in ohladili na ledeni kopeli (0 °C). Postopoma smo dodali natrijev hidrid in imidazol. Mešali smo eno uro pri sobni temperaturi, dodali 8,64 mmol ustreznega alkilbromida, nekaj kapljic kronskega etra in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo dodali 30 mL metanola in odparili topila pod znižanim tlakom. Suhi ostanek smo raztopili v diklorometanu, prenesli v lij ločnik, dodali 40 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata, 40 mL nasičene raztopine natrijevega klorida ter ekstrahirali z diklorometanom. Fazi smo ločili, organsko fazo smo sušili s natrijevim sulfatom in odparili topilo pod znižanim tlakom. Surove produkte smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri sta mobilno fazo predstavljala eter/petroleter = 1/3.

(3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(oktiloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran

**10a**

m = 891 mg (2,38 mmol)

η = 0,41

Mr = 372,50

Elementna sestava: C₂₀H₃₆O₆

R_f = 0,32 (eter/petroleter = 1/3)

Bledo rumeno olje

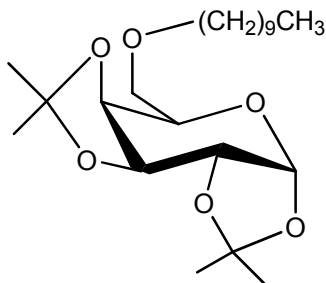
Analize (3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(oktiloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]pirana

¹H – NMR (300,15 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 1,42 (m, 24H, (CH₂)₆ + 4 x CH₃-C); 3,56 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 3,98 (t, 1H, J=6,30 Hz, -CH₂-CH); 4,29 (m, 2H, 2 x CH-O-); 4,61 (m, 1H, -O-CH-CH(O-)₂); 5,54 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-O-) ppm

MS ESI: m/z (%): 373 (MH⁺, 100)

IR (NaCl): ν 3386, 2986, 2928, 2857, 2739, 2360, 2145, 1751, 1457, 1381, 1307, 1292, 1255, 1212, 1170, 1113, 1072, 1003 cm⁻¹

(3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(deciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran

**10b**

m = 1,50 g (3,75 mmol)

η = 0,65

Mr = 400,55

Elementna sestava: C₂₂H₄₀O₆

R_f = 0,32 (eter/petroleter = 1/3)

Bledo rumeno olje

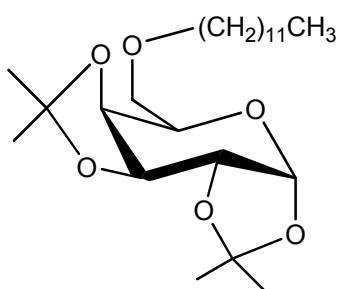
Analize (3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(deciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]pirana

¹H – NMR (300,15 MHz, CDCl₃): δ (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 1,42 (m, 28H, (CH₂)₈ + 4 x CH₃-C); 3,56 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 3,98 (t, 1H, J=6,30 Hz, -CH₂-CH); 4,29 (m, 2H, 2 x CH-O-); 4,61 (m, 1H, -O-CH-CH(O-)₂); 5,54 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-O-) ppm

MS ESI: m/z (%): 401 (MH⁺, 100)

IR (NaCl): ν 3386, 3192, 2980, 2925, 2855, 2738, 2360, 2343, 2146, 2035, 1752, 1457, 1381, 1307, 1292, 1255, 1212, 1169, 1114, 1072, 1004 cm⁻¹

(3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(dodeciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran



10c

m = 1,60 g (3,73 mmol)

η = 0,65

Mr = 428,60

Elementna sestava: C₂₄H₄₄O₆

R_f = 0,33 (eter/petroleter = 1/3)

Bledo rumeno olje

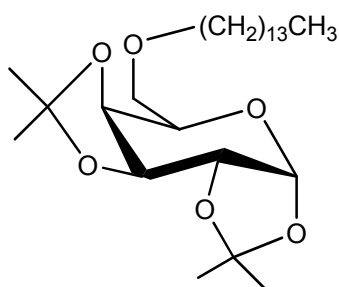
Analize (3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(dodeciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]pirana

¹H – NMR (300,15 MHz, CDCl₃): δ (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 1,42 (m, 32H, (CH₂)₁₀ + 4 x CH₃-C); 3,56 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 3,98 (t, 1H, J=6,30 Hz, -CH₂-CH); 4,29 (m, 2H, 2 x CH-O-); 4,61 (m, 1H, -O-CH-CH(O-)₂); 5,54 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-O-) ppm

MS ESI: m/z (%): 429 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3386, 2980, 2925, 2855, 2360, 2345, 2145, 2033, 1752, 1648, 1508, 1458, 1381, 1307, 1292, 1255, 1212, 1170, 1114, 1072, 1004 cm⁻¹

(3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(tetradeciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran

**10d**

$m = 544 \text{ mg (1,19 mmol)}$

$\eta = 0,55$

$M_r = 456,66$

Elementna sestava: C₂₆H₄₈O₆

$R_f = 0,34$ (eter/petroleter = 1/3)

Bledo rumeno olje

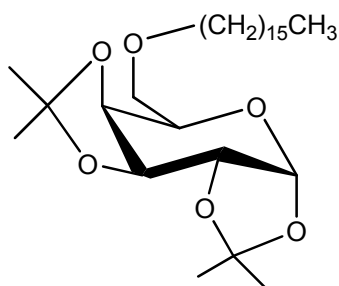
Analize (3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(tetradeciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]pirana

¹H – NMR (300,15 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, 3H, $J=6,00 \text{ Hz}$, -CH₂-CH₃); 1,42 (m, 36H, (CH₂)₁₂ + 4 x CH₃-C); 3,56 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 3,98 (t, 1H, $J=6,30 \text{ Hz}$, -CH₂-CH); 4,29 (m, 2H, 2 x CH-O-); 4,61 (m, 1H, -O-CH-CH(O-)₂); 5,54 (d, 1H, $J=5,70 \text{ Hz}$, -O-CH-O-) ppm

MS ESI: m/z (%): 457 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 2925, 2854, 1455, 1381, 1225, 1212, 1169, 1114, 1072, 1004 cm⁻¹

(3a*R*,5*R*,5a*S*,8a*S*,8b*R*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(heksadeciloksimetil)tetrahidro-3a*H*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]piran

**10e**

$m = 1,26 \text{ g (2,59 mmol)}$

$\eta = 0,45$

$M_r = 484,71$

Elementna sestava: C₂₈H₅₂O₆

$R_f = 0,35$ (eter/petroleter = 1/3)

Bledo rumeno olje

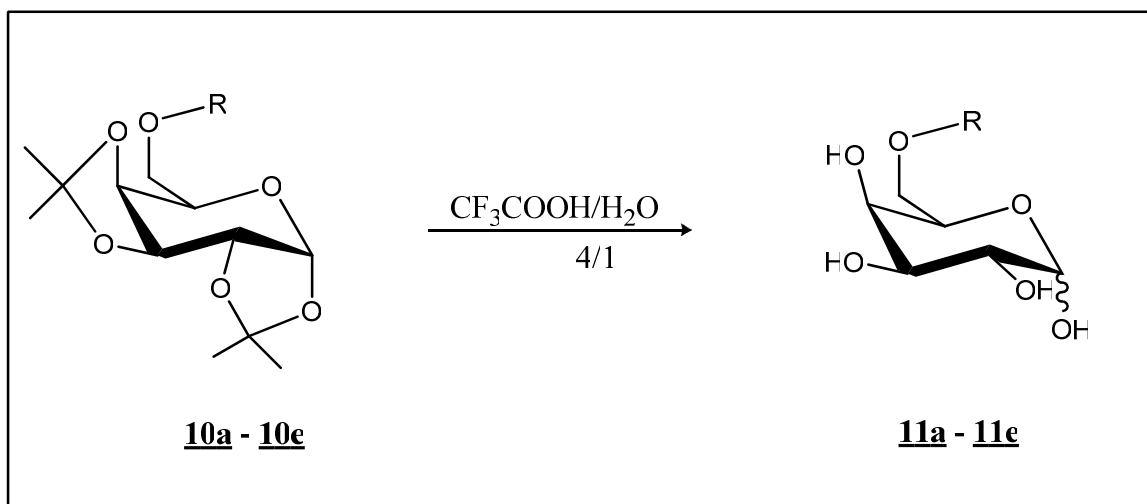
Analize (3*aR*,5*R*,5*aS*,8*aS*,8*bR*)-2,2,7,7-tetrametil-5-(heksadeciloksimetil)tetrahidro-3*aH*-bis[1,3]dioksolo[4,5-*b*:4',5'-*d*]pirana

¹H – NMR (300,15 MHz, CDCl₃): δ (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 1,42 (m, 40H, (CH₂)₁₄ + 4 x CH₃-C); 3,56 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 3,98 (t, 1H, J=6,30 Hz, -CH₂-CH); 4,29 (m, 2H, 2 x CH-O-); 4,61 (m, 1H, -O-CH-CH(O-)₂); 5,54 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-O-) ppm

MS ESI: m/z (%): 485 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3394, 2980, 2924, 2854, 2361, 2345, 2147, 1751, 1508, 1466, 1380, 1307, 1292, 1255, 1212, 1170, 1115, 1072, 1004 cm⁻¹

7.9 SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO (2(*R/S*), 3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(ALKILOKSIMETIL)TETRAHIDRO-2*H*-PIRAN-2,3,4,5-TETRAOLOV



Spojina **11a**: R = $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

Spojina **11b**: R = $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$

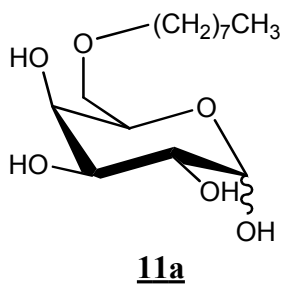
Spojina **11c**: R = $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$

Spojina **11d**: R = $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

Spojina **11e**: R = $-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$

Postopek:

Spojine **10a** – **10e** smo ohladili na ledeni kopeli (0 °C) in postopoma vsaki dodali 50 mL zmesi TFA/H₂O = 4/1 (w/w). Nato smo odstranili ledeno kopel in mešali pri sobni temperaturi 1,5 ure. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom pri 55 °C. Rumeno – rjava olja smo sušili na membranski črpalki in nato še v eksikatorju med NaOH.

(2(*R/S*), 3*R,4S,5R,6R*)-6-(oktiloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraol

m = 585 mg (2,00 mmol)

 η = 0,84

Mr = 292,37

Elementna sestava: C₁₄H₂₈O₆R_f = 0,02 (eter/petroleter = 3/2)

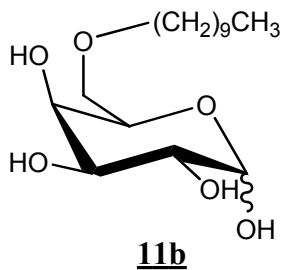
Rumeno – rjava smolasta snov

Analize (2(*R/S*), 3*R,4S,5R,6R*)-6-(oktiloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraola

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 12H, -(CH₂)₆-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 4H, 4 x OH); 5,73 (m, 3H, 3 x (CH)₂CH-OH); 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,08 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 275 ((M - OH)⁺, 24), 293 (MH⁺, 45), 122(100)

IR (NaCl): ν 3401, 2922, 2855, 2363, 2344, 1785, 1467, 1387, 1299, 1220, 1156, 1132, 1101, 1076, 1038 cm⁻¹

(2(*R/S*), 3*R,4S,5R,6R*)-6-(deciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraol

m = 1,08 g (3,38 mmol)

 η = 0,90

Mr = 320,42

Elementna sestava: C₁₆H₃₂O₆T_t = 92 – 94 °CR_f = 0,02 (eter/petroleter = 3/2)

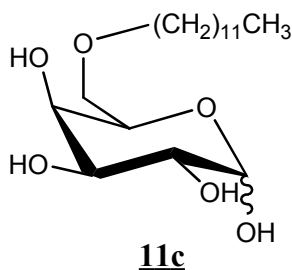
Bela praškasta snov

Analize (2(*R/S*), 3*R,4S,5R,6R*)-6-(deciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraola

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 16H, -(CH₂)₈-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 4H, 4 x OH); 5,73 (m, 3H, 3 x (CH-)₂CH-OH); 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,08 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 303 ((M – OH)⁺, 100), 321 (MH⁺, 10)

IR (KBr): ν 3384, 2922, 2872, 2854, 2363, 2345, 1785, 1508, 1467, 1458, 1406, 1378, 1297, 1216, 1155, 1132, 1104, 1082, 1064, 1039 cm⁻¹

(2(*R/S*), 3*R,4S,5R,6R*)-6-(dodeciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraol

m = 1,22 g (3,53 mmol)

η = 0,95

Mr = 348,25

Elementna sestava: C₁₈H₃₆O₆

Tt = 78 – 80 °C

Rf = 0,02 (eter/petroleter = 3/2)

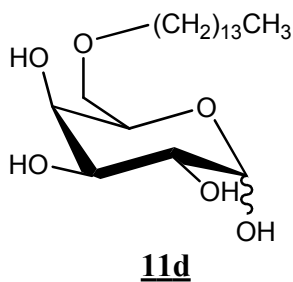
Bela praškasta snov

Analize (2(*R/S*), 3*R,4S,5R,6R*)-6-(dodeciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraola

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 20H, -(CH₂)₁₀-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 4H, 4 x OH); 5,73 (m, 3H, 3 x (CH-)₂CH-OH); 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,08 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 331 ((M – H)⁺, 5), 334 (100)

IR (KBr): ν 3392, 2955, 2922, 2853, 2364, 2344, 1785, 1508, 1467, 1377, 1356, 1297, 1231, 1155, 1131, 1107, 1085, 1066, 1038, 991, 962 cm⁻¹

(2(*R/S*), 3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(tetradeciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraol

m = 500 g (1,33 mmol)

 η = 0,92

Mr = 376,28

Elementna sestava: C₂₀H₄₀O₆

Tt = 110 – 112 °C

Rf = 0,02 (eter/petroleter = 3/2)

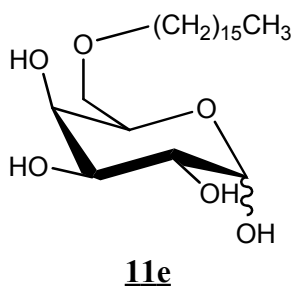
Bela praškasta snov

Analize (3*R*,4*S*,5*R*)-6-(tetradeciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraola

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 24H, -(CH₂)₁₂-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 4H, 4 x OH); 5,73 (m, 3H, 3 x (CH₂)₂CH-OH); 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,08 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 359 ((M – OH)⁺, 100)

IR (KBr): ν 3392, 2956, 2919, 2852, 2365, 2345, 1684, 1508, 1472, 1378, 1297, 1236, 1156, 1098, 1075, 988, 962 cm⁻¹

(2(*R/S*), 3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(heksadeciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraol

m = 1,01 g (2,51 mmol)

 η = 0,97

Mr = 404,58

Elementna sestava: C₂₂H₄₄O₆

Tt = 119 – 121 °C

Rf = 0,02 (eter/petroleter = 3/2)

Bela praškasta snov

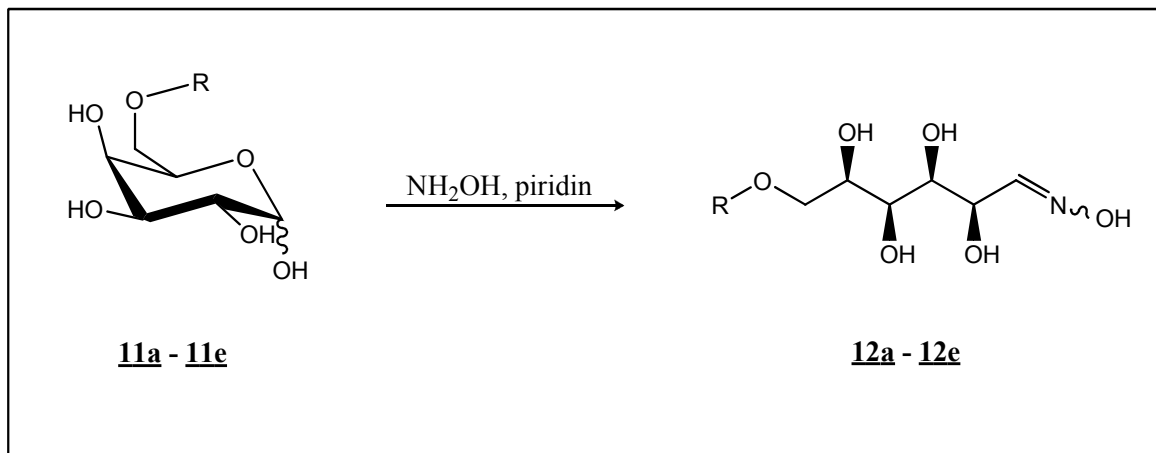
Analize (2(*R/S*), 3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(heksadeciloksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraola

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 28H, -(CH₂)₁₄-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 4H, 4 x OH); 5,73 (m, 3H, 3 x (CH₂)₂CH-OH); 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,08 (d, 1H, J=5,70 Hz, -O-CH-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 387 ((M – OH)⁺, 54), 485 (100)

IR (KBr): ν 3392, 2956, 2918, 2851, 2365, 2345, 1684, 1508, 1472, 1376, 1297, 1236, 1154, 1096, 1075, 988, 962 cm⁻¹

7.10 SPLOŠNI PREDPIS ZA SINTEZO (1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-TETRAHIDROKSI-6-(ALKILOKSI)HEKSANAL OKSIMOV



Spojina **12a**: $\text{R} = -(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

Spojina **12b**: $\text{R} = -(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$

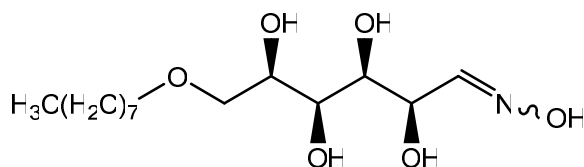
Spojina **12c**: $\text{R} = -(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$

Spojina **12d**: $\text{R} = -(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$

Spojina **12e**: $\text{R} = -(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$

Postopek:

Spojine 11a – 11e raztopimo v 20mL piridina in dodamo 5 ekvivalentov hidroksilamina. Mešamo dva dni pri temperaturi 40 °C. Nato odparimo piridin pod znižanim tlakom in prekrizaliziramo iz metanola.

(1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(oktiloksi)heksanal oksim**12a**

m = 321 mg (1,04 mmol)

 η = 0,52

Mr = 307,38

Elementna sestava: C₁₄H₂₉NO₆

Tt = 179 – 181 °C

Rf = 0,78 (CH₂Cl₂/CH₃OH/NH_{3(aq)} = 8/3/0,2)

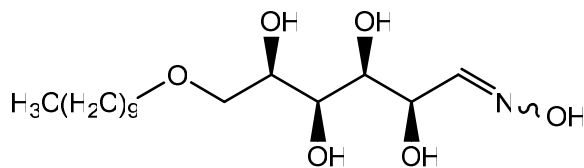
Bela praškasta snov

Analize (1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(oktiloksi)heksanal oksima

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 12H, -(CH₂)₆-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 3H, 3 x OH); 5,73 (m, 4H, 4 x (CH-OH) ; 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,47 (d, 1H, J=3, -CH=) 14,1 (m, 1H, =N-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 308 (MH⁺, 96), 330 ((M + Na)⁺, 100)

IR (KBr): ν 3392, 3268, 3101, 3049, 2953, 2935, 2923, 2851, 2804, 2365, 2345, 1671, 1458, 1448, 1379, 1363, 1340, 1318, 1304, 1262, 1228, 1126, 1102, 1081, 1069, 1036, 1001, 978, 936, 724 cm⁻¹

(1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(deciloksi)heksanal oksim**12b**

m = 754 mg (2,25 mmol)

 η = 0,68

Mr = 335,23

Elementna sestava: C₁₆H₃₃NO₆

Tt = 171 – 173 °C

Rf = 0,67 (CH₂Cl₂/CH₃OH/NH_{3(aq)} = 8/3/0,2)

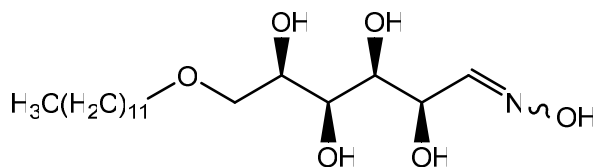
Bela praškasta snov

Analize (1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(deciloksi)heksanal oksima

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 16H, -(CH₂)₈-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 3H, 3 x OH); 5,73 (m, 4H, 4 x (CH-OH) ; 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,47 (d, 1H, J=3, -CH=) 14,1 (m, 1H, =N-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 336 (MH⁺, 63), 358((M + Na)⁺, 45), 370 (100)

IR (KBr): ν 3393, 3268, 3100, 3048, 2954, 2922, 2896, 2851, 2805, 2374, 2345, 2194, 2098, 1671, 1491, 1466, 1439, 1414, 1379, 1318, 1304, 1262, 1228, 1126, 1102, 1070, 1036, 1016, 996, 935, 723 cm⁻¹

(1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(dodeciloksi)heksanal oksim**12c**

m = 916 mg (2,52 mmol)

η = 0,72

Mr = 363,26

Elementna sestava: C₁₈H₃₇NO₆

Tt = 165 – 167 °C

Rf = 0,62 (CH₂Cl₂/CH₃OH/NH_{3(aq)} = 8/3/0,2)

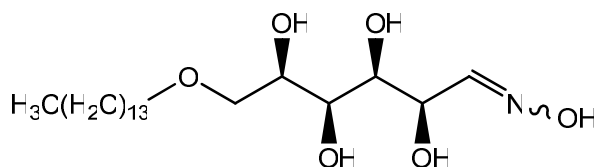
Bela praškasta snov

Analize (1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(dodeciloksi)heksanal oksima

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 20H, -(CH₂)₁₀-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 3H, 3 x OH); 5,73 (m, 4H, 4 x (CH-OH) ; 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,47 (d, 1H, J=3, -CH=) 14,1 (m, 1H, =N-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 364 (MH⁺, 45), 386 ((M + Na)⁺, 9)

IR (KBr): ν 3394, 3272, 3100, 3048, 2953, 2922, 2850, 2366, 2345, 1667, 1490, 1465, 1438, 1413, 1379, 1317, 1304, 1262, 1228, 1214, 126, 1102, 1072, 1050, 1036, 1002, 987, 935, 724 cm⁻¹

(1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(tetradeciloksi)heksanal oksim**12d**

m = 370 mg (0,9453 mmol)

 $\eta = 0,71$

Mr = 391,29

Elementna sestava: C₂₀H₄₁NO₆

Tt = 172 – 174 °C

Rf = 0,59 (CH₂Cl₂/CH₃OH/NH_{3(aq)} = 8/3/0,2)

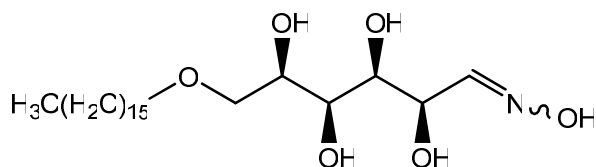
Bela praškasta snov

Analize (1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(tetradeciloksi)heksanal oksima

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 24H, -(CH₂)₁₂-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 3H, 3 x OH); 5,73 (m, 4H, 4 x (CH-OH) ; 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,47 (d, 1H, J=3, -CH=) 14,1 (m, 1H, =N-OH) ppm

MS ESI: m/z (%): 392 (MH⁺, 100), 414 ((M + Na)⁺, 25), 440 ((M + K)⁺, 25)

IR (KBr): ν 3394, 3272, 2953, 2921, 2849, 2367, 2345, 1618, 1464, 1438, 1340, 1318, 13004, 1262, 1126, 1102, 1074, 1035, 997, 936, 724 cm⁻¹

(1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(heksadeciloksi)heksanal oksim**12e**

m = 734 mg (1,75 mmol)

 $\eta = 0,70$

Mr = 419,60

Elementna sestava: C₂₂H₄₅NO₆

Tt = 152 – 154 °C

Rf = 0,55 (CH₂Cl₂/CH₃OH/NH_{3(aq)} = 8/3/0,2)

Bela praškasta snov

Analize (1(*E/Z*),2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(heksadeciloksi)heksanal oksima

¹H – NMR (300,15 MHz, piridin-d₅): δ 1,97 (t, 3H, J=6,00 Hz, -CH₂-CH₃); 2,45 (m, 28H, -(CH₂)₁₄-CH₃); 4,66 (m, 4H, -CH₂-O-CH₂-); 5,28 (m, 3H, 3 x OH); 5,73 (m, 4H, 4 x (CH-OH) ; 6,44 (m, 1H, -O-CH-CH₂-O-); 7,47 (d, 1H, J=3, -CH=) 14,1 (m, 1H, =N-OH) ppm

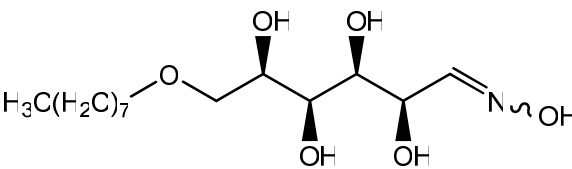
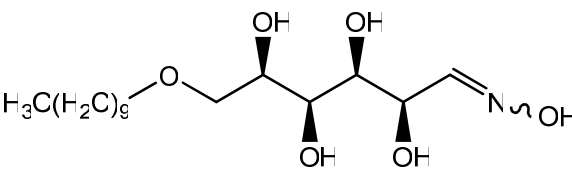
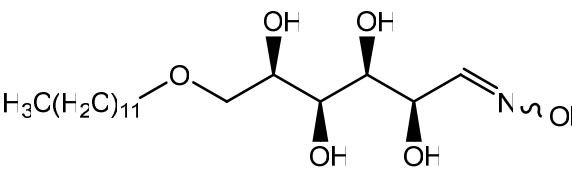
MS ESI: m/z (%): 420 (MH⁺, 100)

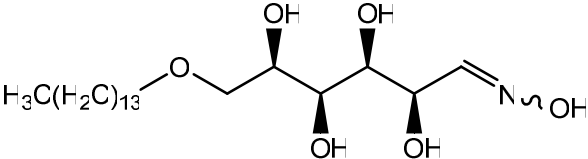
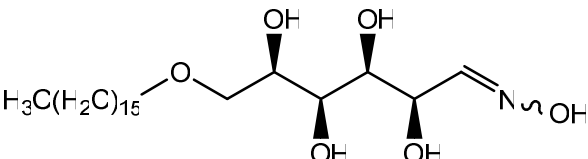
IR (KBr): ν 3395, 3273, 3100, 3047, 2953, 2922, 2849, 2369, 1670, 1507, 1491, 1464, 1422, 1414, 1378, 1317, 1304, 1262, 1244, 1228, 1126, 1102, 1078, 1069, 1036, 999, 935, 724 cm⁻¹

8. REZULTATI IN RAZPRAVA O SINTEZI SPOJIN

8.1 REZULTATI

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

STRUKTURA SPOJINE	ŠTEVILKA SPOJINE	STRAN
 <chem>CCCCCCCCOCC(O)C(O)C(O)C(O)CO</chem>	<u>12a</u>	42
 <chem>CCCCCCCCCOCC(O)C(O)C(O)C(O)CO</chem>	<u>12b</u>	42
 <chem>CCCCCCCCCOCC(O)C(O)C(O)C(O)CO</chem>	<u>12c</u>	43

 <chem>CCCCCCCCCCCCCO[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)C=[N+]#O</chem>	<u>12d</u>	44
 <chem>CCCCCCCCCCCCCO[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)C=[N+]#O</chem>	<u>12e</u>	44

8.2 RAZPRAVA

8.2.1 Razprava k sintezi L-ido bis-epoksida

8.2.1.1 Razprava k sintezi zaščite hidroksilnih skupin v obliki diacetonida

1,2-dimetoksietan smo predestilirali in dobili iz rahlo rumene brezbarvno tekočino. Topilu je dodan namreč stabilizator butilhidroksitoluen, ki bi lahko »zastrupil« (inaktiviral) kositrov klorid, ki ga kasneje uporabimo kot katalizator. Hidroksilne skupine na mestih 1,2 ter 5,6 manitola smo zaščitili v obliki acetonida z 2,2-dimetoksiopropanom v prisotnosti kositrovega klorida kot katalizatorja. Zaradi sterične oviranosti in usmerjenosti v nasprotno smer v prostoru hidroksilnih skupin na mestih 3 in 4, acetonid nastaja pretežno na mestih 1,2 in 5,6. Po končani reakciji smo dodali 0,09 mL piridina, da smo nevtralizirali kisel kositrov klorid (Lewisova kislina). Večino stranskih produktov reakcije so predstavljali mono- in popolnoma zaščiteni derivati manitola. Izhodna spojina D-manitol je netopna v diklorometanu, tako da smo ga zlahka odstranili s tem topilom. Surov produkt smo 2 x prekristalizirali iz diizopropiletra, da smo odstranili slabše topen monoacetonid. Nizek izkoristek 39% je bil v veliki meri posledica nastanka stranskih produktov monoacetonida in triacetonida.

Acetonidno zaščito uporabljamo pri zaščiti 1,2-diolov (19):

- uvedemo jo z acetonom v kislem, z 2-metoksipropenom ali pa z 2,2-dimetoksiopropanom
- odstranimo jo z razredčeno HCl, AcOH in TsOH ali pa z BCl₃ oziroma BBr₃
- obstojna je v pH>4, alkalnem, pri reakciji s hidridi, v prisotnosti oksidantov in pri katalitičnemu hidrogeniranju.

8.2.1.2 Razprava k sintezi zaščite hidroksilne skupine v obliki benzilnega etra

V tej stopnji smo zaščitili preostali hidroksilni skupini z benzilno zaščito. Na ledeni kopeli (0 °C) smo z dodatkom natrijevega hidrida v brezvodnem THF pripravili alkoholat, ki je močnejši nukleofil od proste hidroksilne skupine in lahko po mehanizmu nukleofilne substitucije reagira z benzilbromidom. Benzilno zaščito smo uvdeli z benzilbromidom ob prisotnosti tetrabutilamonijevega bromida kot katalizatorja faznega prenosa, ki olajša stik med polarnim alkoholatom in lipofilnim benzilbromidom. Po končani reakciji smo z

metanolom počasi nevtralizirali prebitni natrijev hidrid. Surov produkt smo očistili z ekstrakcijo z diklorometanom. V produktu je bilo še nekaj benzilbromida (neprijeten in dražec vonj), ki ga nismo uspeli popolnoma odstraniti z uparovanjem v vakuumu.

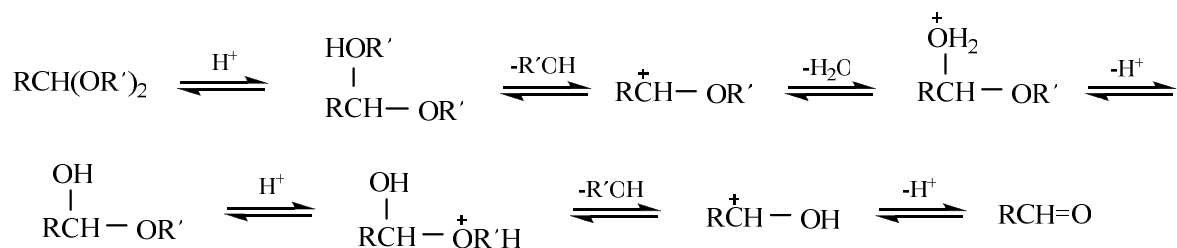
Značilnosti zaščitne skupine v obliki benzilnega etra (19):

- uvedemo jo z $\text{PhCH}_2\text{Cl}/\text{NaH}(\text{NaNH}_2)/\text{DMSO}$, z $\text{PhCH}_2\text{Cl}/\text{trden KOH}$ ali z $\text{PhCH}_2\text{Cl}/\text{Ag}_2\text{O}/\text{DMF}$
- odstranimo z $\text{H}_2/\text{Pd-C}$, z elektrolitsko redukcijo ali BCl_3 oziroma BBr_3
- obstojna je v kislem do $\text{pH} > 1$, v alkalnem, pri organokovinskem reagentom, pri oksidantom in pri redukciji s hidridi pri sobni temperaturi.

8.2.1.3 Razprava k sintezi hidrolize diacetonida

Diacetal smo hidrolizirali z vodno raztopino očetne kisline pri 45°C . Surov produkt smo poskušali prekristalizirati iz dietiletra, vendar niso nastali kristali. Nato smo kristalizacijo ponovili z diizopropiletrom, vendar ta metoda čiščenja tudi tokrat ni bila uspešna. Etrno fazo v bučki z reakcijsko zmesjo smo prelili v drugo bučko, tako da je v prvi bučki ostal trden oljnat ostanek. Po analiziranju eterne faze s TLC smo ugotovili, da le ta vsebuje še veliko nezreagirane izhodne spojine. Odločili smo se za kolonsko kromatografijo preostanka po odparitvi dietiletra iz organske faze, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili etilacetat.

Shema mehanizma kisle hidrolize acetalov (20):



8.2.1.4 Razprava k sintezi zaščite hidroksilne skupine v obliki TBDMS etra

V tej stopnji smo zaščitili hidroksilni skupini na mestih 1 in 6 s sililno zaščito. Regioselektivno zaščito primarnih $-\text{OH}$ skupin s sililnim etrom smo uvedli s terc-butildimetilsililkloridom in imidazolom v dimetilformamidu pri 0°C . Sekundarni $-\text{OH}$ skupini sta sterično bolj ovirani in ne reagirata z reagentom, s katerim po mehanizmu nukleofilne substitucije uvedemo sterično zelo veliko skupino. Surov produkt smo očistili z ekstrakcijo z diklorometanom.

Sililni etri spadajo med najbolj občutljive zaščite hidroksilne skupine. Značilnosti zaščitne skupine v obliki TBDMS etra (21):

- uvedemo jo z $\text{ClSiMe}_2\text{-}t\text{-Bu}$ /imidazol/DMF, z $t\text{-Bu-Me}_2\text{SiOCIO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ /piridin, z $\text{ClSiMe}_2\text{-}t\text{-Bu}/\text{Li}_2\text{S}/\text{CH}_3\text{CN}$ ali z $\text{ClSiMe}_2\text{-}t\text{-Bu}/\text{DMAP}/\text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}$
- odstranimo jo z $n\text{-Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-/\text{THF}$, z $\text{HF}/\text{CH}_3\text{CN}$, z $\text{HOAc-H}_2\text{O}$, z $\text{FeCl}_3/\text{Ac}_2\text{O}$
- obstojna je pri katalitičnem hidrogeniranju, pri reakciji s hidridi, pri Na/NH_3 , pri $\text{CrO}_3/\text{piridin}$, pri $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$, pri Zn/MeOH .

8.2.1.5 Razprava k sintezi aktivacije hidroksilnih skupin z mesilatom

V tej stopnji smo pretvorili hidroksilni skupini na mestih 2 in 5 v metansulfonilni (mesilni) skupini, ki sta dobri izstopajoči skupini. Spojino **4** in trietilamin smo ohladili na ledeni kopeli ($0\text{ }^\circ\text{C}$), in previdno po kapljicah dodali mesilklorid (eksotermna reakcija). Mehanizem reakcije je nukleofilna substitucija, izstopajoča skupina je Cl^- , ki ga veže trietilamin. V reakcijsko zmes smo dodali vodo, da je zreagiral prebitni mesilklorid in da sta nastali dve fazi, ki smo ju lahko ločili z ekstrakcijo.

8.2.1.6 Razprava k sintezi epoksidacije do L-ido bis-epoksida

Sintetizirali smo bis-epoksid. Najprej smo sililne etre hidrolizirali v koncentrirani raztopini klorovodikove kisline in nato po dodatku 20% kalijevega hidroksida v bazičnem ($\text{pH}=13$) na mestih 1 in 6 tvorili alkoksida. Ta zelo močna nukleofila sta zamenjala dobro izstopajoči mesilatni skupini in z intramolekularno Williamsonovo reakcijo sta nastala dva epoksida. Ker je potekla intramolekularna nukleofilna substitucija po $\text{S}_\text{N}2$ mehanizmu, je prišlo do inverzije absolutne konfiguracije na 2. in 5. ogljiku. Po prvem čiščenju s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili cikloheksan/etilacetat = 7/3, smo dobili 15 g produkta. Zbrali smo frakcije z $R_f = 0,37$ (šibko obarvana lisa) in $R_f = 0,35$ (močno obarvana lisa). Produkt smo še enkrat očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo uporabili bolj nepolarno mobilno fazo cikloheksan/etilacetat = 9/1. Po drugem čiščenju smo dobili 6 g produkta. Zbrali smo frakcije s spodnjo liso $R_f = 0,35$ (močno obarvana lisa). Po NMR in MS analizah smo ugotovili, da očiščena spojina ni bis-epoksid temveč derivat/i silicijevih spojin. Možna sta dva vzroka neuspešne izolacije spojine **6**:

- razpad oziroma polimerizacija bis-epoksida na kislem silikagelu,
- napačno zbrana frakcija ($R_f=0,35$) po drugi kolonski kromatografiji.

8.2.2 Razprava k sintezi amfifilnih derivatov D-galaktoze

8.2.2.1 Razprava k sintezi zaščite hidroksilnih skupin v obliki diacetonida

V prvi stopnji smo zaščitili –OH skupine na mestih 2,3 in 4,5 D-galaktoze v obliki acetonidov z acetonom ob prisotnosti žveplove(VI) kisline, ki je katalizator (vir H^+ ionov) in hkrati sredstvo za vezavo nastale vode. Bakrov sulfat je bila stara kemikalija, ki je imela že nekaj modrih kristalov – pentahidrat ali modra galica. Prežarili smo ga zato, da smo prisoten pentahidrat pretvorili v brezvoden bakrov sulfat. Bakrov sulfat smo prav tako uporabili kot sredstvo za vezavo vode. Z barijevim hidroksidom smo nevtralizirali žveplovo(VI) kislino, nastal je barijev sulfat, ki smo ga odfiltrirali. Natrijev karbonat in kalcijev oksid smo dodali za fino regulacijo pH. To sta bolj šibki bazi kot pa barijev hidroksid, tako da pH ne poskoči preveč, če ju dodamo v prebitku.

8.2.2.2 Razprava k sintezi pripenjanja alkilnih verig

V tej stopnji smo pripeli ustrezno alkilno verigo na preostalo nezaščiteno hidroksilno skupino. Z natrijevim hidridom smo tvorili alkoksid, ki je nato v dioksanu ob prisotnosti kronskega etra kot katalizatorja faznega prenosa zreagiral z ustreznim alkilbromidom. Po končani reakciji smo z metanolom nevtralizirali prebitni natrijev hidrid. Surov produkt smo očistili z ekstrakcijo z diklorometanom in kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili dietileter/petroleter = 1/3.

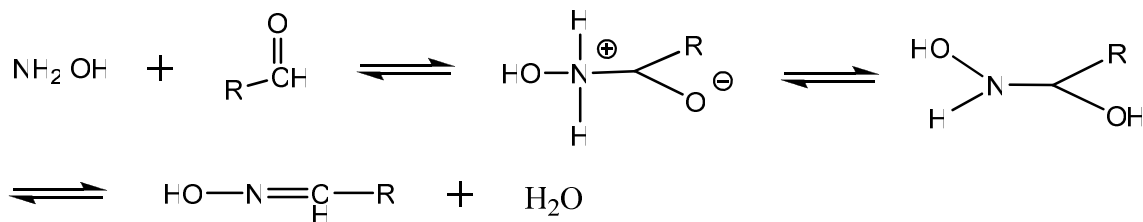
Pri produktu z najdaljšo stransko verigo $R = -(CH_2)_{15}CH_3$ smo zaradi slabše ločbe še enkrat izvedli kolonsko kromatografijo z bolj nepolaro mobilno fazo dietileter/petroleter = 1/9.

8.2.2.3 Razprava k sintezi hidrolize diacetonida

V tej stopnji smo odstranili acetonidno zaščito na mestih 2,3 in 4,5 s triflouroacetno kislino. Pri derivatu z najdaljšo verigo $R = -(CH_2)_{15}CH_3$ se je po 10 min reakcije pojavila bela kosmičasta oborina, ki je po dodatku 20 mL THF izginila. Po končani reakciji smo dobili rumeno - rjavo olje, ki smo ga sušili na membranski črpalki in več dni v eksikatorju med NaOH (veže vodo). Dobili smo bele praškaste produkte, razen derivata z najkrajšo alkilno verigo $R = -(CH_2)_7CH_3$, ki je bil rumeno – rjava viskozna tekočina.

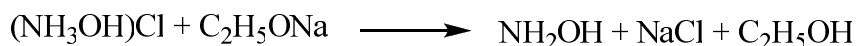
8.2.2.4 Razprava k sintezi tvorbe oksima

V zadnji stopnji smo na anomerni hidroksilni skupini spojine **11** tvorili oksim. Mehanizem reakcije:



Poteče nukleofilna adicija hidroksilamina na karbonilno skupino aldehida s sledečim prenosom protona iz dušika na kisik do nastanka nestabilnega karbinolamina ali hemiaminala. Pri primarnem aminu (hidroksilaminu) se odcepi voda (eliminacija) in nastane oksim.

Hidroksilamin smo pripravili iz hidroksilamonijevega klorida in natrijevega etilata.



Isolacija hidroksilamina: po končani reakciji smo nastali natrijev klorid odfiltrirali z odsesavanjem ter ga sprali z malo brezvodnega dietiletra. Filtrat smo ohladili na -18°C ter pustili nekaj dni da izkristalizira hidroksilamin. Nato smo ga odfiltrirali z odsesavanjem z uporabo ohlajene aparature in spirali z dietiletrom.

Pri derivatu z najkrajšo alkilno verigo $\text{R} = -(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ smo zaradi dobre topnosti reakcijo izvajali v metanolu, pri ostalih derivatih smo zaradi slabše topnosti v metanolu izvajali reakcije v piridinu. Surove produkte smo očistili s prekrizalizacijo iz metanola.

Sintetizirali smo 5 končnih glikolipidnih derivatov z različno dolgimi alkilnimi verigami. Celokupni izkoristki vseh petih derivatov so med 5-8 %. Derivat z najkrajšo alkilno verigo (7C atomov) je veliko bolj polaren kot derivat z najdaljšo alkilno verigo (15C atomov), zato pričakujemo, da bo razlika v nadaljnjih testiranjih učinkovitosti prav med tema dvema spojinama največja (površinska aktivnost, antioksidativno delovanje...).

9. SKLEP

Preprečevanje oksidacij v zdravilih je izrednega pomena, saj lahko nastanejo številni oksidativni produkti. Prav tako je oksidativni proces v celicah udeležen v etiologiji številnih bolezenskih stanj. Pri obeh aspektih je ustrezna zaščita z uporabo antioksidantov ključnega pomena. Antioksidanti so spojine, ki večinoma lahko že v nizkih koncentracijah upočasnijo, prekinejo ali preprečijo verižne reakcije in druge nekontrolirane reakcije oksidacije.

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali nove amfifilne antioksidante oksimskega tipa, ki izkazujejo lastnosti površinsko aktivnih snovi. Za doseg tega cilja smo upoštevali določene zakonitosti, ki so nujne pri načrtovanju amfifilnih molekul z antioksidativnim delovanjem. Polarni del molekule predstavlja modificirana sladkor in funkcionalna skupina z antioksidativnim delovanjem (oksimska skupina), nepolarni del molekule pa različno dolga alkilna veriga.

Sintetizirali smo miligramske količine sledečih snovi s potencialno antioksidativnim delovanjem: **12a**, **12b**, **12c**, **12d** in **12e**, ki bodo v sklopu druge diplomske naloge ovrednotene na katedri za farmacevtsko tehnologijo.

10. VIRI IN LITERATURA

1. Dai Kitamoto, Tomotake Morita, Tokuma Fukuoka, Masa-aki Konishi, Tomohiro Imura: Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2009; 14: 315-328
2. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007, 59-61
3. Stanko Srčič: Farmacevtska tehnologija za srednjo stopnjo, *Didaktika* 1997, 128-140
4. Cosima Stubenrauch: Sugar surfactants – aggregation, interfacial, and adsorption phenomena, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6 Ž2001. 160-170
5. Reinaldo C. Bazito and Omar A. El Seoud: Sugar-based cationic Surfactants: Synthesis and aggregation of Methyl 2-Acylamido-6-trimethylammonio-2,6-dideoxy-D-glucopyranoside Chlorides, *Journal of Surfactants and Detergents*, October 2001, Vol. 4, No. 4
6. Verančič P, Romih R, Pšeničnik M: Praktični pouk celične biologije, Tehniška založna slovenije d.d., Ljubljana 2005: 35-37
7. Kornhauser A, Perpar M: Organska kemija, Državna založba Slovenije, Ljubljana 1997
8. Rodney Boyer: Temelji biokemije, Študentska založba, 2005: 217-237
9. Alberts, Yohnson, Lewis, Raff, Walter: *Molecular Biology of the Cell*, Fifth edition, Garland Science 2008: 617-650
10. Halliwell B., Gutteridge JMC.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fourth edition Oxford University press 2007: 30-74
11. Kreft S, Pečar S: Vloga radikalov pri obolenjih, *Farmacevtski vestnik* 1998; 49: 469-481
12. Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih, *Farmacevtski vestnik* 2001; 52:133-144
13. Pečar S: Radikali v našem okolju, *Kemija v šoli* 2006; 18(2): 26-30
14. Mravljak J, Peterlin-Mašič L: Resnice in polresnice o antioksidantih. Prehranska dopolnila II : strokovno izobraževanje. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2010, str. 7-31

15. Kmetec V, Roškar R: Vaje iz stabilnosti zdravil, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2002: 25-26
16. Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine, Farmacevtski vestnik 2006; 57: 24-29
17. Puntel O.G, de Carvalho R.N, Gubert P, Palma S.A, Dalla Corte L.C, Avilla S.D et al. : Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: An oxime with antioxidant properties , Chemico-Biological Interactions 2009; 177(2): 153-160
18. Portella R, Barcelos R.P, de Bem A.F, Bresolin V, da Rocha J.B, Soares F.A: Oximes as inhibitors of low density lipoproteine oxidation, Life Science 2008; 83: 878-885
19. Sollner Dolenc M, Pečar S: Vaje iz Farmacevtske kemije III, 2. dopolnjena izd. – ponatis – Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, str. 79-90
20. Smith M, March J: March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structures. – 5th ed. 2001
21. Green TW, Wuts PGM: Protective Groups in Organic Synthesis (1st edition) J. Wiley & Sons, 1980