

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA CIGLIČ

**SINTEZA DERIVATOV BENZO[*b*][1,4]DIOKSINA IN
BENZO[*b*][1,4]OKSAZINA KOT GRADNIKOV DUALNIH
ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN**

**SYNTHESIS OF BENZO[*b*][1,4]DIOXIN AND
BENZO[*b*][1,4]OXAZIN DERIVATIVES AS BUILDING
BLOCKS OF DUAL ANTITHROMBOTIC COMPOUNDS**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem izvedla na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja mag. farm. in somentorja doc. dr. Janeza Ilaša. ^1H meritve so opravljali v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti. Elementne analize so bile izvedene na UL- Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Masnospektrometrične meritve so opravili na inštitutu Jožef Štefan. IR meritve, določanje tališča in HPLC analize so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Danijelu Kiklju, doc. dr. Janezu Ilašu ter Milošu Iliću, mag. farm., ki so mi pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se iskreno zahvaljujem moji družini in fantu za podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm. in somentorja doc. dr. Janeza Ilaša, mag. farm.

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl

Član: izr. prof. dr. Janez Kerč

Ljubljana, marec 2011

VSEBINA

VSEBINA	2
POVZETEK	4
ABSTRACT	4
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1 UVOD	7
1.1 HEMOSTAZA	7
1.1.1. VAZOKONSTRIKCIJA	7
1.1.2. AGREGACIJA TROMBOCITOV	8
1.1.3. KOAGULACIJA KRVI	9
1.2 TROMBOZA	11
1.3. ANTITROMBOTIČNE UČINKOVINE	12
1.4 KONCEPT DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN	15
1.4.1. 3,4-DIHIDRO-2H-1,4-BENZOKSAZINSKI DERIVATI KOT DUALNI ANTITROMBOTIKI	19
1.5 DOSEDANJE DELO NA PODROČJU DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN	21
2 NAMEN DELA	22
3 MATERIALI IN METODE	26
4 EKSPERIMENTALNI DEL	28
4.1 SINTEZA PREKURZORJEV ENANTIOMERNO ČISTIH BENZOKSAZINOV	28
4.1.1 Sinteza 2-(metilamino)-4-nitrofenola	28
4.1.2 Sinteza 2-(metilamino)-5-nitrofenola	29
4.1.3 Sinteza 2-(benzilamino)-4-nitrofenola	31
4.1.4 Sinteza 2-(benzilamino)-5-nitrofenola	32
4.1.5 Sinteza 2-(benzilamino)fenola	34
4.1.6 Sinteza 2-(metilamino)fenola	35
4.1.7 Poskus sinteze (<i>R</i>)-(4-metil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola	37
4.1.8 Poskus ponovitve sinteze (4-benzil-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola	38
4.2 POSKUS SINTEZE PREKURZORJEV ČISTIH ENANTIOMEROV 7-NITROBENZOKSAZINOV	39
4.2.1 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro -2-metil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline (41)	39
4.2.2 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro -2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline	41
4.2.3 Sinteza 3,4-dihidro -2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline	42
4.3 POSKUS SINTEZE PREKURZORJEV ČISTIH ENANTIOMEROV 6-NITROBENZOKSAZINOV Z RESOLUCIJO	44
4.3.1 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro-2-metil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline	45

4.3.2	Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro-2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline	46
4.3.3	Sinteza 3,4-dihidro-2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline	48
4.3.4	Poskus resolucije 1-feniletilamino-3,4-dihidro-2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karboksilata	49
4.3.5	Poskus sinteze čistega enantiomera 3,4-dihidro-2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2 <i>H</i> -1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline	51
4.4	SINTEZA SPOJIN Z BENZO[b][1,4]DIOKSINSKIM SKELETOM	52
4.4.1	Sinteza (6-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metanola	52
4.4.2	Sinteza (7-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metanola	53
4.4.3	Sinteza 4-((6-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila	55
4.4.4	Sinteza 4-((7-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila	56
4.4.5	Sinteza 4-((6-amino-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila	58
4.4.6	Sinteza 4-((7-amino-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila	60
4.4.7	Sinteza 4-((6-(benzilamino)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila	61
4.4.8	Sinteza 4-((7-(benzilamino)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila	63
4.4.9	Sinteza etil 2-(benzil(2-((cianofenoksi)metil)2 ,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata	65
4.4.10	Sinteza etil 2-(benzil(4-((cianofenoksi)metil)2 ,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata	67
4.4.11	Sinteza etil 2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2 ,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata	69
4.4.12	Sinteza etil 2-(benzil(3-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2 ,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata	71
4.4.13	Sinteza 2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2 ,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline	73
4.4.14	Sinteza 2-(benzil(3-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2 ,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline	75
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	77
5.1	SINTEZA PREKURZORJEV ENANTIOMERNO ČISTIH BENZOKSAZINOV	77
5.2	SINTEZA PREKURZORJEV ČISTIH ENANTIOMEROV 6- NITROBENZOKSAZINOV IN 7- NITROBENZOKSAZINOV Z RESOLUCIJO	78
5.3	SINTEZA SPOJIN Z BENZO[b][1,4]DIOKSINSKIM SKELETOM	79
6	SKLEP	83
7	LITERATURA	84

POVZETEK

Kardiovaskularne bolezni letno povzročijo skoraj 17 milijonov smrtnih primerov, zato je prisotna velika težnja k raziskovanju in odkrivanju novih učinkovin, ki bi pripomogle k izboljšanju zdravja svetovne populacije. Dualne antitrombotične učinkovine so molekule, ki vsebujejo farmakofor, ki deluje kot inhibitor trombina in farmakofor, ki je antagonist fibrinogeneskega receptorja GPIIb/IIIa. Najnovejše raziskave potekajo v smeri modifikacij benzoksazinskega in benzodioksinskega skeleta, kjer se na mesta 2, 6 in 7 pripenja fragmente, ki bi omogočali najbolj optimalno delovanje. Želimo doseči čim manjšo konstanto inhibicije za trombin, čim manjšo IC_{50} za fibrinogen ter izboljšati selektivnost za trombin. Namen diplomske naloge je bila sinteza enantiomerno čistega benzoksazina, priprava čistih enantiomerov 6- in 7- nitrobenzoksazinov z metodo resolucije ter sinteza karboksilne kisline benzodioksinskega tipa. Uspešno smo sintetizirali spojini **P44** (2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetnokislino) in **P45** (2-(benzil(3-((4-karbamimidoilfenoksi)metil)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetnokislino).

ABSTRACT

Cardiovascular diseases annually cause almost 17 million deaths, so there is a great tendency to explore and discover new agents that could contribute to the improvement of the global health of population. Dual antithrombotic agents are molecules that contain a pharmacophore, which acts as an inhibitor of thrombin and antagonist of fibrin GPIIb /IIIa receptor. Recent research is conducted in the direction of modifications of benzoxazine and benzodioxine scaffold, where substituents at the positions 2, 6 and 7 are sought which would allow the most optimal performance. We want to achieve as small K_i for thrombin and IC_{50} for fibrinogen as possible and improve the selectivity for thrombin. The purpose of this work was the synthesis of a pure benzoxazin enantiomer, preparation of a pure 6- and 7- nitrobenzoxazine enantiomers through method of resolution and synthesis of carboxylic acid of benzodioxine type. We have successfully synthesized compound **P44** (2-(benzyl(2 -((4-carbamidoylphenoxy)methyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)amino)-2- oxoacetic acid) and compound **P45** (2 -(benzyl(3-((4-carbamimidoylphenoxy)methyl)-dihydrobenzo-2,3[b][1,4]dioxin-6-yl)amino)-2-oksoacetic acid).

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
Ar	aril
Arg	arginin
Asp	aspartat
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CDCl ₃	devteriran kloroform
d	dublet
dd	dublet dubleta
DIAD	diizopropilazodikarboksilat
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
EtOAc	etilacetat
Gly	glicin
GPIIb/IIIa	glikoprotein IIb/IIIa
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC ₅₀	50% inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
K _i	konstanta inhibicije
m	multiplet
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektroskopija
NMH	nizkomolekularni heparin
NMR	nuklearna magnetna resonanca
Phe	fenilalanin
Pro	prolin
q	kvartet

RGD	Arg-Gyl-Asp peptidno zaporedje
s	singlet
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
VT	venska tromboza
vWF	von Willebrandov faktor

1 UVOD

Različne kardiovaskularne bolezni letno povzročijo 16,7 milijonov smrtnih primerov (1). Pojavnost venske tromboze (VT) je 1,6/1000 oseb na leto, kar pomeni, da v Sloveniji vensko trombozo letno utrpi okoli 3000 oseb. Nezdravljena proksimalna venska tromboza je smrtno nevarna bolezen, saj v kar 50% privede do pljučne embolije (PE). Pljučna embolija je zapora pljučne arterije, ki jo najpogosteje povzročijo strdki. Ti po krvi pripotujejo iz globokih ven spodnjih okončin in male medenice. Strdek se zagodzi v križišču vej pljučne arterije ali tam, kjer se premer žile zmanjša na velikost premera strdka ter delno ali popolnoma zamaši pljučno arterijo in krvi prepreči pot v pljuča. To povzroči različne bolezenske spremembe, ki jih opazujemo na dihalih in obtočilih. Okoli 10% bolnikov s pljučno embolijo umre (2). Preprečevanje venske tromboze temelji na dveh načelih: zaviranje strjevanja krvi in preprečevanje venskega zastoja. Na strjevanje krvi vplivamo z zdravili, venski zastoj pa preprečujemo z mehničnimi in fizioterapevtskimi ukrepi. Temeljno zdravljenje venske tromboze je antikoagulacijsko. Zmanjšujemo sposobnosti krvi za strjevanje, kar posledično povzroča manj zapletov in tudi manjšo umrljivost bolnikov (3).

1.1 HEMOSTAZA

Hemostaza je definirana kot zaustavitev krvavitve iz poškodovane žile in je bistvena za preživetje. Za zaustavitev krvavitve so potrebni trije procesi: vazokonstrikcija, agregacija trombocitov in koagulacija (4).

Rana na steni žile povzroči vazokonstrikcijo, ki ji sledi adhezija in aktivacija trombocitov ter tvorba fibrina. Aktivacija trombocitov vodi do tvorbe hemostatičnega čepa, ki zaustavi krvavitev. Vloga fibrina je poskrbeti za še dodatno učvrstitev tromba (5).

1.1.1. VAZOKONSTRIKCIJA

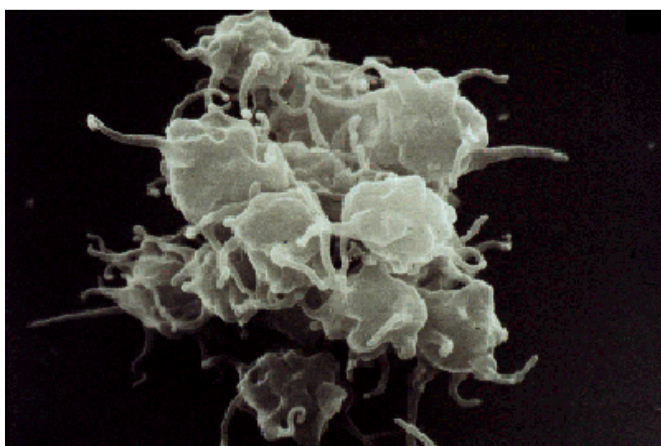
Fizična poškodba žilne stene povzroči krčenje gladkih mišic in s tem zoženje krvne žile. Krčenje vaskularnih gladkih mišic verjetno povzročita direktna mehanska stimulacija, ki jo povzroči predmet, ki povzroči pretrganje, kot tudi mehanska stimulacija perivaskularnih

živcev. Vazokonstrikcija malih arterij oziroma arteriol lahko popolnoma zapre lumen žile in ustavi pretok krvi. (4).

1.1.2 AGREGACIJA TROMBOCITOV

Kot pri vseh sesalcih tudi pri človeku v procesu strjevanja krvi sodelujejo tako celične komponente (trombociti) kot tudi proteinske komponente (faktorji strjevanja). Ko kri izpostavimo proteinu, kot je na primer tkivni faktor, se takoj začnejo dogajati spremembe na trombocitih in plazemskem proteinu fibrinogenu. Trombociti začnejo tvoriti čep na mestu poškodbe in ta proces imenujemo primarna hemostaza (6).

Ob poškodbi žilne stene krvne celice pridejo v stik s proteini, ki so normalno prisotni med zdravim endotelijem in bazno membrano žilne stene. Eden teh proteinov je tudi von Willebrandov faktor (vWF). Bele krvne celice ob stiku z vWF aktivirajo krvni faktor VII, kolagen in druge faktorje strjevanja. Aktivirani trombociti začnejo sproščati v krvno plazmo granule, ki vsebujejo ADP, serotonin, PAF (platelet-activating factor), vWF in tromboksan A_2 (TXA_2), ki povzročajo še dodatno aktivacijo trombocitov (6). Agregacija se na tak način nadaljuje, dokler se nekatere manjše žile popolnoma ne zaprejo s trombociti. Da se trombociti ne bi prilepili na žilno steno nepoškodovanega predela žile, poskrbi prostaciklin. Ta substanca se sprošča iz normalnih endotelijskih celic v neposredni bližini poškodovanega dela žile. Trombociti prav tako sproščajo serotonin (5-hidroksitriptamin), ki okrepi vazokonstrikcijo in tromboplastin, ki pospeši strjevanje krvi.



Slika 1: Aktivirani trombociti (7)

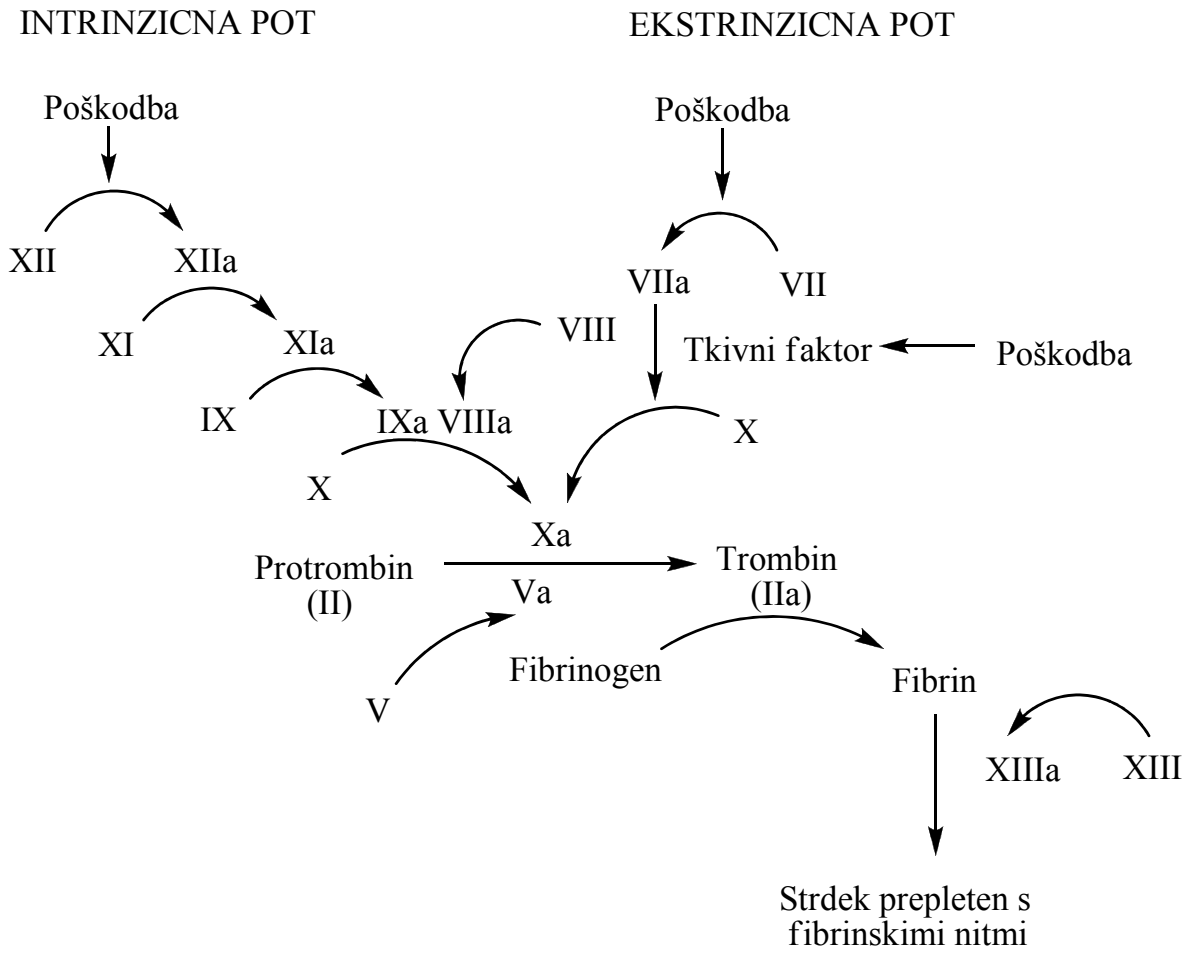
1.1.3 KOAGULACIJA KRVI

Sočasno s primarno hemostazo poteka tudi sekundarna hemostaza. Proteini v krvni plazmi, ki se imenujejo faktorji strjevanja, v kaskadi proteolitičnih reakcij tvorijo fibrinske niti, ki utrdijo trombocitni čep (6). Gre za proces aktivacije različnih faktorjev pri katerem en aktiviran faktor povzroči aktivacijo drugega faktorja. Sinteza faktorjev strjevanja V, VII, IX in X ter fibrinogena in protrombina poteka v jetrih, kar je bilo dokazano v študijah na jetrih podgan (8).

Glavni korak strjevanja krvi je pretvorba fibrinogena (Faktor I) v fibrin s pomočjo trombina. Fibrinske niti se prepletejo s čepom trombocitov in ustvarijo krvni strdek.

Poznamo dve poti strjevanja krvi: intrinzično in ekstrinzično (*Slika 2*). Obema je skupna aktivacija faktorja X, ki katalizira pretvorbo protrombina v trombin. Intrinzična pot se začne, ko pride do stika med plazmo in razgaljenim kolagenom bazalne membrane poškodovane žilne stene. Je zaporedje procesov, ki vodi vse od poškodbe žile prek aktivacije faktorjev XII, XI in IX ob prisotnosti faktorja VIII, trombocitnega faktorja in kalcijevih ionov do aktivacije faktorja X. Ekstrinzična pot pa se sproži ob stiku plazme s tkivnim faktorjem, sproščenim iz poškodovanih celic. Le-ta v stiku s krvjo tvori kompleks s faktorjem VII, ta kompleks pa v prisotnosti kalcijevih ionov aktivira faktor X (9).

Obe poti potekata vzporedno kot kaskada encimskih reakcij in na koncu privedeta do nastanka fibrinske mreže. Strdek zapolni poškodbo v žilni steni v 3-6 minutah po poškodbi, po 20-60 minutah pa se začne strdek krčiti, kar žilo še bolj zapre (10).



Slika 2: Intrinzična in ektrinzična pot strjevanja krvi

1.2 TROMBOZA

Tromboza je patološki proces pri katerem nastane hemostatični zamašek znotraj krvožilnega sistema, ne da bi se pojavila krvavitev, ki bi ta proces sprožila. V večini primerov venska tromboza nastane v globokih venah spodnjih udov. Tromboze v globokih venah zgornjih udov, veni porta, spodnji veni kava, mezenterialni veni in možganskih venah se pojavljajo redkeje.

Obstajajo trije faktorji, ki lahko povzročijo nastanek tromboze:

- poškodba žilne stene (razpad aterosklerotičnega plaka)
- spremenjen tok krvi (atrijska fibrilacija, nastanek strdka v venah nog ob dolgem sedenju)
- nenormalno strjevanje krvi - hiperkoagulabilnost (zadnji trimeser nosečnosti, vpliv kontracepcijskih tablet)

Z aterosklerozo največkrat povezujemo arterijske trombe zgrajene iz t.i. belih trombusov. Sestavljajo jih predvsem trombociti in levkociti v fibrinski mreži. Povzročajo motnjo v pretoku krvi in s tem ishemijo ali smrt tkiva. Venski tromb pa je zgrajen iz rdečih trombusov. Izgleda kot majhna bela glava z dolgim rdečim repom in se premika skupaj s tokom krvi. Lahko se odcepi in tvori embolus. Najbolj je nevaren, če pride v pljuča ali iz leve karotidne arterije v možgane.

Tromboembolizem je kombinacija tromboze (nastanka strdka) in njenega glavnega zapleta embolije (nenadne zamašitve žile). Ko tromb zasede več kot 75% celotne površine lumna žile, se pretok krvi dovolj zmanjša, da se pojavijo simptomi zaradi pomanjkanja kisika (hipoksija) in akumulacija metabolnih produktov (na primer mlečna kislina). Več kot 90% obstrukcij žile se konča z anoksijo (odsotnostjo kisika) in posledično odmrtnjem celice in tkiva (1).

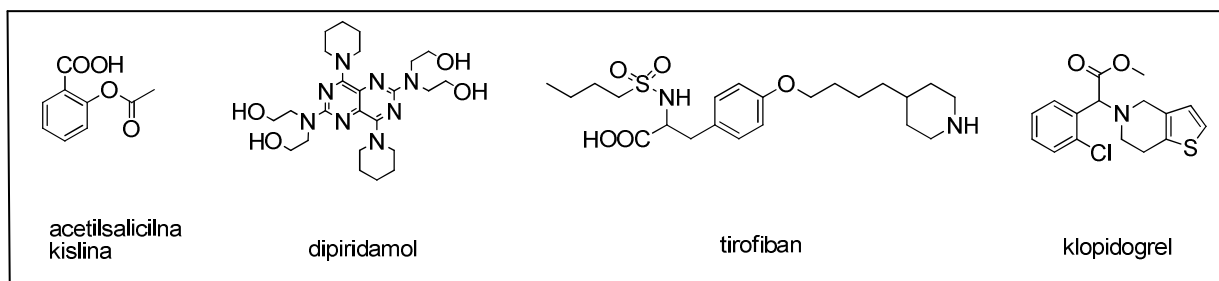
Letno na novo samo v ZDA odkrijejo več kot 200.000 novih primerov venske tromboembolije. Od pacientov z odkrito vensko tromboembolijo jih 30% umre v 30 dneh od odkritja bolezni, ena petina pa umre nenadne smrti kot posledice pljučne embolije. Pri približno 30% pacientov se venska tromboza v desetih letih znova pojavi, kot posledica povečanja telesne teže, neaktivnosti in kajenja (11).

1.3. ANTITROMBOTIČNE UČINKOVINE

Zdravljenje, ki bi pospeševalo hemostazo je le redko potrebno, kot na primer pri hemofiliji, menoragiji ali neuspešni zaustavitvi krvavitve po operaciji. Po drugi strani pa je uporaba zdravil, ki bi preprečevala trombozo in tromboembolijo zelo pogosta, saj so te bolezni pogoste in nevarne. Zdravila, ki vplivajo na hemostazo in trombozo delujejo na tri različne načine, tako da vplivajo na:

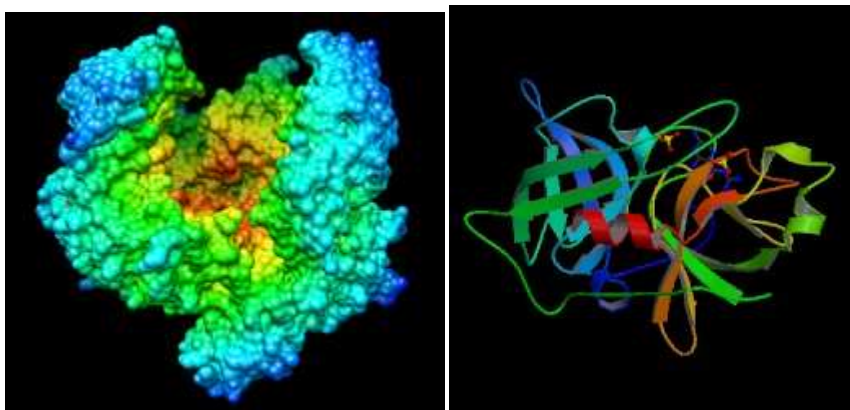
- strjevanje krvi (tvorba fibrina)
- delovanje trombocitov
- odstranjevanje fibrina (fibrinoliza) (4)

Za preprečevanje nastajanja »belih« trombov se uporablja antitrombotične učinkovine in fibrinolitike. Antitrombotične učinkovine inhibirajo agregacijo trombocitov in koagulacijo ter tako zaustavijo nastajanje tromba. Predstavniki učinkovin, ki zavirajo agregacijo trombocitov so: acetilsalicilna kislina, dipiridamol, klopidogrel, tirofiban, tiklopidin ter heparin v nizih koncentracijah (*Slika 3*).



Slika 3: Primeri učinkovin z antitrombotičnim in fibrinolitičnim delovanjem

Fibrinolitiki povzročajo raztapljanje že nastalega tromba. Med procesom fibrinolize nastaja plazmin, ki znižuje količino fibrinogena v krvi, fibrin pa pretvarja v razgradne produkte. Predstavniki: streptokinaza (mešanica encimov iz kulture hemolitičnega streptokoka) in urokinaza (aktivira fibrinolitični sistem)(*Slika 4*) (12).

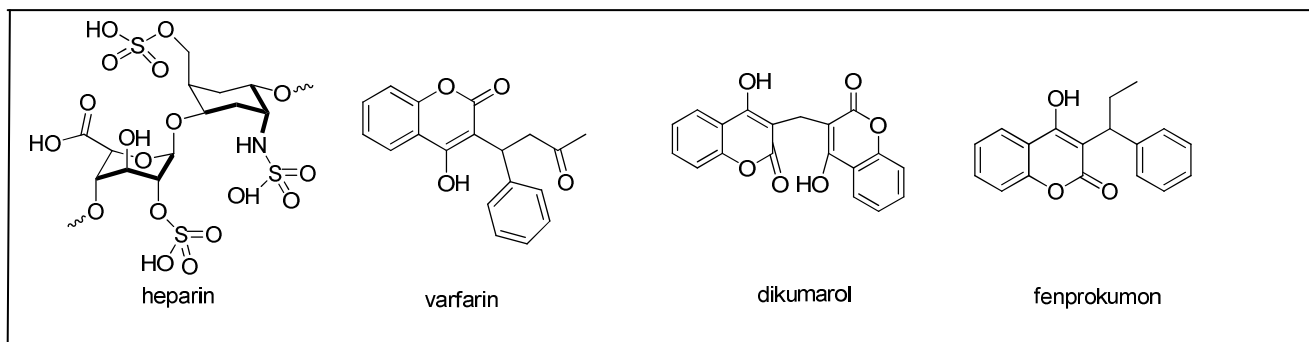


Slika 4: Model streptokinaze (13) in urokinaze (14)

Za preprečevanje nastajanja »rdečih« trombov se uporabljajo parenteralni antikoagulantni (npr. heparin), ki za svoje delovanje nujno potrebujejo kofaktor antitrombin III in peroralni antikoagulantni kot so varfarin, etildikumarol, acenokumarol in klorindion (Slika 5).

Peroralni antikoagulantni v krvi zmanjšujejo količino dejavnikov koagulacije (trombina, faktorja VII, faktorja IX in faktorja X) (12).

Varfarin deluje kot antagonist vitamina K in s tem zmanjšuje aktivnost faktorjev strjevanja krvi odvisnih od tega vitamina (faktorji II, VII, IX in X). Varfarin se namreč vpleta v presnovni cikel vitamina K, kjer se po načelu kompetitivne inhibicije veže na encim vitamin K epoksid reduktazo (VKOR), ki pretvarja neaktivno obliko vitamina K v aktivno, reducirano obliko. Reducirana oblika vitamina nastopa kot kofaktor v procesu gama karboksilacije faktorjev II, VII, IX in X v jetrih. Ob prisotnosti varfarina je na voljo manj reducirane oblike vitamina K, zaradi česar je karboksilacija zavrnjena, aktivnost tako nastalih faktorjev strjevanja krvi pa zmanjšana (15). Odmerke peroralnih antikoagulantov se določa glede na vrednosti tromboplastinskega časa v venski krvi ali vrednosti trombotesta v kapilarni krvi, ki se oba izražata z mednarodno umerjenim razmerjem – INR (International Normalized Ratio). Terapevtsko območje INR je med 2,0–3,0 (16).



Slika 5: Peroralni in parenteralni antikoagulantni

Klinične študije so pokazale, da so nizkomolekularni heparini (NMH) varnejši in učinkovitejši od nefrakcioniranega heparina. Nefrakcionirani heparin je heterogena molekula z veliko molekulsko maso (3.000 - 30.000 D). Po vstopu v krvni obtok se velik del molekul (do 90%) veže na plazemske proteine (lipoproteine z nizko gostoto, globuline in fibrinogen), endotelijske celice in makrofage (17). Nadaljnja presnova heparina poteka v jetrih. Le okoli 10 % nefrakcioniranega heparina se izloči preko ledvic (18). Pri intravenski aplikaciji je učinek heparina takojšen, pri podkožni aplikaciji pa nastopi v 20-30 minutah in je najmočnejši po 4-6 urah (19). Učinki intravenskega nefrakcioniranega heparina po prekinitvi infuzije hitro izzvenijo, saj znaša razpolovni čas nefrakcioniranega heparina pri osebah z normalnim delovanjem ledvic približno 1 uro (20).

Nefrakcioniran heparin ima dokaj nepredvidljiv učinek, kar je njegova največja pomanjkljivost. Nasprotno pa je učinek NMH bistveno bolj predvidljiv. Glavna prednost NMH so izboljšane farmakokinetične lastnosti zaradi manjše sposobnosti vezave učinkovine na plazemske beljakovine in celice. Na voljo imamo različne NMH, ki se med seboj razlikujejo po molekulski masi. Prav zaradi različnih molekulskih mas pa se farmakokinetične in antikoagulacijske lastnosti posameznih NMH pomembno razlikujejo in zato med seboj niso izmenljivi. Ker prihaja pri bolnikih z ledvično boleznijo, ki prejemajo trajno nadomestno zdravljenje s hemodializo do podaljšane razpolovne dobe NMH, je potrebna dodatna previdnost pri predpisovanju odmerka (21).

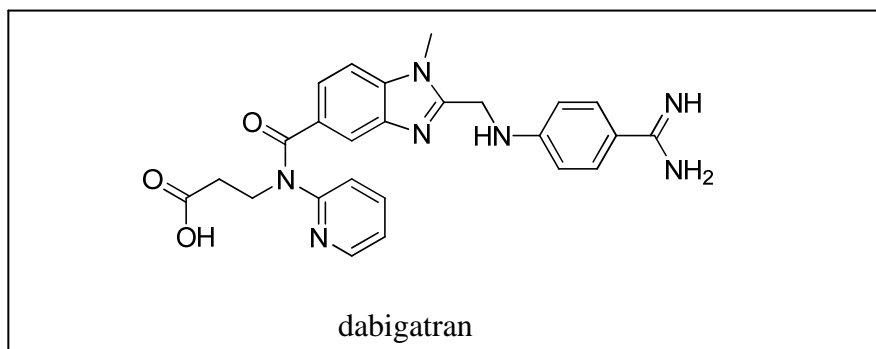
Zaradi dobro predvidljive farmakokinetike se NMH odmerjajo glede na telesno maso bolnika. Laboratorijske kontrole antikoagulacijskega učinka pri njih v večini primerov niso potrebne. V redkih primerih, kot so nosečnice, otroci, bolniki z ledvično odpovedjo, se antikoagulacijski učinek zdravila spremlja z merjenjem aktivnosti faktorja Xa. Za

zdravljenje z nefrakcioniranim heparinom v intravenski infuziji se zdravniki odločijo v primeru velike nevarnosti krvavitve ali če je v bližnji prihodnosti predviden nujni invazivni poseg (20).

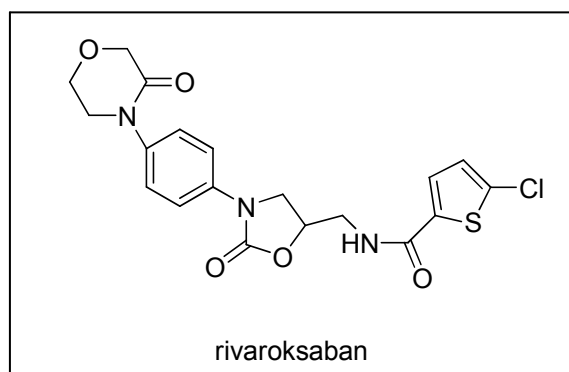
1.4 KONCEPT DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN

V procesu strjevanja krvi imamo več tarč na katere bi lahko uspešno vplivali. Na primer trombin, faktor Xa in faktor VIIa. V zadnjem desetletju se je kot tarča za načrtovanje sintez novih antikoagulantov največkrat uporabil prav trombin. Na obzorju je vrsta selektivnih zaviralcev faktorjev strjevanja krvi Xa in direktnih inhibitorjev faktorja IIa (trombin). Dodatne učinkovine, ki so še vedno v predkliničnih in kliničnih testiranjih, vključujejo inhibitorje faktorjev VII in XII ter modulatorje proteina C ali endogene fibrinolize, kot tudi nove antiagregatorne učinkovine (22).

Prvi peroralni nizkomolekularni inhibitor trombina na tržišču je bil *dabigatran*. Gre za antikoagulant iz skupine direktnih inhibitrojev trombina. Izvedenih je bilo več študij, kjer se je v primerjavi z enoksaparinom, ki je eden od predstavnikov NMH, dabigatran izkazal kot boljša izbira pri pacientih z ortopedskimi operacijami, medtem ko sta učinka obeh zdravil primerljiva. V terapiji z dabigatranom spremljanje protrombinskega časa ni potrebno (23). Dabigatran ima podobno strukturo kot inhibitor trombina α -NAPAP (*N*-alfa-(2-naftilsulfonilglicil)-4-amidinofenilalanine piperidid), ki je bil odkrit leta 1980 in velja za zelo močnega inhibitorja serinskih proteaz, še posebej trombina in tripsina. Dodatek hidrofobne stranske verige je vodil k odkritju peroralno uporabnega predzdravila (dabigatran eteksilat) (24). Stranski učinek, ki se je signifikantno večkrat pojavil pri dabigatranu kot pri ostalih antikoagulantih, na primer varfarinu, je dispepsija. Težave v gastrointestinalnem traktu verjetno povzročata farmakofor vinske kisline, ki je potreben za doseganje nizkega pH in s tem absorpcije zdravila. Prav tako je zmanjšana absorpcija zdravila s sočasno aplikacijo inhibitorjev protonske črpalke (25).



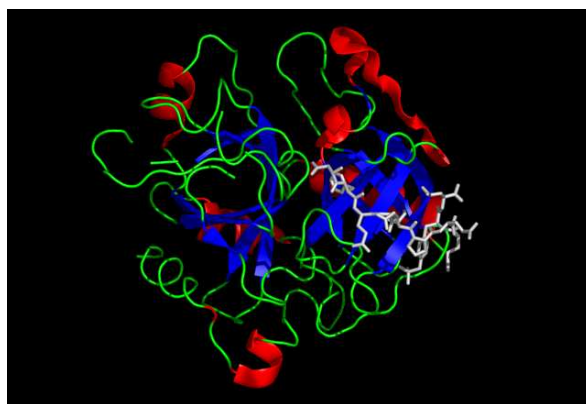
Rivaroksaban je prvi peroralno aktivni direktni inhibitor faktorja Xa. Dobro se absorbira iz gastrointestinalnega trakta in tako maksimalno koncentracijo doseže že po 4 urah od peroralne aplikacije. Njegov učinek traja od 8 do 12 ur, vendar se aktivnost faktorja Xa ne vrne na normalno stanje še 24 ur po aplikaciji dnevne doze. *Rivaroksaban* je oksazolidinonski derivat, optimiziran za inhibicijo prostega faktorja Xa in faktorja Xa vezanega na protrombinski kompleks (26). Inhibicija faktorja Xa prekine intrinzično in ekstrinzično pot kolagulacije krvi. *Rivaroksaban* ne inhibira trombina in nima nobenega dokazanega učinka na trombocite. Ima predvidljivo farmakokinetiko pri širokem spektru pacientov (starost, spol, teža, rasa). Prav tako kot pri dabigatranu, tudi pri *rivaroksabanu* ni potrebe po prilagajanju doze in spremljanju koagulacije (27).



Trombin, drugače znan tudi kot faktor II, je glavna komponenta v kaskadi strjevanja krvi. Ima koagulantne, antikoagulantne in tudi antifibrinolitične lastnosti. Njegova glavna naloga je cepitev topnega fibrinogena v netopni fibrin. Lahko povzroča številne trombotične motnje, kot so tromboembolizem, miokardni infarkt in kap. Trombin je zaradi njegovega delovanja zanimiva tarča za antitrombotične učinkovine. Interagira specifično z mnogimi receptorji, kofaktorji, inhibitorji, karbohidrati in modulatorji. Cepi fibrinogen, faktorje XI in XIII ter kofaktorje V in VIII. Za aktivacijo proteina C uporablja trombomodulin. Inhibirata ga heparinski kofaktor II in antitrombin III z direktno vezavo na nanj. Njegovo aktivnost oziroma specifičnost modulirajo natrijevi ioni.

Veliko število kristalnih struktur α -trombina v kompleksu s sintezniimi polipeptidi, inhibitorji proteina in kofaktorji je prikazalo različna območja za interakcije na površini proteina. Ta območja kažejo na vsestranskost in multifunkcionalnost trombina. Strukturo proteinaze lahko razdelimo v več funkcionalnih regij z različnimi kemijskimi lastnostmi. Z uporabo različnih kombinacij teh strukturnih elementov, trombin lahko interagira z različnimi molekulami z visoko specifičnostjo (28).

Kristalna struktura humanega trombina je pokazala, da ima protein zanko z aminokislinskim zaporedjem Tyr-Pro-Pro-Trp in S_1 žep, ki sta pomembna za samo delovanje. To aktivno mesto je postalo osnova za načrtovanje in optimizacijo inhibitorjev trombina. Sintetiziranih je bilo mnogo nizko molekularnih inhibitorjev, ki so imeli skupno to, da so bili mimetiki aminokislinskega zaporedja *D*-Phe-Pro-Arg. Izkazalo se je, da ima arginin ali njegov mimetik v S_1 žepu pomembno vlogo pri vezavi na aktivno mesto trombina (29).



Slika 6: Humani trombin v kompleksu z inhibitorjem (30)

Fibrinogeni receptor GPIIb/IIIa spada v družino integrinskih receptorjev. Vsi integrini so sestavljeni iz dveh različnih podenot, ki sta združeni z nekovalentno vezjo. Obe α in β podenoti sta transmembranska proteina. Podenota α ima tri ali štiri kationske vezalne domene, medtem β podenota vsebuje mnogo disulfidnih vezi. Kombinacije teh podenot tvorijo receptorje, ki so specifični za številne ligande (31).

Kloniranje cDNA GPIIb in GPIIIa je vodila v spoznanje, da je GPIIb tipična α podenota in GPIIIa tipična β podenota intergrinskega receptorja. S pomočjo proteolitične razgradnje fibronektina in sinteze peptidov z različnimi aminokislinskimi sekvencami, ki sestavljajo fibronektin, so identificirali zaporedje treh aminokislin arginin-glicin-aspartinska kislina (RGD), ki je ključno za aktivacijo receptorja. Kljub temu, da fibrinogen vsebuje dve RGD sekvenci v α verigi, je za vezavo fibrinogena na receptor ključna RGD sekvenca na C-terminalnem koncu γ verige (32).

Zlepljenje trombocitov povzroči ionska interakcija med aminokislinskim zaporedjem Arg-Gly-Asp fibrinogena in receptorjem GPIIb/IIIa na trombocitu. Receptorji pridejo na površje trombocita, potem ko so trombociti aktivirani s pomočjo ADP, kolagena ali trombina. Kar nekaj učinkovin je bilo razvitih kot peroralnih GPIIb/IIIa antagonistov, vendar niso uspešno prestali III. faze kliničnih testiranj zaradi številnih neželenih učinkov in celo povečane smrtnosti. Nekatere učinkovine so kazale celo prokoagulantno delovanje. Če je koncentracija učinkovine v plazmi nižja, kot je koncentracija potrebna za antagonistično delovanje na receptorju, lahko pride do neželenega učinka. Dobimo učinkovino z delnim agonističnim delovanjem na receptor GPIIb/IIIa. Dodatne študije so pokazale, da je aktivno mesto na GPIIb/IIIa rigidno, kar je pomemben podatek za nadaljnje raziskave (33,34).

Sočasna inhibicija različnih tarč v hemostatičnem sistemu z različnimi substancami je znana že pri hematofagnih živalih (komarji, pijavke, netopirji). Te živali imajo v slini mešanico spojin, ki delujejo npr. kot antikoagulantni, antiinflamatorni, preprečuje vazokonstrikcijo in lajšajo bolečino.

Ena od teh učinkovin je hirudin. Hirudin je 65-aminokislinski polipeptid, izoliran iz žlez slinavk medicinskih pijavk in se ga danes pridobiva z rekombinantno tehnologijo.

Rekombinantni hirudin ima 10-krat slabšo afiniteto do trombina kot hirudin izoliran iz slin pijavk (35).

Danes je v terapiji pogosta sočasna uporaba učinkovin, ki delujejo antikoagulacijsko (npr. varfarin) in učinkovin proti zlepljanju trombocitov (npr. acetilsalicilna kislina, klopidogrel). Ker se učinek obeh zdravil sešteva, pride do močnejšega zaviranja strjevanja krvi, kot če bi uporabili le terapijo z antikoagulantom ali terapijo z antiagregatorno učinkovino.

Raziskave potekajo v smeri združevanja farmakoforov, ki delujejo antitrombotično in farmakoforov, ki delujejo antagonistično na fibrinogeni receptor GPIIb/IIIa v eno molekulo. Gre za nov koncept peptidomimetikov z nizko molekularno maso z dualnim učinkom. Farmakofora *D*-Phe-Pro-Arg in Arg-Gly-Asp, ki sta združena v isti molekuli se bosta hkrati vezala na aktivno mesto trombina in fibrinogeni receptor. V molekuli se prepletajo dve ali tri domene, in sicer RGD sekvenca z inhibitornim delovanjem na receptor GP IIb/IIIa, *D*-Phe-Pro-Arg sekvenca z inhibitornim delovanjem na trombin, ter anionsko vezavno mesto. Nove dualne antitrombotične učinkovine bi imele številne prednosti pred že obstoječo terapijo, v kateri se uporablja kombinacija antikoagulantov in antiagregatornih učinkovin. Nekaterje od teh prednosti so manj kompleksna in bolj predvidljiva farmakokinetika, manj neželenih učinkov, manj zahtevne klinične študije ter lažja registracija zdravila (33).

1.4.1. 3,4-DIHIDRO-2*H*-1,4-BENZOKSAZINSKI DERIVATI KOT DUALNI ANTITROMBOTIKI

3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazinski derivati, ki delujejo kot inhibitorji trombina in kot antagonisti fibrinogenkega GPIIb/IIIa receptorja naj bi v svoji strukturi vključevali:

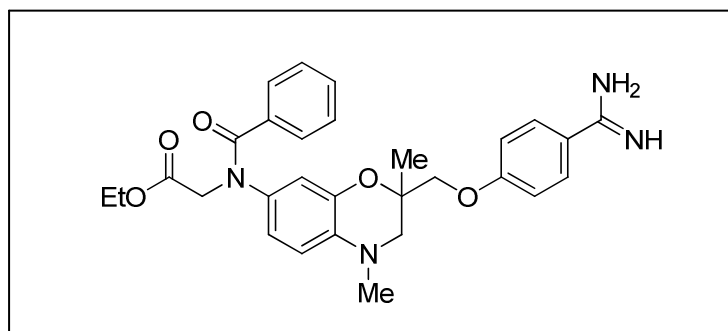
- mimetik arginina, ki bi interagiral z Asp189 v S₁ žepu trombina ter deloval kot kationski center za vezavo na GPIIa/IIIb receptor v Asp224
- karboksilatno skupino, ki bi delovala kot anionski center za vezavo na GPIIa/IIIb receptor
- centralni gradnik, ki bi reagiral z YPPY zanko trombina in deloval kot približno 1.5 nm dolg vmesnik med obema nabitima skupinama s katerima se molekula veže na GPIIa/IIIb receptor

- aromatski obroč v bližini karboksilatne skupine, ki bo interagiriral z S₃ žepom trombina in zagotovil hidrofobno interakcijo z nepolarnim vezavnim mestom GPIIa/IIIb receptorja.

Z ozirom na strukturo osrednjega gradnika dualnih antitrombotičnih učinkovin bi bilo potrebno najti kompromis, saj so antagonisti fibrinogenskega GPIIb/IIIa receptorja najbolj učinkoviti, če so v iztegnjeni konformaciji, inhibitorji trombina pa morajo biti med fragmentoma P₁ in P₂ ukrivljeni. Kljub svoji bazičnosti, ki običajno pomeni slabo biološko uporabnost je bil v začetni fazi raziskav kot mimetik arginina izbran benzamidin.

Benzamidin zmanjšuje vezavo na plazemske proteine in na tak način povečuje aktivnost.

Sistematične variacije mest substituentov okoli 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazinskega jedra, razdalja med karboksilatno in amidno skupino ter dodatne substituentne, ki zapolnijo S₂ in S₃ žepe trombina, so dale spojine, ki izkazujejo submikromolarne inhibicijske konstante (*K_i*) za trombin in submikromolarne IC₅₀ za inhibicijo vezave fibrinogena na GPIIb/IIIa. Nekatere spojine imajo dobro aktivnost na obeh tarčah (npr. **17h** : *K_i* = 0,156 μM, IC₅₀ = 1,78 μM) in so dobre izhodiščne spojine za nadaljnje optimizacije (*Slika 7*) (33).



*Slika 7: Spojina (17h) s 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoksazinskim skeletom in dualnim antitrombotičnim delovanjem*

1.5 DOSEDANJE DELO NA PODROČJU DUALNIH ANTITROMBOTIČNIH UČINKOVIN

Že nekaj let na Fakulteti za farmacijo potekajo raziskave na področju dualnih antitrombotičnih učinkovin z različnimi modifikacijami na osnovnem 1,4-benzoksazinskem gradniku in modifikacijami v P₃ ter P₁ delu molekule. Zadnje raziskave potekajo prav v smeri modifikacije v predelu P₃. Z uvedbo različnih substituentov na benzoksazinski obroč, ki naj bi pripomogli k izboljššanemu antitrombotičnemu delovanju (manjši IC₅₀ in manjša K_i). Poskusi potekajo s spojinami, ki imajo na mestu 6 ali 7 poleg karboksilne skupine vezane na dušik tudi benzilno skupino s fluorom na mestu 3 ali 4, ter na mestih 3,4 oziroma 3,5.

Še eden izmed možnih gradnikov, ki bi lahko imel primerne lastnosti vmesnika, je benzo[b][1,4]dioksin, ki se od benzoksazina loči le po kisikovem atomu na mestu 4.

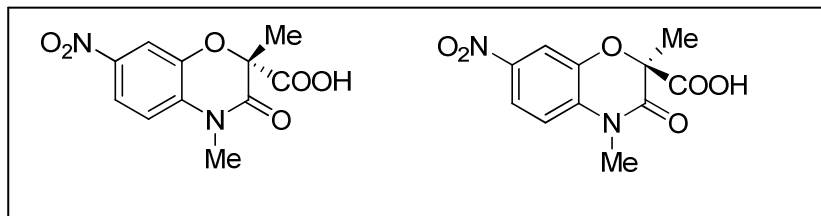


Slika 8: Benzo[b][1,4]oksazinski in benzo [b][1,4]dioksinski skelet

Vse doslej pripravljene tovrstne spojine imajo kiralni center na mestu 2, kjer je lahko poleg P₁ fragmenta na vmesnik vezana tudi metilna skupina in so zmesi enantiomerov. Ker se je že na začetku raziskave izkazalo, da so (2*R*) izomeri bolj učinkoviti kot (2*S*) izomeri (33), bi bilo zanimivo pripraviti enantiomerno čiste spojine in preveriti tudi njihovo učinkovitost. To bi lahko naredili tako, da bi enantiomera končnih spojin poskušali ločiti z resolucijo ali pa bi že pri sintezi izhajali iz čistega enantiomera.

2 NAMEN DELA

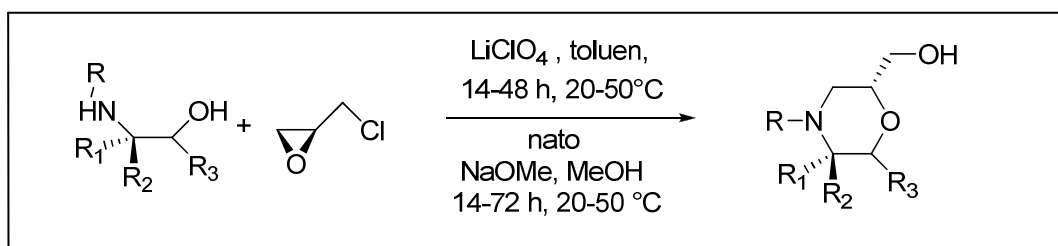
Namen diplomske naloge je pripraviti enantiomerno čiste gradnike benzoksazinskega tipa, ki bi jih lahko uporabili za sintezo enantiomerno čistih inhibitorjev trombina in antagonistov fibrirogeneskega receptorja GPIIa/IIIb.



Slika 9: R in S oblika enantiomerov

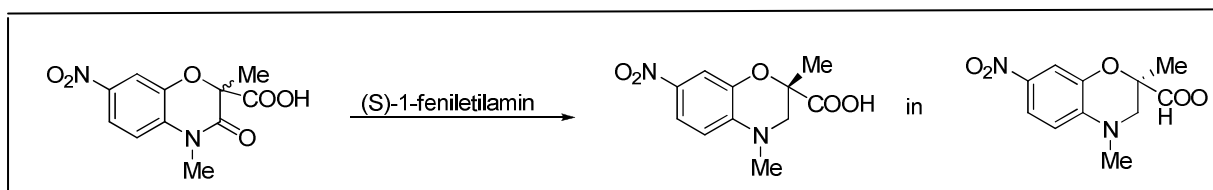
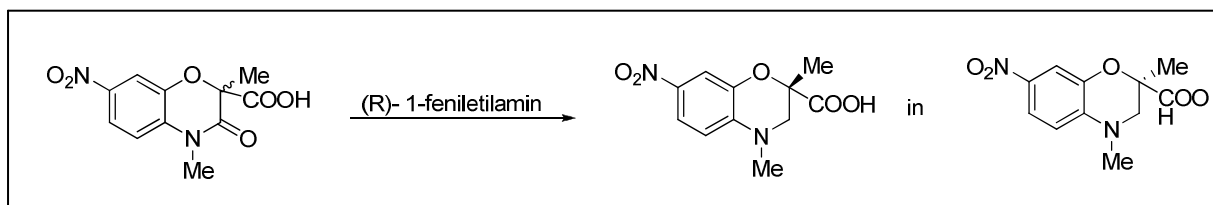
Na podlagi dosedanjih raziskav bomo poskusili s:

- sintezo enantiomerno čistega benzoksazina brez metilne skupine na mestu 2 z epiklorhidrinom, ki je bila opisana za sorodne spojine (37)

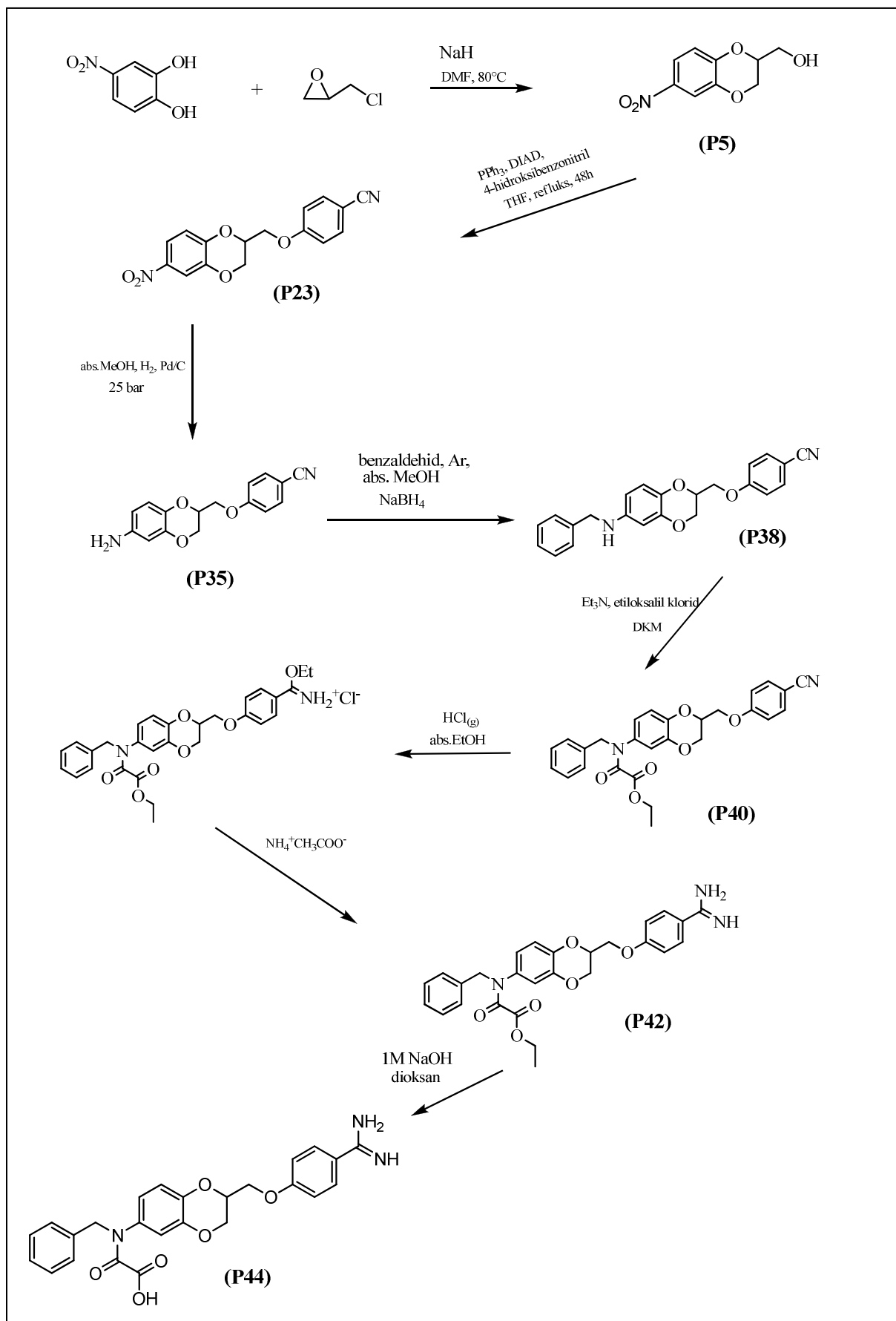


Slika 10: Sintezna shema sorodnih spojin (37)

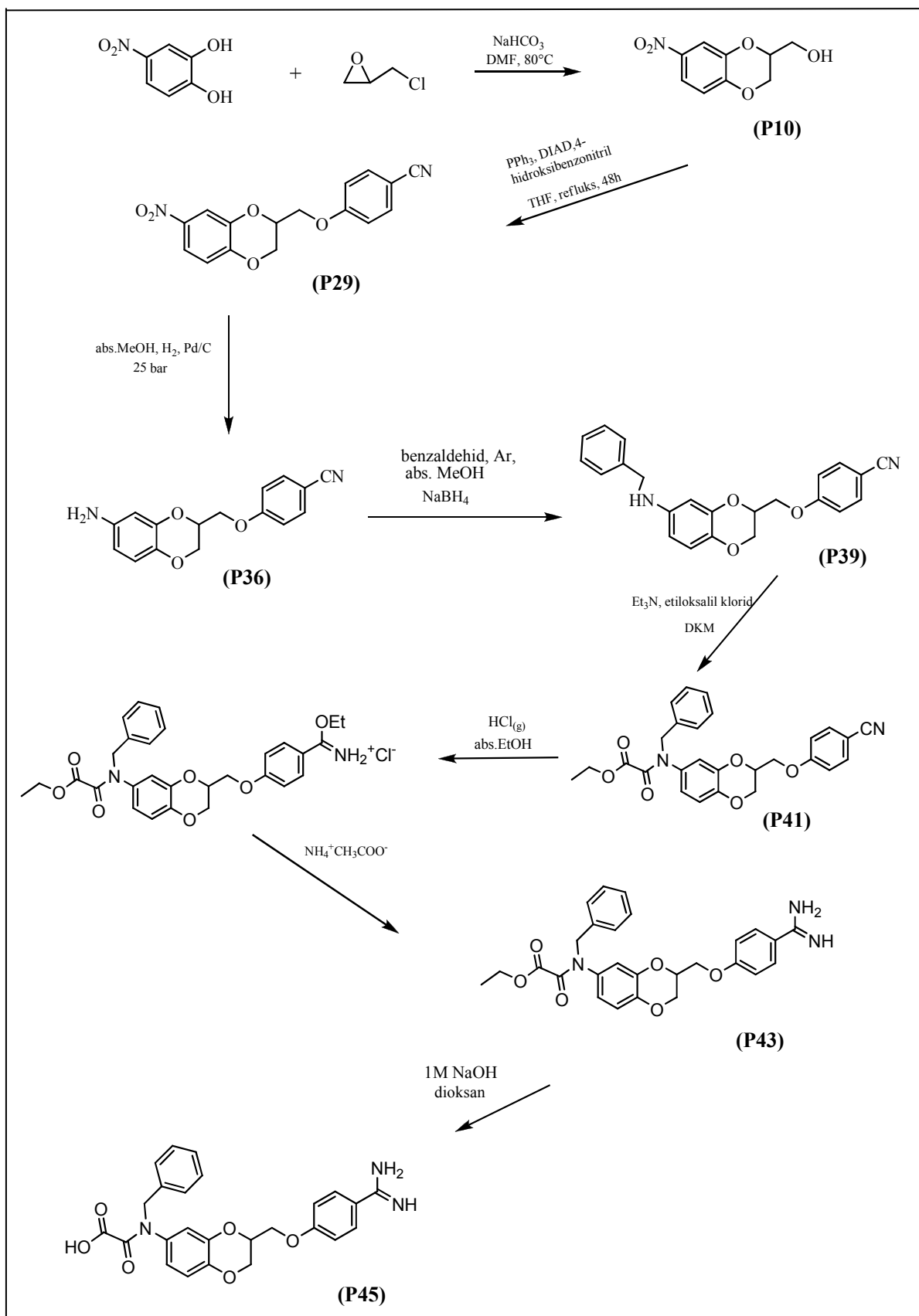
- pripravo čistih enantiomerov 6- in 7- nitrobenzoksazinov z resolucijo (38, 39)



V okviru diplomske naloge bomo pripravili tudi spojini **P44** (2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobzeno[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetnokislino) in **P45** (2-(benzil(3-((4-karbamidoilfenoksi)metil)-2,3-dihidrobzeno[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetnokislino) v zadostni količini, da bodo v okviru nadaljnjega dela možni poskusi njenega kromatografskega ločevanja na enantiomere.



Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine P44



Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine P45

3 MATERIALI IN METODE

- **Reagenti in topila**

Za sinteze in kromatografske ločitve smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Aldrich, Fluka, Janssen in Merck).

- **Tankoplastna kromatografija**

Uporabljali smo plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0,22 mm debelim nanosom silikagela na aluminijasti plošči.

Za detekcijo smo uporabili UV lučko z valovno dolžino 254 nm.

Kot orositveni reagent smo pri nekaterih reakcijah uporabljali raztopino FeCl₃.

- **Normalnofazna kolonska kromatografija**

Kot stacionarno fazo smo uporabljali Kieselgel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm proizvajalca Merck. Za ločevanje spojin smo uporabljali različna topila, katerih razmerja so podana pri vsaki sintezi.

- **Reverznofazna kolonska kromatografija**

Za nekatere ločbe smo uporabili flash kromatografsko ločbo na aparaturi Isolera. Kot stacionarno fazo smo uporabili reverznofazno kolono Biotage SNAP Cartridge (KP-C18-HS, 60g) z velikostjo delcev 35-70 µm in za mobilno fazo metanol : 0,1% trifluoroocetna kislina v H₂O (gradient 40%-100%)

- **HPLC analiza**

Za visokotlačno tekočinsko kromatografijo smo uporabili instrument Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-vis detektorjem (254 nm). Kot stacionarno fazo smo uporabili kolono Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm) z velikostjo delcev 5 µm, pretok 1 mL/min.

- **IR spektrometrija**

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo.

- **Masna spektrometrija**

Masni spektri so bili posneti z instrumentom Varian-MAT 311 A s EI, ESI ali HRMS tehnikami na Inštitutu Jožef Štefan.

- **Jedrska magnetna resonanca**

^1H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance DPX₃₀₀ v Centru za jedrsko in magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Kot topila smo uporabili DMSO- d_6 in CDCl_3 .

- **Elementna analiza**

Vsebnost elementov C, H, N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

- **Optična sučnost**

Sučnost spojin smo izmerili na Perkin-Elmer 1241 polarimetru na Fakulteti za farmacijo. Dobljene vrednosti so povprečje 5 zaporednih meritev z integracijskim časom 5s.

- **Tališče**

Tališča spojin so bila določena z mikroskopom Leica z ogrevalno mizico in niso korigirana.

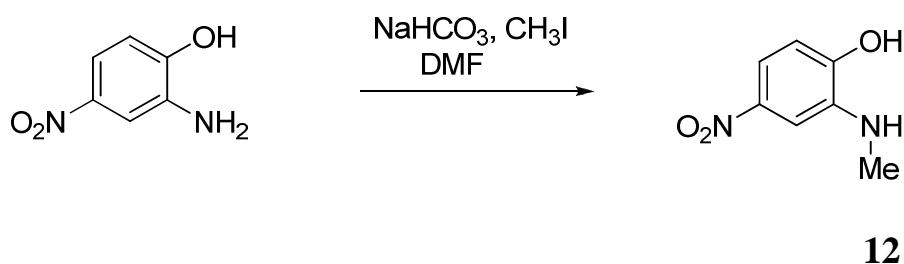
- **Poimenovanje spojin**

Za poimenovanje spojin smo uporabili program Chem Draw Ultra 11.0 proizvajalca CambridgeSoft.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 SINTEZA PREKURZORJEV ENANTIOMERNO ČISTIH BENZOKSAZINOV

4.1.1 Sinteza 2-(metilamino)-4-nitrofenola



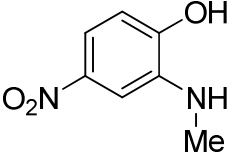
Za sintezo smo uporabili predpis (40), ki je bil opisan za sorodne spojine.

15,0 g (98,3 mmol) 2-amino-4-nitrofenola smo raztopili v 250 mL DMF. Dodali smo 8,3 g (98,3 mmol) NaHCO_3 in 6,1 mL (98,3 mmol) metiljodida in reakcijo pustili poteči čez noč pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo preverili s tankoplastno kromatografijo. Po končani reakciji smo DMF odstranili pod znižanim tlakom, oborino raztopili v 300 mL nasičene raztopine NaHCO_3 in ekstrahirali z EtOAc dokler je bilo v vodni fazi še kaj učinkovine. Potrebovali smo približno 800 mL EtOAc. Združene organske faze smo sprali s 300 mL nasičene raztopine NaHCO_3 in s 300 mL nasičene raztopine NaCl ter jih posušili z Na_2SO_4 . Organsko fazo smo odparili pod znižanim tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH = 40:1). Spojina še vedno ni bila popolnoma očiščena, zato smo je prekrystalizirali iz toluena. Dobili smo oranžno rdeče kristale.

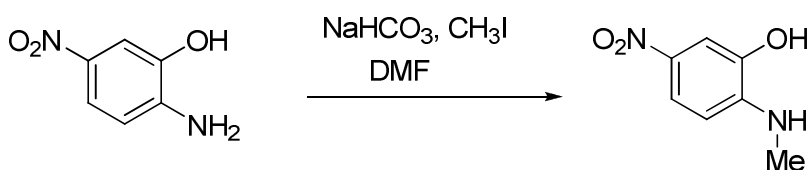
Izkoristek reakcije: 7,78 g

47,1 %

R_f (DKM/MeOH = 40:1) = 0,21

2-(Metilamino)-4-nitrofenol		$M_r = 168,05$
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	oranžno rdeči kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	$\delta [ppm] = 2,77$ (s, 3H, NH-CH ₃), 6,80 (d, 1H, $J = 8,58$ Hz, Ar-H ⁶), 7,14 (d, 1H, $J = 2,67$, Ar-H ³), 7,43 (dd, 1H, $J_1 = 8,59$ Hz, $J_2 = 2,73$ Ar-H ⁵) *OH skupina ni vidna	
MS (ESI)	m/z = 169 (89, MH ⁺), 124 (100)	
IR (KBr)	$\nu [cm^{-1}] = 3421, 1793, 1611, 1578, 1489, 1274$	
T_t	113-116 °C T _t po literaturi (40) ni podana	

4.1.2 Sinteza 2-(metilamino)-5-nitrofenola



13

Za sintezo smo uporabili predpis (40), ki je opisan za sorodne spojine.

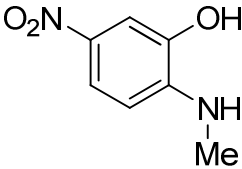
15,0 g (98,3 mmol) 2-amino-5-nitrofenola smo raztopili v 250 mL DMF. Dodali smo 8,3 g (98,3 mmol) NaHCO₃ in 6,1 mL (98,3 mmol) metiljodida in reakcijo pustili poteci čez noč pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo preverili s tankoplastno kromatografijo in HPLC. Ker reakcija še ni potekla do konca smo dodali še 4,0 ml (64,0 mmol) metiljodida. Še enkrat smo preverili s tankoplastno kromatografijo in HPLC. Po končani reakciji smo DMF odstranili pod znižanim tlakom, oborino raztopili v 300 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in ekstrahirali z EtOAc dokler je bilo v vodni fazi še kaj učinkovine (14 x 50 mL EtOAc). Združene organske faze smo sprali z 200 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in 200 mL nasičene raztopine NaCl ter jih posušili z Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim

tlakom in spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH = 40:1). Spojina še vedno ni bila popolnoma čista, zato smo je prekrizalizirali iz toluena. Dobili smo oranžno rdeče kristale.

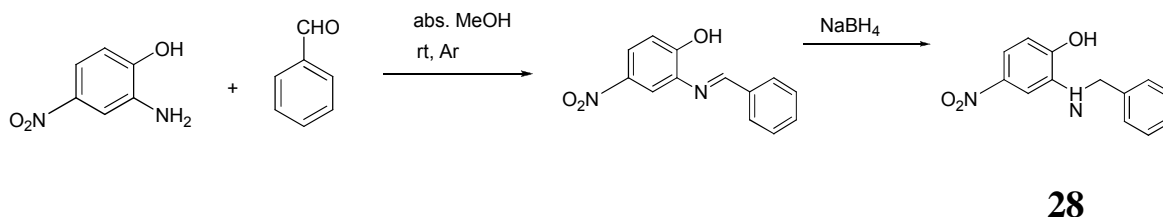
Izkoristek: 6,9 g

42,3%

R_f (DKM/MeOH = 40:1) = 0,28

2-(Metilamino)-5-nitrofenol		M_r = 168, 05
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	oranžno rdeči kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 2,82 (d, 3H, J = 5,04 Hz, NH-CH ₃), 6,42 (m, 1H, NH-CH ₃), 6,48 (d, 1H, J = 8,91 Hz, Ar-H ³), 7,47 (d, 1H, J = 2,55, Ar-H ⁶), 7,72 (dd, 1H, J ₁ = 8,86 Hz, J ₂ = 2,52 Hz, Ar-H ⁴) *OH skupina ni vidna	
MS (ESI)	m/z (%) = 169 (70, MH ⁺), 124 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3402, 3312, 1612, 1487, 1297 1170	
T_t	168 - 170 °C T _t po literaturi (41) : 177-179°C	

4.1.3 Sinteza 2-(benzilamino)-4-nitrofenola



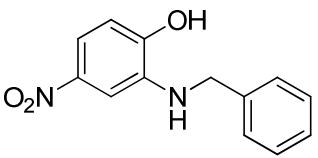
Za sintezo smo uporabili predpis (42), ki je opisan za sorodne spojine.

Molekularna sita velikosti 2Å smo aktivirali 2h pri 100 °C. V bučko z molekularnimi siti smo natehtali 1,0 g (6,5 mmol) 4-nitro-2-aminofenola in ga raztopili v 20 mL absolutnega MeOH. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom. Dodali smo še 688,5 mg (1 eq, 6,5 mmol, 662 µL) benzaldehida. Reakcijo smo pustili poteči čez noč pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Počasi smo dodali 274,0 mg (1,6 eq, 10,4 mmol) NaBH₄ ter reakcijsko zmes pustili 1h pri sobni temperaturi, da je redukcija potekla do konca. S tankoplastno kromatografijo smo še enkrat preverili ali je reakcija potekla. Brezvodni metanol smo odparili pri znižanem tlaku. Nastali oborini smo dodali 30 mL prečiščene vode ter ekstrahirali z EtOAc (3 x 30 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ ter EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo prečistili s kromatografsko kolono (MF: DKM/MeOH = 30:1). Dobili smo oker kristale.

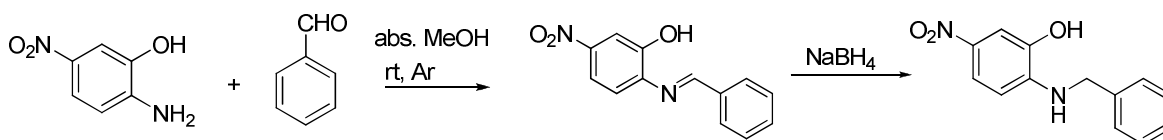
Izkoristek : 494 mg

31,2 %

R_f (DKM/MeOH = 30:1) = 0,33

2-(Benzilamino)-4-nitrofenol		$M_r = 244, 25$
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	oker kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,40 (s, 2H, NH-CH ₂), 6,80 (d, 1H, $J = 8,61$ Hz, Ar- H ⁶), 7,10 (d, 1H, $J = 2,76$ Hz, Ar-H ³), 7,31 - 7,37 (m, 5H, CH ₂ -Ph), 7,42 (dd, 1H, $J_1 = 8,61$ Hz, $J_2 = 2,76$ Hz, Ar- H ⁵) * OH in NH skupi nista vidni	
MS (ESI)	m/z (%) = 243 (100, MH)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3356, 2345, 1525, 1396, 1279	
T_t	157-161 °C	
Elementna analiza (CHN) (C₁₃H₁₂N₂O₃ × 1/3 H₂O)	Izračunano	Izmerjeno
	C 63,93%	C 63,39 %
	H 4,93%	H 4,77 %
	N 11,47%	N 10,99 %

4.1.4 Sinteza 2-(benzilamino)-5-nitrofenola



27

Za sintezo smo uporabili predpis (42), ki je opisan za sorodne spojine.

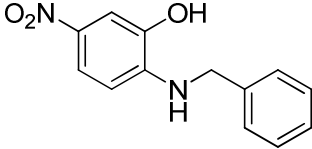
Molekularna sita velikosti 2Å smo aktivirali 2h pri 100 °C. V bučko z molekularnimi siti smo natehtali 1,0 g (6,5 mmol) 5-nitro-2-aminofenola in ga raztopili v 20 mL absolutnega MeOH. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom. Dodali smo še 688,5 mg (1 eq, 6,5 mmol, 662 µL) benzaldehida. Reakcijo smo pustili poteči čez noč pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija potekla. Ker reakcija ni potekla do konca smo dodali še 0,5 eq (3,2 mmol, 331 µL) benzaldehida in reakcijsko zmes mešali

čez noč. S tankoplastno kromatografijo smo preverili, ali je reakcija potekla. Počasi smo dodali 274 mg (1,6 eq, 10,38 mmol) NaBH₄ ter reakcijsko zmes pustili 1h pri sobni temperaturi, da je redukcija potekla do konca. S tankoplastno kromatografijo smo še enkrat preverili ali je reakcija zaključena. Brezvodni metanol smo odparili pri znižanem tlaku. Nastali oborini smo dodali 30 mL prečiščene vode ter ekstrahirali z EtOAc (5 x 30 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄. EtOAc smo odparili pri znižanem tlaku. Dobili smo črno-rjavo olje. Spojino smo prečistili s kromatografsko kolono (MF: DKM/MeOH = 30:1). Ker spojina še vedno ni bila popolnoma čista, smo jo prekristalizirali iz toluena. Dobili smo kristale rumene barve.

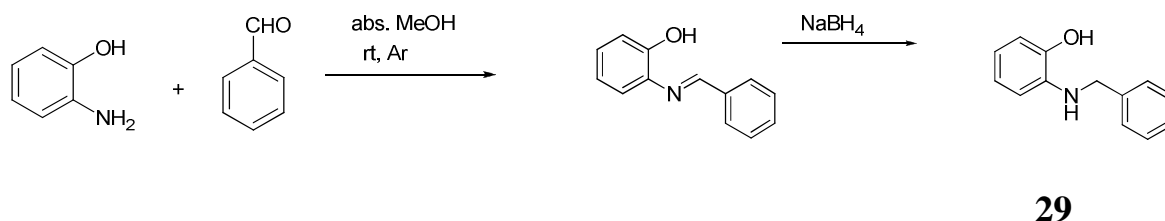
Izkoristek : 620 mg

40,0 %

Rf (DKM/MeOH = 30:1) = 0,32

2-(Benzilamino)-5-nitrofenol		M_r = 244,25															
Struktura spojine:																	
																	
Izgled spojine	rumeni kristali																
Analiza	Rezultati																
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,47 (d, 2H, $J = 6,45$ Hz, NH-CH ₂), 6,44 (d, 1H, $J = 8,97$ Hz, Ar-H ³), 6,95 - 6,99 (t, 1H, $J = 6,36$ Hz, Ar-NH-), 7,21 - 7,25 (m, 1H, Ar-H ^{2'}), 7,28 - 7,33 (m, 4H, Ar-H ^{3'-6'}) 7,50 (d, 1H, $J = 2,58$ Hz, Ar-H ⁶), 7,60 (dd, 1H, $J_1 = 8,89$ Hz, $J_2 = 2,58$ Hz, Ar-H ⁴) 10,40 (s br, 1H, Ar-OH)																
MS (ESI)	m/z (%) = 243 (100, MH ⁺)																
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3421, 3358, 2345, 1606, 1545, 1312, 1279, 1171, 1091																
T_f	65-69 °C																
Elementna analiza (CHN)	<table border="0"> <tr> <td>Izračunano</td> <td></td> <td>Izmerjeno</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>63,93 %</td> <td>C</td> <td>64,19 %</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>4,93 %</td> <td>H</td> <td>5,04 %</td> </tr> <tr> <td>N</td> <td>11,47 %</td> <td>N</td> <td>11,12 %</td> </tr> </table>	Izračunano		Izmerjeno	C	63,93 %	C	64,19 %	H	4,93 %	H	5,04 %	N	11,47 %	N	11,12 %	
Izračunano		Izmerjeno															
C	63,93 %	C	64,19 %														
H	4,93 %	H	5,04 %														
N	11,47 %	N	11,12 %														

4.1.5 Sinteza 2-(benzilamino)fenola



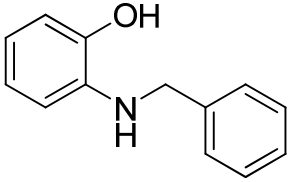
Za sintezo smo uporabili predpis (42), ki je opisan za sorodne spojine.

Molekularna sita velikosti 2Å smo aktivirali 2h pri 100 °C. V bučko z molekularnimi siti smo natehtali 3 g (27,51 mmol) 2-aminofenola in ga raztopili v 20 mL absolutnega MeOH. Zmes smo prepihali z argonom. Dodali smo še 2,91 g (1 eq, 27,51 mmol, 2,8 mL) benzaldehida. Reakcijo smo mešali 48h pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija zaključena. Počasi smo dodali 1,16 g (1,6 eq, 44,01 mmol) NaBH₄ ter reakcijsko zmes pustili 1h pri sobni temperaturi, da je redukcija potekla do konca. S tankoplastno kromatografijo smo še enkrat preverili ali je reakcija potekla. Brezvodni metanol smo odparili pri znižanem tlaku. Nastali oborini smo dodali 30 mL prečiščene vode ter ekstrahirali z EtOAc (4 x 30 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo dvakrat prekristalizirali iz heksana in dobili sivo-bele kristale.

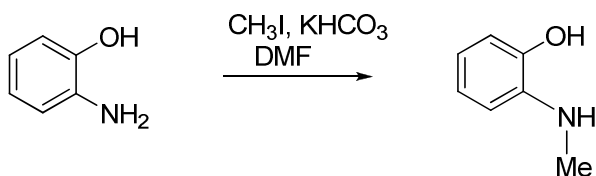
Izkoristek : 610 mg

11,1 %

R_f (heksan/EtOAc = 2:1) = 0,41

2-(Benzilamino)fenol		$M_r = 199,10$
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	belo-sivi kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,30 (d, 2H, $J = 6,12$ Hz, NH-CH ₂), 5,21 (t, 1H, $J = 6,09$, Ar-NH), 6,35 - 6,41 (m, 2H, Ar-H ^{4,6}), 6,53 (t, 1H, $J = 7,59$ Hz, Ar-H ⁵), 6,65 (dd, 1H, $J_1 = 1,68$ Hz, $J_2 = 7,95$ Hz, Ar-H ³), 7,18 - 7,24 (m, 1H, Ar-H ²), 7,28 - 7,36 (m, 4H, Ar-H ^{3-6'}), 9,22 (s br, 1H, Ar-OH)	
MS (ESI)	m/z (%) = 200 (100, MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3376, 3318, 3021, 2938, 2705, 2345, 1596, 1508, 1444, 1369, 1247, 747	
T_t	85-86 °C T _t po literaturi (43) : 88-89 °C	

4.1.6 Sinteza 2-(metilamino)fenola



30

Za sintezo spojine smo uporabili predpis (40).

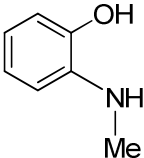
2 g (18,32 mmol) 2-aminofenola smo raztopili v 10 mL brezvodnega DMF. Dodali smo 1,9 g (19 mmol) KHCO₃. Po kapljicah smo dodajali 1,37 mL (3,12 g, 2,98 mmol) metiljodida. Reakcija je med mešanjem potekala 5h pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Reakcijski zmesi smo dodali 30 mL nasičene raztopine NaHCO₃ ter ekstrahirali z EtOAc (3 x 30 mL). Organsko fazo smo sprali z 20 mL nasičene raztopine NaCl in jo posušili z Na₂SO₄. EtOAc smo odparili pri znižanem tlaku. Ker spojina ni bila čista, smo jo prečistili s kromatografsko kolono

(MF:heksan/EtOAc = 3:1). Dobili smo bele kristale, ki so na zraku potemneli in postali zeleno – črne barve.

Izkoristek: 610 mg

27,1%

R_f (heksan/EtOAc = 3:1) = 0,28

2-(Metilamino)fenol		M_r = 123,07
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	zeleno-črni kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 2,69 (d, 3H, J = 1,8 Hz, NH-CH ₃), 4,22 (s br, 1H, NH-CH ₃) 6,40 - 6,43 (m, 2H, Ar-H ^{4,6}), 6,62 - 6,67 (m, 2H, Ar- H ^{5,3}), 9,15 (s br, 1H, OH)	
MS (ESI)	m/z (%) = 124 (100, MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3348, 2996, 2368, 1929, 1598, 1513, 1435, 1274, 748	
T_t	95-97 °C T _t po literaturi (40): 102-104 °C	

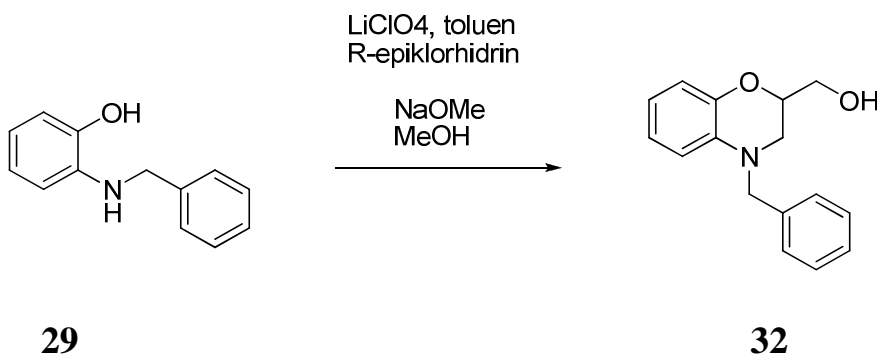
4.1.7 Poskus sinteze (*R*)-(4-metil-7-nitro-3,4-dihidro-2*H*-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola



Uporabili smo predpis (37), ki je opisan za sorodne spojine.

203 mg (1,2 mmol) spojine **13** smo dodali 6 mL toluena, 125 μ L (1,6 mmol) R-epiklorhidrina ter 165,6 mg (1,56 mmol) LiClO₄. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Dodali smo 1,2 mL MeOH ter 571 μ L (3 mmol) 30% NaOMe. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 48 h pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Toluena smo odparili pri znižanem tlaku. Dodali smo 30 mL nasičene raztopine NH₄Cl in vodno fazo ekstrahirali z EtOAc (3 x 30 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄, filtrirali ter topilo odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s postopkom reverzne kolonske kromatografije, vendar je ¹H-NMR spekter pokazal, da reakcija ni potekla in imamo samo izhodni produkt.

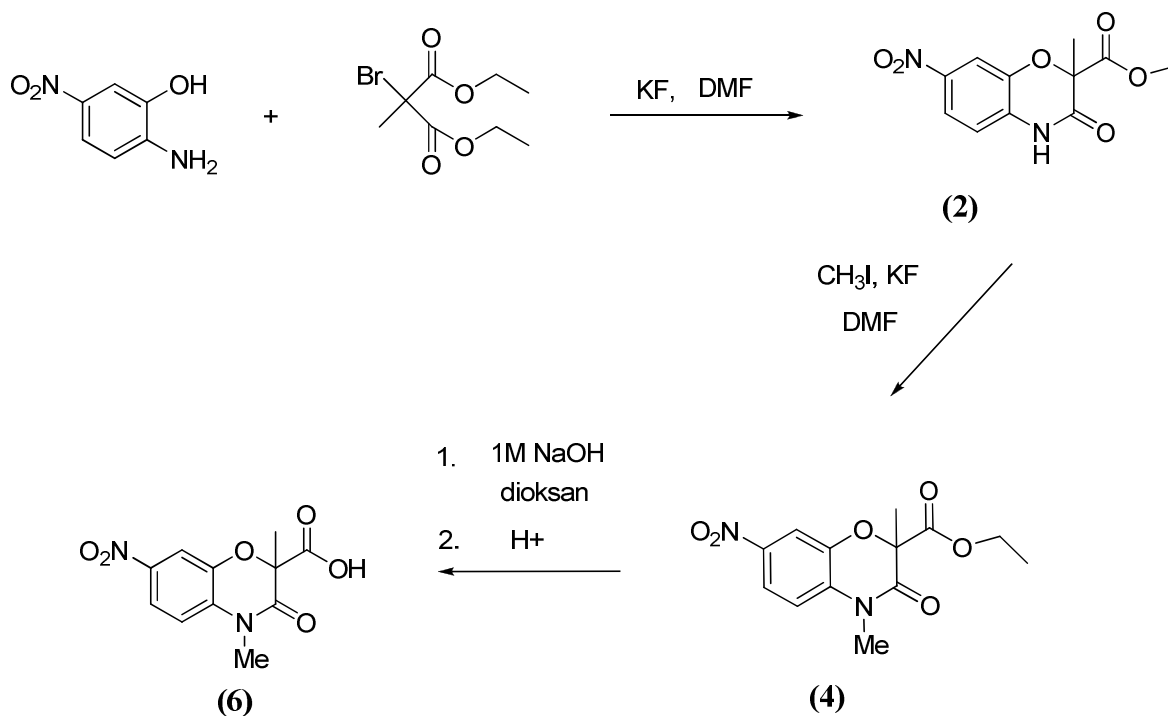
4.1.8 Poskus ponovitve sinteze (4-benzil-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola (**37**)



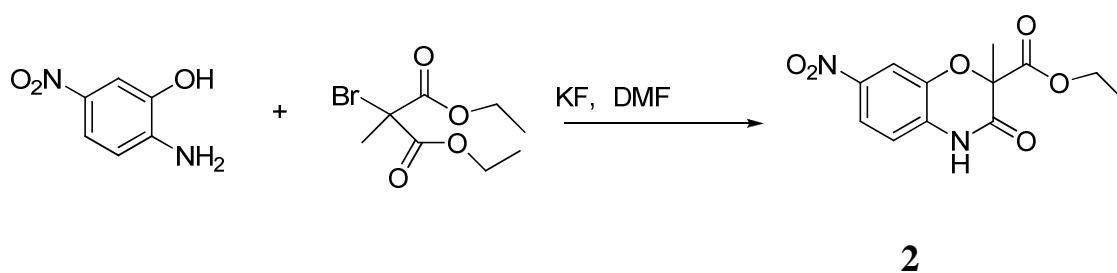
Za sintezo spojine smo uporabili predpis (**37**).

199 mg (1 mmol) spojine **29** smo raztopili v 5 mL toluena in zmes prepihali z argonom. Dodali smo še 102 μ L (1,3 eq, 1,3 mmol) R-epiklorhidrina in 138 mg (1,3 eq, 1,3 mmol) litijevega perklorata. Reakcijsko zmes smo 48h segrevali pri 50 °C. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija potekla. Dodali smo 1,3 mL MeOH in 135 mg (2,5 eq, 2,5 mmol, 471 μ L) 30% natrijevega metilata. Reakcijsko zmes smo segrevali 72h pri 50°C. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija potekla. Reakcijski zmesi smo dodali 30 mL nasičene raztopine NH₄Cl. Ekstrahirali smo z EtOAc (3 x 30 mL) in sprali z 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s kromatografsko kolono (MF: dietileter/heksan = 1:1). ¹H-NMR spekter ni bil takšen kot bi moral izgledati za končno spojino, zato smo zaključili da reakcija ni potekla.

4.2 POSKUS SINTEZE PREKURZORJEV ČISTIH ENANTIOMEROV 7-NITROBENZOKSAZINOV



4.2.1 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro -2-metil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline 2.



Za sintezo spojine smo uporabili predpis (38).

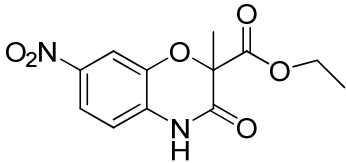
32,84 g (129,7 mmol) dietil-2-bromo-2-metilmalonata in 15,10 g (260,0 mmol) kalijevega fluorida smo suspendirali v 200 mL DMF-a ter mešali 15 min pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 20 g (129,7 mmol) 5-nitro-2-amino-fenola, suspenzijo segreli na 60 °C ter reakcijo ob mešanju pustili poteči čez noč. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali

je reakcija končana. Vsebino bučke smo zlili na zmes led/voda (260 g) in odfiltrirali nastali produkt. Po sušenju v sušilniku pri 100 °C preko noči smo dobili temno rjave kristale.

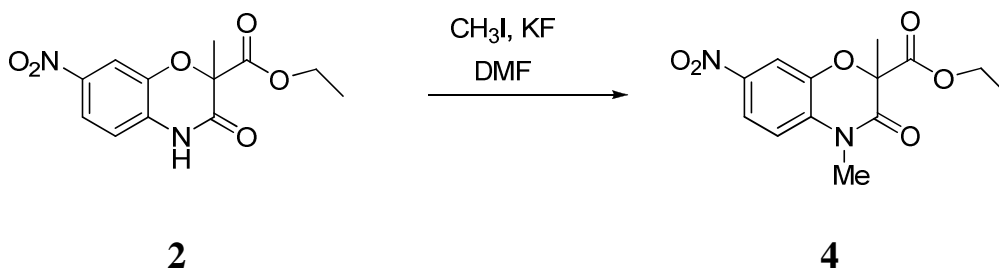
Izkoristek: 29,71 g

81,7 %

R_f (DKM/MeOH = 20:1) = 0,46

<i>Etilni ester 3,4-dihidro -2-metil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline</i>		M_r = 280,23
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	temno rjavi kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,07 (t, 3H, J = 7,08 Hz, CH ₃ CH ₂), 1,76 (s, 3H, CH ₃ -C) 4,13 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 7,10 (d, 1H, J = 8,76 Hz, Ar-H ⁵), 7,83 (d, 1H, J = 2,46 Hz, Ar-H ⁸), 7,95 (dd, 1H, J ₁ = 8,73 Hz, J ₂ = 2,49 Hz, Ar-H ⁶), 11,59 (s, 1H, NH)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3460, 3211, 2344, 1740, 1700, 1527, 1345, 1262, 1120	
T_t	190-193 °C T _t lit. (38) : 194-195 °C	

4.2.2 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro -2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline



Za sintezo smo uporabili predpis (44).

29,41 g (104,96 mmol) spojine **2** in 12,2 g (209,91 mmol) kalijevega fluorida smo suspendirali v 150 mL DMF. Po 15 min mešanja smo dodali 17,88 g (125,95 mmol) metiljodida in reakcijsko zmes pri sobni temperaturi mešali čez noč. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija že končana. Vsebino bučke zlili na zmes led/voda (200 g), spojino odfiltrirali ter še dvakrat prekristalizirali iz metanola. Dobili smo spojino rjave barve.

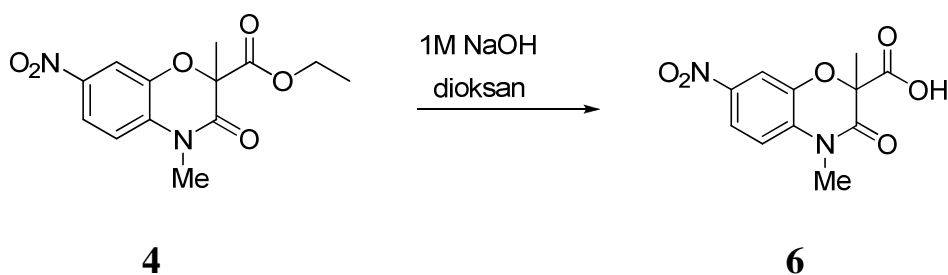
Izkoristek: 21,08 g

68,8 %

R_f (DKM/MeOH = 20:1) = 0,84

<i>Etilni ester 3,4-dihidro -2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline</i>		$M_r = 294,26$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	rjavi kristali	
Analiza	Rezultati	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,06 (t, 3H, $J_1 = 7,08$, CH_3CH_2), 1,79 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 3,42 (s, 3H, C-CH_3), 4,08 - 4,12 (q, 2H, CH_3CH_2), 7,32 (d, 1H, $J = 9,27$ Hz, Ar- H^5), 7,98 (s, 2H, Ar- H^6), 8,01 (d, 1H, $J = 2,46$ Hz, Ar- H^8)	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3461, 3094, 2905, 2367, 1744, 1683, 1521, 1474, 1346, 1151	
T_t	104-109 °C T_t po literaturi (44): 101-103°C	

4.2.3 Sinteza 3,4-dihidro-2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline (41)



Za sintezo smo uporabili predpis (44).

Natehtali smo 10,0 g (33,98 mmol) spojine **4** in jo raztopili v 100 mL dioksana. Dodali smo 50,95 mL (50,97 mmol) 1M NaOH in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 48h. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija potekla. Po končani reakciji smo dioksan odparili pri znižanem tlaku in produktu dodali 100 mL destilirane

vode. Ekstrahirali smo z EtOAc (2 x 50 mL). Vodno fazo smo nakisali z 1M HCl do pH = 1. Oborino smo odfiltrirali in produkt sušili pri 50 °C čez noč.

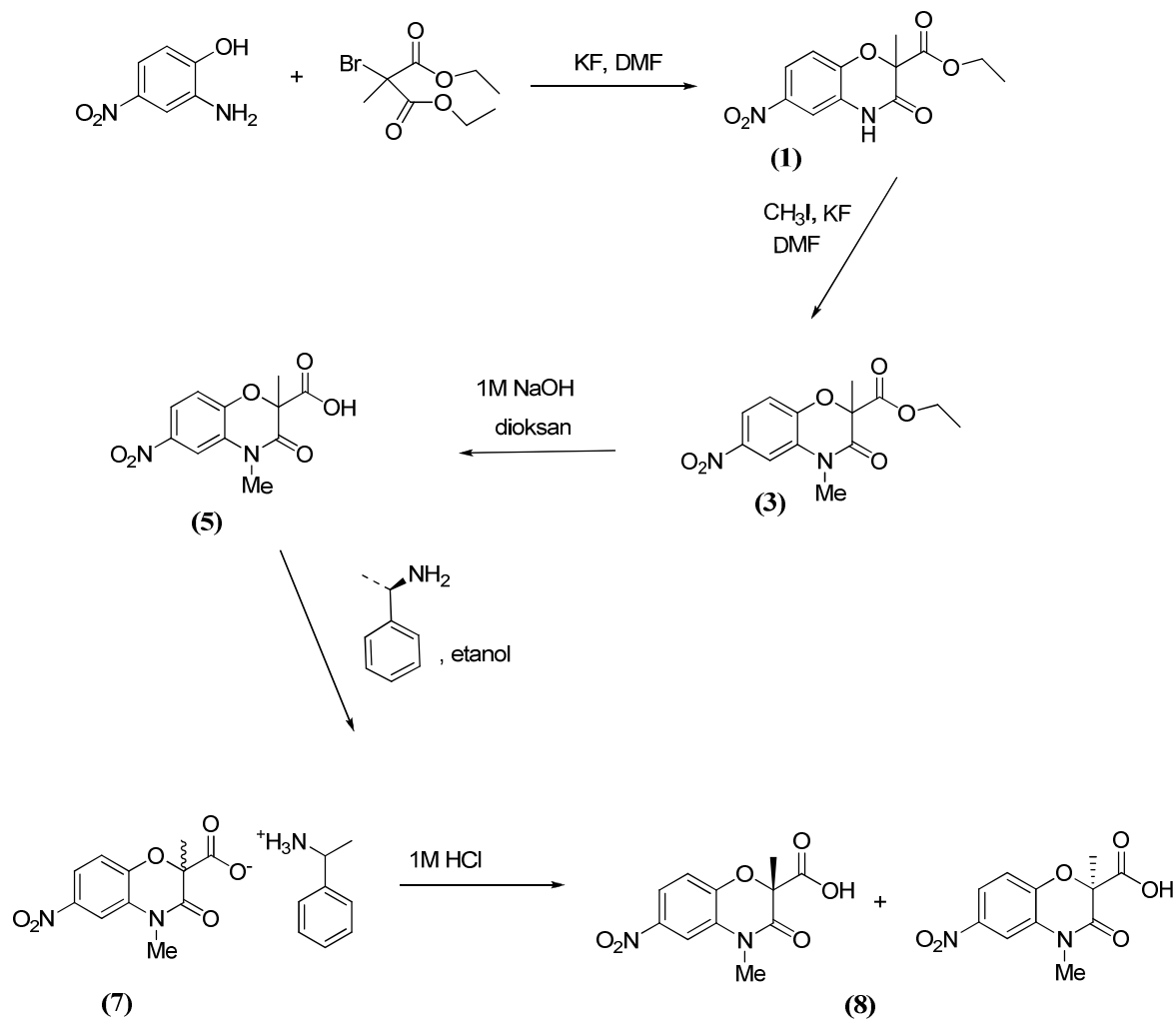
Izkoristek: 9,08 g

98 %

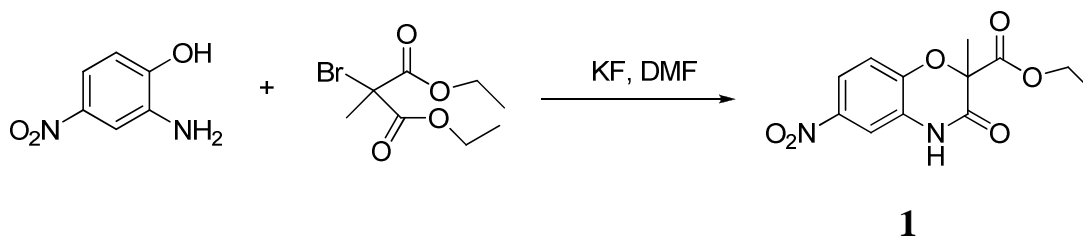
Rf (DKM/MeOH = 20:1) = 0

3,4-Dihidro -2,4-dimetil-7-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilna kislina		$M_r = 266,26$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	rjavi kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,77 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$), 3,41 (s, 3H, N-CH_3), 7,29 (d, 1H, $J = 9,63$ Hz, Ar- H^5), 7,96 (m, 1H, Ar- H^8), 7,98 (s, 1H, Ar- H^6)	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3504, 3455, 3097, 2505, 1918, 1734, 1688, 1527, 1343, 1268, 1129	
T_t	160-161 °C T _t po literaturi (44) : 158-160 °C	

4.3 POSKUS SINTEZE PREKURZORJEV ČISTIH ENANTIOMEROV 6-NITROBENZOKSAZINOV Z RESOLUCIJO



4.3.1 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro-2-metil-6-nitro-3-okso-2*H*-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline



Za sintezo spojine smo uporabili predpis (38).

32,84 g (129,77 mmol) dietil-2-bromo-2-metilmalonata in 15,10 g (260,00 mmol) kalijevega fluorida smo suspendirali v 200 mL DMF ter mešali 15 min pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 20,00 g (129,76 mmol) 4-nitro-2-amino-fenola in segreli suspenzijo na 60 °C ter reakcijo pustili poteči čez noč. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Vsebino bučke smo zlili na zmes led/voda (250 g) in nastali produkt odfiltrirali. Po sušenju v sušilniku pri 100 °C preko noči smo dobili oker kristale.

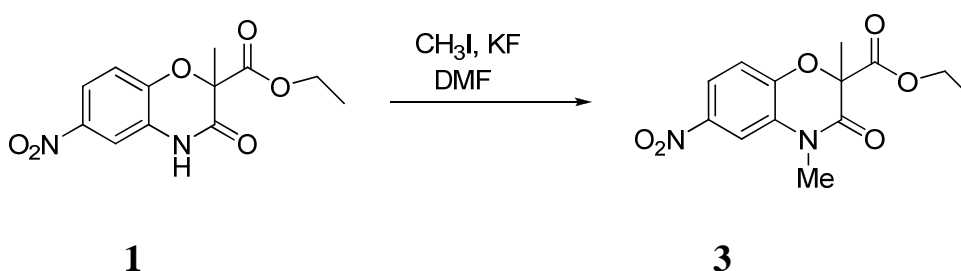
Izkoristek: 35,5 g

97,0 %

R_f (DKM/MeOH = 20:1) = 0,47

Etilni ester 3,4-dihidro -2-metil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline		$M_r = 280,23$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	oker kristale	
Analiza	Rezultati	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,08 (t, 3H, $J = 7,08$, CH_3CH_2), 1,76 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$) 4,12 - 4,14 (m, 2H, CH_3CH_2), 7,25 (d, 1H, $J = 8,91$ Hz, Ar- H^8), 7,76 (d, 1H, $J = 2,55$ Hz, Ar- H^5), 7,89 (dd, 1H, $J_1 = 8,90$ Hz, $J_2 = 2,58$ Hz, Ar- H^7), 11,36 (s, 1H, NH)	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3478, 3198, 3098, 2898, 2414, 1748, 1695, 1605, 1510, 1339, 1236, 825	
T_t	195-197 °C T_t po literaturi (38): 192-194 °C	

4.3.2 Sinteza etilnega estra 3,4-dihidro -2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline



Za sintezo spojine smo uporabili predpis (44).

35,00 g (124,8 mmol) spojine **1** in 14,52 g (249,78 mmol) kalijevega fluorida smo suspendirali v 150 mL DMF-a. Po 15 min mešanja smo dodali 21,30 g (149,8 mmol) metiljodida in reakcijo mešali čez noč pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Po končani reakciji smo vsebino bučke zlili na zmes

led/voda (200 g). Spojino smo odfiltrirali ter še dvakrat prekrizalzirali iz metanola. Dobili smo spojino oker barve.

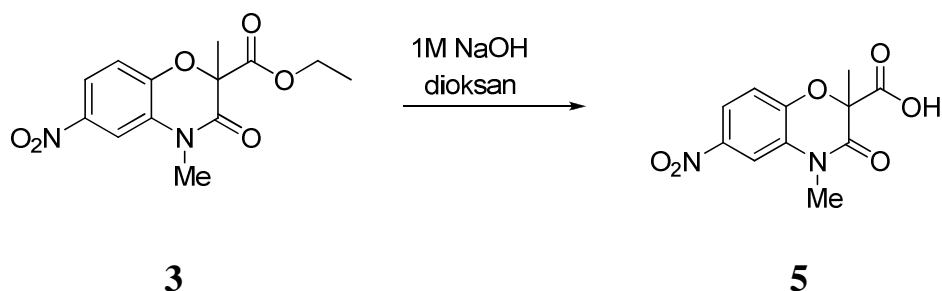
Izkoristek: 29,37 g

79,9 %

R_f (DKM/MeOH = 20:1) = 0,87

<i>Etilni ester 3,4-dihidro -2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline</i>		M_r = 294,26
Struktura spojine:		
Izgled spojine	oker kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,05 (t, 3H, $J = 7,08$, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2}$), 1,78 (s, 3H, $\underline{\text{CH}_3\text{-C}}$), 3,40 (s, 3H, C- $\underline{\text{CH}_3}$), 4,08 - 4,12 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2}$), 7,43 (d, 1H, $J = 8,82$ Hz, Ar- H ⁸), 7,87 (d, 1H, $J = 2,52$ Hz, Ar-H ⁵) 8,02 (dd, 2H, $J_1 = 8,94$ Hz, $J_2 = 2,55$ Hz, Ar- H ⁷ .)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3482, 3383, 3088, 2942, 2652, 2410, 1751, 1699, 1506, 1341, 1244, 1126	
T_t	107-109 °C T _t po literaturi (44): 101-103 °C	

4.3.3 Sinteza 3,4-dihidro -2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline



Za sintezo spojine smo uporabili predpis (38), ki je opisan za sorodne spojine.

Natehtali smo 10,00 g (33,98 mmol) spojine **3** in jo raztopili v 100 mL dioksana. Dodali smo 50,95 mL (50,97 mmol) 1M NaOH in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 48h. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija potekla. Po končani reakciji smo pri znižanem tlaku odparili dioksan in produktu dodali 100 mL destilirane vode. Ekstrahirali smo z EtOAc (2 x 50 mL). Vodno fazo smo nakisali z 1M HCl do pH = 1. Oborino smo odfiltrirali in produkt sušili pri 50 °C čez noč.

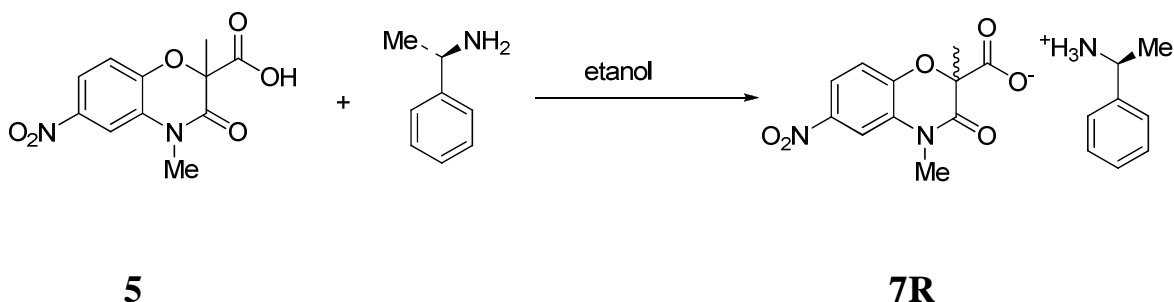
Izkoristek: 8,6 g

95,9 %

R_f (DKM/MeOH = 20:1) = 0

3,4-Dihidro -2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline		$M_r = 266,26$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	oker kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,76 (s, 3H, $\underline{\text{CH}_3\text{-C}}$), 3,40 (s, 3H, N- $\underline{\text{CH}_3}$), 7,41 (d, 1H, $J = 8,97$ Hz, Ar- H^8), 7,84 (d, 1H, $J = 2,55$ Hz, Ar- H^5), 8,04 (dd, 2H, $J_1 = 2,55$ Hz $J_2 = 8,97$ Hz, Ar- H^7 ,)	
MS (ESI)	m/z (%) = 265 (45, MH ⁺), 193 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3568, 2929, 2605, 2501, 1959, 1706, 1600, 1501, 1374, 1260, 1156	
T_t	135-137 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izračunano	Izmerjeno
	C 49,63 %	C 49,35 %
	H 3,79 %	H 3,89 %
	N 10,52 %	N 10,45 %

4.3.4 Poskus resolucije 1-feniletilamino- 3,4-dihidro -2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilata



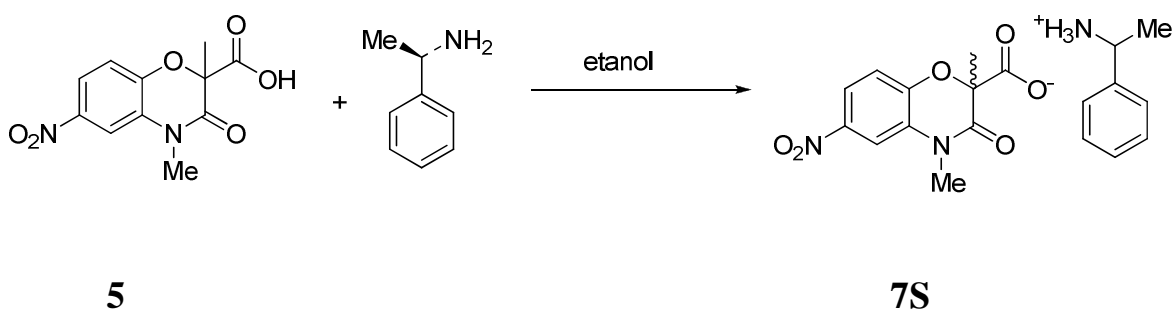
Za sintezo smo uporabili predpis (39), ki je opisan za sorodne spojine.

500 mg (1,88 mmol) spojine **5** smo raztopili v 30 mL brezvodnega EtOH. Dodali smo 240 μL (1eq, 1,88 mmol) *R*-1-feniletilamina. Pri sobni temperaturi smo reakcijsko zmes mešali

čez noč. Nastalo oborino smo odfiltrirali in pomerili specifično sučnost $[\alpha]_D = +3,4$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Spojino smo prekrizalzirali iz brezvodnega EtOH in še enkrat pomerili specifično sučnost $[\alpha]_D = +5,6$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Ponovno smo prekrizalzirali iz brezvodnega EtOH in pomerili specifično sučnost $[\alpha]_D = +5,3$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$).

Izkoristek: 480 mg

66,0 %



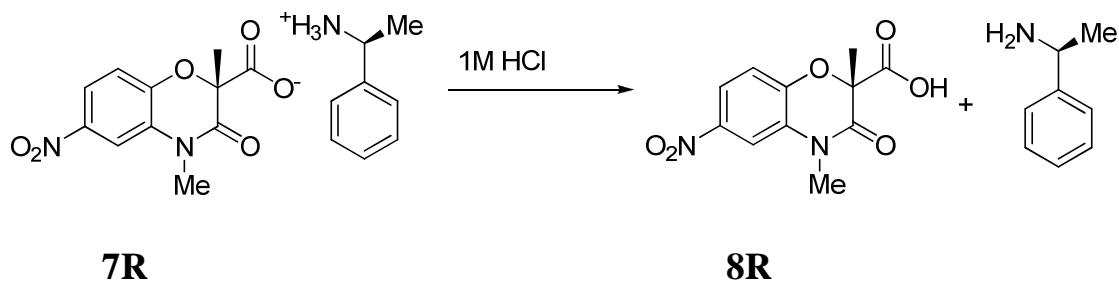
Za sintezo smo uporabili predpis (39), ki je opisan za sorodne spojine.

500,00 mg (1,88 mmol) spojine 5 smo raztopili v 23 mL brezvodnega EtOH. Dodali smo 240 μ L (1eq, 1,88 mmol) *S*-1-feniletilamina. Pri sobni temperaturi smo reakcijsko zmes mešali čez noč. Nastalo oborino smo odfiltrirali in pomerili sučnost $[\alpha]_D = -1,25$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Spojino smo prekrizalzirali iz brezvodnega EtOH in še enkrat pomerili specifično sučnost $[\alpha]_D = -6,4$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Ponovno smo prekrizalzirali iz brezvodnega EtOH in pomerili specifično sučnost $[\alpha]_D = -6,2$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$).

Izkoristek: 497 mg

68,0 %

4.3.5 Poskus sinteze čistega enantiomera 3,4-dihidro -2,4-dimetil-6-nitro-3-okso-2H-1,4-benzoksazin-2-karboksilne kisline



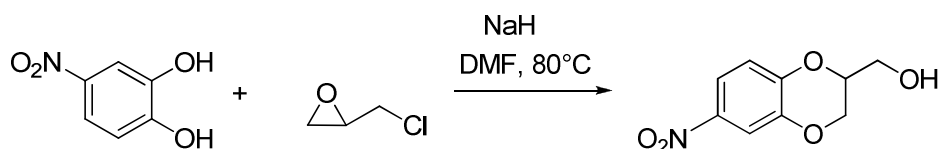
Za sintezo smo uporabili predpis (39), ki je opisan za sorodne spojine.

220,00 mg (0,56 mmol) spojine **7R** smo dodali približno 30 mL vode, da se je sol raztopila. Nakisali smo z 1M HCl do pH = 1. Ker se oborina ni takoj pojavila, samo ekstrahirali z EtOAc (3 x 20 mL) in organsko fazo odparili pri znižanem tlaku. Pomerili smo specifično sučnost, ki je bila $[\alpha]_D = +4,7$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$).

180,00 mg (0,48 mmol) spojine **7S** smo dodali 32 mL vode in nakisali do pH = 1 z 1M HCl. Raztopino smo pustili stati čez noč, da je izpadla oborina, ki smo jo nato odfiltrirali, posušili z vodno črpalko in pomerili sučnost $[\alpha]_D = +5,8$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Kar je ostalo v raztopini voda/HCl, smo ekstrahirali z EtOAc (2 x 20 mL), topilo odparili pri znižanem tlaku in oborini pomerili sučnost, ki je bila $[\alpha]_D = +3,9$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$).

4.4 SINTEZA SPOJIN Z BENZO[b][1,4]DIOKSINSKIM SKELETOM

4.4.1 Sinteza (6-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metanola



1,7 g (93,6 mmol) 80% natrijevega hidrida smo suspendirali v 40 mL DMF. Pri temperaturi 0 °C smo dodali 6,00 g (38,68 mmol) 4-nitrokatehola v 10 mL DMF v intervalu 15 minut. Dodali smo raztopino 4,55 mL epiklorhidrina (1,5 eq, 58,01 mmol, 5,37 g) v 10 mL DMF v intervalu 15 minut. Reakcijsko zmes smo mešali 1h pri sobni temperaturi in čez noč pri 80 °C. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Reakcijski zmesi smo dodali 75 mL vode in ekstrahirali z EtOAc (4 x 50 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo prečistili s kromatografsko kolono (MF: DKM/MeOH = 9:1). Dobili smo snov rumeno – bele barve.

Izkoristek: 4,61 g

56,4 %

R_f (DKM/MeOH = 9:1) = 0,46

(6-Nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metanol		$M_r = 211,17$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	drobni rumeno-beli kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,97 (s br, 1H, CH ₂ OH), 3,92 - 3,97 (m, 2H, CH ₂ -OH), 4,18 - 4,22 (m, 1H, -O-CH-), 4,36 - 4,43 (m, 2H, CH ₂ -O-), 6,99 (m, 1H, Ar-H ⁸), 7,81 (m, 2H, $J_1 = 7,0$ Hz, $J_2 = 2,76$ Hz, Ar-H ⁵ , Ar-H ⁷)	
MS (ESI)	m/z (%) = 212 (40, MH ⁺), 193 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3432, 3048, 2925, 2345, 1700, 1521, 1342, 1047, 885	
T_t	135-136 °C T _t po literaturi (45): 124-125 °C	

4.4.2 Sinteza (7-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metanola



P10

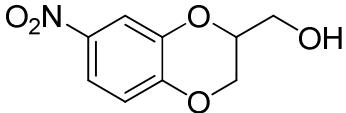
3,57 g (1,1eq, 42,55 mmol) natrijevega hidrogenkarbonata smo suspendirali v 50 mL DMF. Pri 0 °C smo dodajali raztopino 6,00 g (38,67 mmol) 4-nitrokatehola v 10 mL DMF v intervalu 15 minut. Dodajali smo raztopino 3,85 mL (49,11 mmol, 4,55 g) epiklorhidrina v 10 mL DMF v intervalu 15 minut. Reakcijsko zmes smo mešali 1h pri sobni temperaturi. in čez noč pri 80 °C. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Reakcija še ni popolnoma potekla, zato smo dodali še 3,00 mL (38,27 mmol) epiklorhidrina in pustili reakcijsko zmes segrevati pri 80 °C še 24h. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija že potekla. Reakcijski zmesi smo dodali 150 mL vode in ekstrahirali z EtOAc (4 x 75 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s kromatografsko kolono (MF:

DKM/MeOH = 9:1). Še vedno nismo dobili popolnoma čistih frakcij, zato smo še enkrat prečistili s kromatografsko kolono (MF: DKM/MeOH = 30:1) Dobili smo snov rumeno – bele barve.

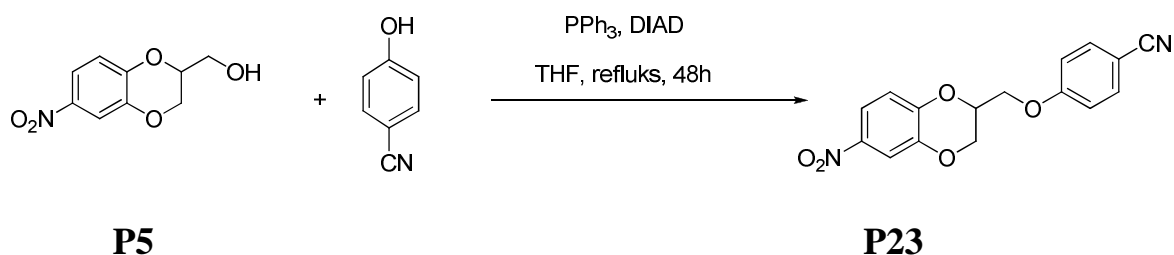
Izkoristek: 5,13 g

62,8 %

R_f (DKM/MeOH = 9:1) = 0,45

7-Nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metanol		M_r = 211,17
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	drobni rumeno-beli kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,98 (m, 1H, CH ₂ OH), 3,83 - 4,02 (m, 2H, CH ₂ -OH), 4,18 - 4,46 (m, 3H, -O-CH ₂ -CH-O-), 6,96 (dd, 1H, J ₁ = 9,07 Hz, J ₂ = 3,09 Hz, Ar-H ⁶), 7,79 - 7,83 (m, 2H, Ar-H ⁸ , Ar-H ⁵)	
MS (ESI)	m/z (%) = 212 (37, MH ⁺), 196 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3307, 3104, 2927, 2035, 1898, 1594, 1510, 1333, 1277, 1062, 1021, 880	
T_t	114-115 °C T _t po literaturi (45) ni podana	

4.4.3 Sinteza 4-((6-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila



4,61 g (21,80 mmol) spojine **P5** smo raztopili v 100 mL brezvodnega THF. Reakcijski zmesi smo na ledeni kopeli dodali 2,86 g (1,1eq, 23,98 mmol) 4-cianofenola in 11,45 g (2 eq, 43,81 mmol) trifenilfosfina. Bučko smo prepihali z argonom. Pri 0 °C smo po kapljicah dodali 8,69 mL (2eq, 43,81 mmol) DIAD v brezvodnem THF. Raztopino smo mešali 30 minut pri 0 °C in nato segrevali 48 h pod refluksom. THF smo odparili pri znižanem tlaku, spojino očistili s kromatografsko kolono (MF: heksan/EtOAc = 2:1) in jo prekristalizirali iz metanola. Spojino smo še enkrat očistili s kromatografsko kolono (MF: petroleter/EtOAc = 2:1). Dobili smo lepljivo snov rumene barve.

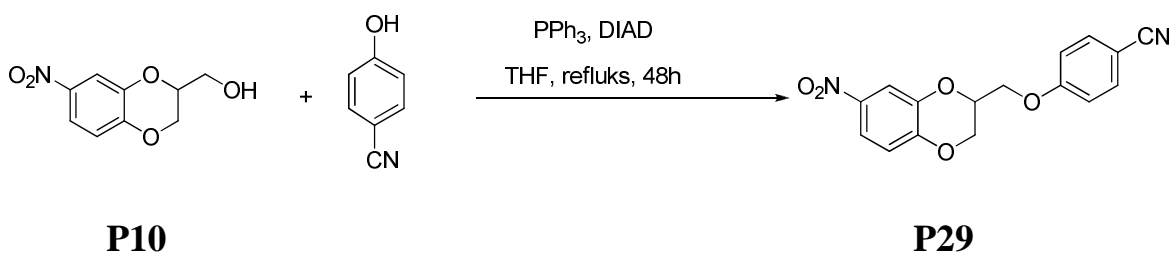
Izkoristek: 2,01 g

26,85 %

R_f (MF: petroleter/EtOAc = 2:1) = 0,26

4-((6-Nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitril		$M_r = 312,28$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	rumena snov amorfnega izgleda	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,39 - 4,44 (m, 3H, $\underline{\text{CH}_2\text{-O-}}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-O-}}$), 4,58 (dd, 1H, $J_1 = 11,77$ Hz, $J_2 = 2,52$ Hz, -O-CH), 4,80 - 4,82 (m, 1H, $\underline{\text{CH}_2\text{-O-}}$), 7,18 (m, 3H, Ar-H ² , Ar-H ⁶ , Ar-H ⁸), 7,79 - 7,85 (m, 4H, Ar-H ³ , Ar-H ⁵ , Ar-H ⁵ , Ar-H ⁷)	
MS (ESI)	m/z (%) = 313 (85, MH ⁺), 77 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3432, 2345, 2221, 1724, 1605, 1517, 1339, 1252, 1043, 885	
T_t	149-151 °C	
Elementna analiza (CHN) (C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₅ × 2/5 H ₂ O)	Izračunano	Izmerjeno
	C 61,54 %	C 60,29 %
	H 3,87 %	H 4,26 %
	N 8,97 %	N 9,21 %

4.4.4 Sinteza 4-((7-nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila



5,31 g (25,22 mmol) spojine **P10** smo raztopili v 100 mL brezvodnega THF. Reakcijski zmesi smo na ledeni kopeli dodali 3,3 g (1,1eq, 27,7 mmol) 4-cianofenola in 13,2 g (2 eq, 50,4 mmol) trifenilfosfina. Bučko smo prepihali z argonom. Pri 0 °C smo po kapljicah dodali 10,0 mL (2eq, 40,4 mmol) DIAD v brezvodnem THF. Reakcijsko zmes smo mešali

30 minut pri 0 °C in nato segrevali 48 h pod refluksom. THF smo odparili pri znižanem tlaku, spojino očistili s kromatografsko kolono (MF: heksan/EtOAc = 2:1) in jo prekristalizirali iz metanola. Dobili smo lepljivo snov rumene barve.

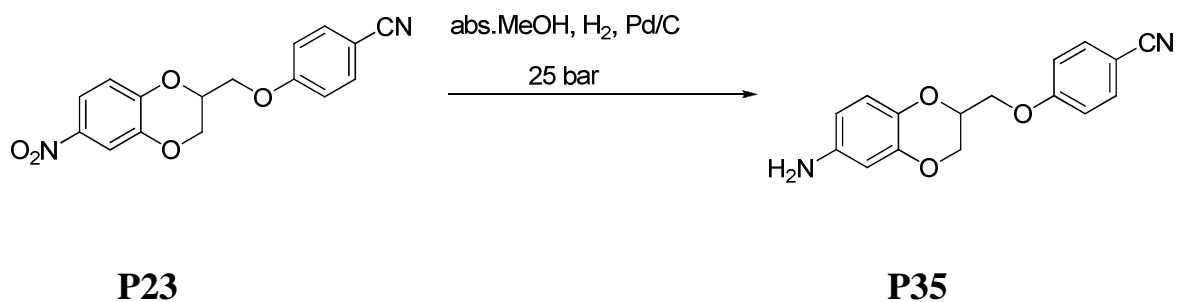
Izkoristek: 1,5 g

17,3 %

R_f (MF: petroleter/EtOAc = 2:1) = 0,26

4-((7-Nitro-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitril		M_r = 312,28
Struktura spojine:		
Izgled spojine	rumena snov amorfnega izgleda	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,29 - 4,47 (m, 3H, <u>CH</u> ₂ -O-, CH ₂ -O), 4,59 (dd, 1H, J ₁ = 11,72 Hz, J ₂ = 2,46 Hz, -O- <u>CH</u> ₂ -), 4,73 - 4,75 (m, 1H, <u>CH</u> -O-), 7,14 - 7,19 (m, 3H, Ar-H ² , Ar-H ⁵ , Ar-H ⁶), 7,77 - 7,82 (m, 4H, Ar-H ⁵ , Ar-H ³ , Ar-H ⁶ , Ar-H ⁸)	
MS (ESI)	m/z (%) = 77 (50), 313 (100, MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3422, 3102, 2940, 2666, 2345, 2225, 1733, 1605, 1516, 1349, 1255, 998, 838	
T_t	141-143 °C	
Elementna analiza (CHN) (C₁₆H₁₂N₂O₅ × 1/3 H₂O)	Izračunano	Izmerjeno
	C 61,54 %	C 60,68 %
	H 3,87 %	H 4,26 %
	N 8,97 %	N 9,16 %

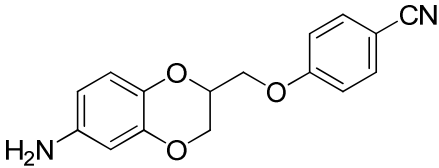
4.4.5 Sinteza 4-((6-amino-2,3-dihidrobenzo[*b*][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila



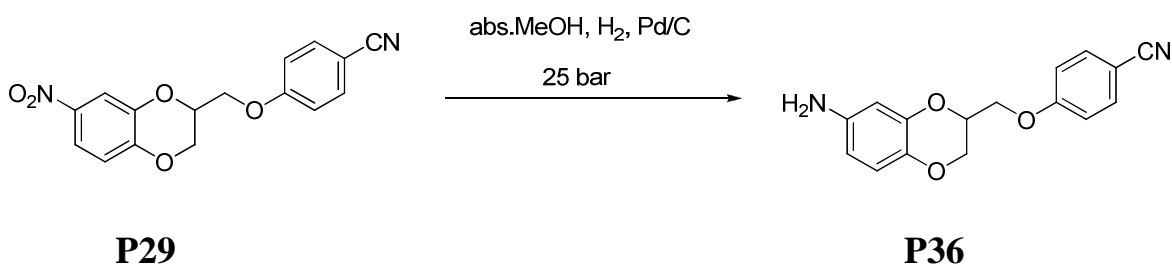
1,50 g (4,55 mmol) spojine **P23** smo dodali približno 30 mL brezvodnega MeOH ter konico žličke Pd/C. Reakcijo smo pustili potekati 2h pri 25 bar in nastali produkt filtrirali skozi celit. Brezvodni MeOH smo odparili pri znižanem tlaku. Dobili smo belo-rumeno spojino.

Izkoristek: 1,16 g

90,5 %

4-((6-Amino-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitril		M_r = 282,29
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	drobni belo-rumeni kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 3,99 - 4,38 (m, 4H, <u>CH₂-O</u> , <u>CH₂-O</u>), 4,48 - 4,55 (m, 1H, CH), 4,67 (s, 2H, NH ₂), 6,08 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,48 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,57 Hz, Ar-H ⁷), 6,12 (d, 1H, <i>J</i> = 2,54 Hz, Ar-H ⁵), 6,57 (d, 1H, <i>J</i> = 8,48 Hz, Ar-H ⁸), 7,18 (d, 2H, <i>J</i> = 9,01 Hz, Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,79 (d, 2H, <i>J</i> = 9,01 Hz, Ar-H ³ , Ar-H ⁵)	
MS (ESI)	m/z (%) = 283 (100 MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3437, 3289, 3034, 2880, 2365, 2220, 1606, 1507, 1306, 1260, 1172, 830	
T_t	87-93 °C	
Elementna analiza (CHN) (C₁₆H₁₄N₂O₃ × 1/8 H₂O)	Izračunano C 68,07 % H 5,00 % N 9,92 %	Izmerjeno C 67,60 % H 6,00 % N 10,09 %

4.4.6 Sinteza 4-((7-amino-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila

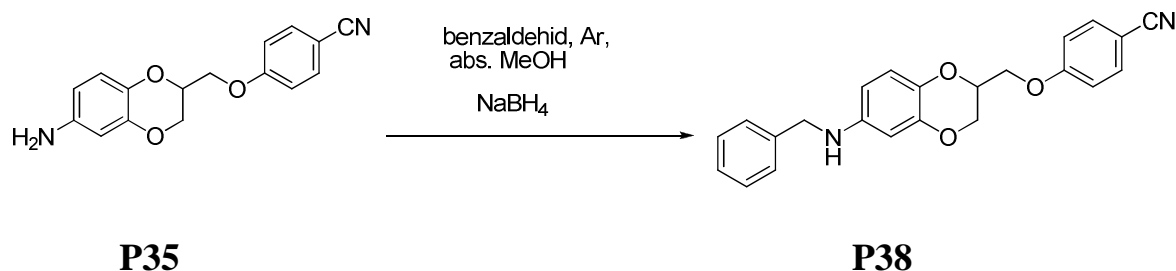


1,5 g (4,5 mmol) spojine **P29** smo dodali približno 30 mL brezvodnega MeOH ter konico žličke Pd/C. Reakcijo smo pustili potekati 2h pri 25 bar in produkt filtrirali skozi celit. Brezvodni MeOH smo odparili pri znižanem tlaku. Dobili smo belo-rumeno spojino.

Izkoristek: 1,2 g
95,2%

4-((7-Amino-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitril		$M_r = 282,29$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	drobni belo-rumeni kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,01 - 4,38 (m, 4H, $\underline{\text{CH}_2\text{-O}}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-O}}$), 4,40 - 4,47 (m, 1H, CH), 4,67 (s, 2H, NH ₂), 6,09 (dd, 1H, $J_1 = 8,47$ Hz, $J_2 = 2,58$ Hz, Ar-H ⁶), 6,13 (d, 1H, $J = 2,53$ Hz, Ar-H ⁸), 6,58 (d, 1H, $J = 8,48$ Hz, Ar-H ⁵), 7,17 (d, 2H, $J = 9,01$ Hz, Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,79 (d, 2H, $J = 9,62$ Hz, Ar-H ³ , Ar-H ⁵)	
MS (ESI)	m/z (%) = 283 (100 MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3459, 3368, 2978, 2933, 2364, 2345, 2219, 1605, 1507, 1305, 1253, 1216, 820	
T_f	125-128 °C	
Elementna analiza (CHN) (C₁₆H₁₄N₂O₃ × 1/2 H₂O)	Izračunano	Izmerjeno
	C 68,07 %	C 67,30 %
	H 5,00 %	H 5,41 %
	N 9,92 %	N 9,51 %

4.4.7 Sinteza 4-((6-(benzilamino)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila

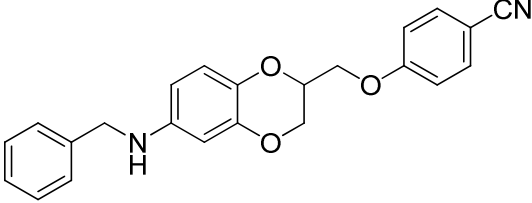


Molekularna sita velikosti 2Å smo aktivirali 2h pri 100 °C. 1,16 g (4,12 mmol) spojine **P35** smo raztopili v 50 mL brezvodnega MeOH. Bučko smo napolnili z argonom. Dodali smo 626 µL (1,5 eq, 6,17 mmol) benzaldehida. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Dodali smo 248,8 mg (1,6 eq, 6,6 mmol) NaBH₄. Še enkrat smo s tankoplastno kromatografijo preverili ali je reakcija potekla. Brezvodni MeOH smo odstranili pri znižanem tlaku. V bučko smo dodali 100 mL EtOAc ter ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 50 mL) in 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in EtOAc odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo rumeno oborino.

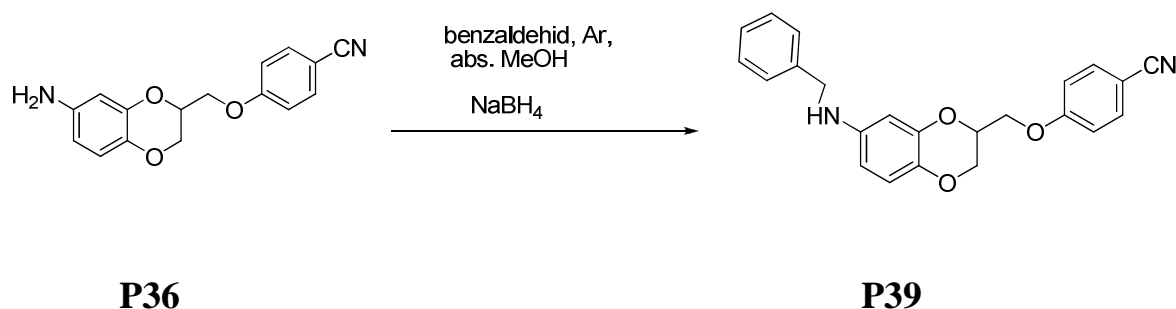
Izkoristek: 1,46 g

95,3 %

R_f (petrol eter/EtOAc = 1:1) = 0,5

4-((6-(Benzilamino)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-2-yl)metoksi)benzonitril		M_r = 372,42
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	drobni rumeni kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,16 (m, 1H, <u>CH₂-O</u>), 4,19 (d, 2H, J = 6,0 Hz, <u>CH₂-Ph</u>), 4,22 - 4,49 (m, 4H, <u>CH₂-O</u> -, <u>CH₂-O</u> -, <u>CH</u>), 5,12 (t, 1H, J = 5,73 Hz, <u>NH</u>), 5,99 - 6,12 (m, 2H, Ar-H ⁵ , Ar-H ⁷), 6,61 (d, 1H, J = 8,42 Hz, Ar-H ⁸), 7,14 - 7,18 (m, 2H, Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,19 - 7,22 (m, 5H, Ph), 7,77 (d, 2H, J = 8,62 Hz, Ar-H ³ , Ar-H ⁵)	
MS (ESI)	m/z (%) = 283 (60), 373 (100 MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3420, 3019, 2937, 2344, 2227, 1604, 1508, 1250, 1042, 838	
T_f	107-110 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izračunano	Izmerjeno
	C 74,18 %	C 74,32 %
	H 5,41 %	H 5,60 %
	N 7,52 %	N 7,32 %

4.4.8 Sinteza 4-((7-(benzilamino)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitrila



Molekularna sita velikosti 2Å smo aktivirali 2h pri 100 °C. 1,22 g (4,32 mmol) spojine **P36** smo raztopili v 50 mL brezvodnega MeOH. Bučko smo napolnili z argonom. Dodali smo 660 µL (1,5 eq, 6,48 mmol) benzaldehida. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Dodali smo 261,27 mg (1,6 eq, 6,51 mmol) NaBH₄. S tankoplastno kromatografijo smo še enkrat preverili ali je reakcija potekla. Brezvodni MeOH smo odstranili pri znižanem tlaku. V bučko smo dodali 100 mL EtOAc ter ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 50 mL) in 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in EtOAc smo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo rumeno oborino.

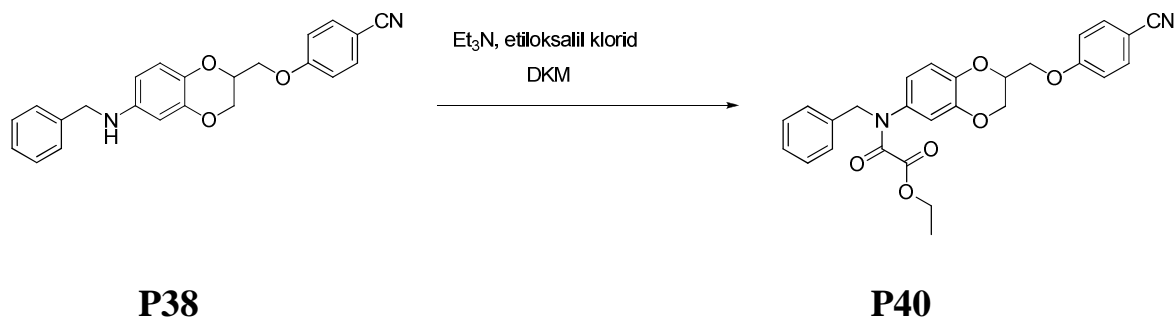
Izkoristek: 1,40 g

91,0 %

R_f (petrol eter/EtOAc = 1:1) = 0,55

4-((7-(Benzilamino)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-2-il)metoksi)benzonitril		M_r = 372,42																
Struktura spojine:																		
Izgled spojine	rumena talina																	
Analiza	Rezultati																	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 3,99 - 4,01 (m, 1H, <u>CH₂-O</u>), 4,04 - 4,07 (m, 2H, <u>CH₂-Ph</u>), 4,25 - 4,30 (m, 4H, <u>CH₂-O-</u> , <u>CH₂-O-</u> , <u>CH</u>), 5,08 (t, 1H, $J = 6,12$ Hz, <u>NH</u>), 6,00 - 6,08 (m, 2H, Ar-H ⁶ , Ar-H ⁸), 6,13 (d, 1H, $J = 8,52$ Hz, Ar-H ⁵), 7,16 (d, 2H, $J = 8,68$ Hz, Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,21 - 7,24 (m, 5H, Ph), 7,77 (d, 2H, $J = 8,59$ Hz, Ar-H ³ , Ar-H ⁵)																	
MS (ESI)	m/z (%) = 373 (100 MH ⁺)																	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3855, 3394, 2927, 2345, 2224, 1605, 1508, 1256, 1216, 1173, 1113, 834																	
T_t	/																	
Elementna analiza (CHN)	<table border="0"> <thead> <tr> <th colspan="2">Izračunano</th> <th colspan="2">Izmerjeno</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C</td> <td>74,18 %</td> <td>C</td> <td>74,22 %</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>5,41 %</td> <td>H</td> <td>5,62 %</td> </tr> <tr> <td>N</td> <td>7,52 %</td> <td>N</td> <td>7,36 %</td> </tr> </tbody> </table>	Izračunano		Izmerjeno		C	74,18 %	C	74,22 %	H	5,41 %	H	5,62 %	N	7,52 %	N	7,36 %	
Izračunano		Izmerjeno																
C	74,18 %	C	74,22 %															
H	5,41 %	H	5,62 %															
N	7,52 %	N	7,36 %															

4.4.9 Sinteza etil 2-(benzil(2-((cianofenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata

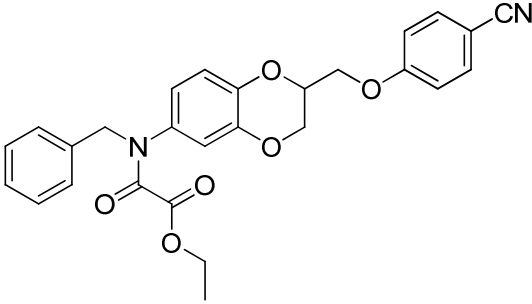


1,4 g (3,76 mmol) spojine **P38** smo raztopili v 50 mL DKM in dodali 503 μ L (1,2 eq, 4,51 mmol, 615 mg) etiloksalil klorida in 633 μ L (1,2 eq, 4,51 mmol, 456 mg) trietilamina. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč. DKM smo odparili pri znižanem tlaku. Dodali smo 50 mL EtOAc in ekstrahirali s citronsko kislino (3 x 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (3 x 50 mL) in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na_2SO_4 in EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: petroleter/EtOAc = 1,5 : 1). Dobili smo rumeno amorfno snov.

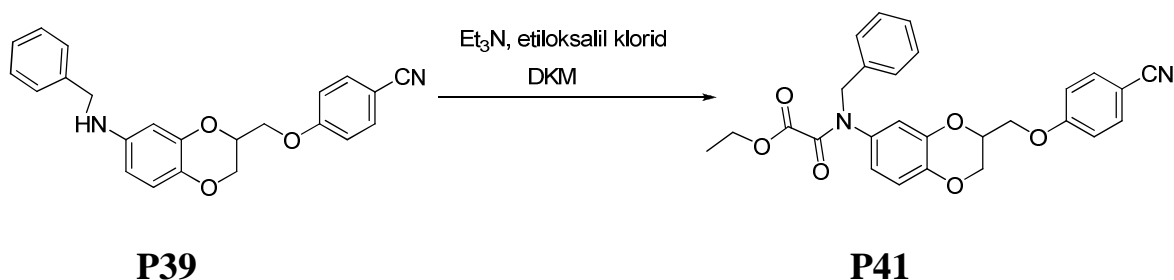
Izkoristek: 412 mg

23,2 %

Rf (petroleter/EtOAc = 1,5 : 1) = 0,24

Etil 2-(benzil(2-((cianofenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetat		M_r = 472,49
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	drobni rumeni kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 0,92 (t, 3H, $J = 7,09$ Hz, CH ₂ CH ₃), 3,92 - 3,99 (q, 2H, $J = 7,38$ Hz, CH ₃ CH ₂), 4,00 - 4,05 (m, 4H, CH ₂ O, CH ₂ O), 4,30 - 4,36 (m, 1H, CH), 4,89 (s, 2H, CH ₂ Ph), 6,58 (dd, 1H, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 2,23$ Hz, Ar-H ⁷), 6,76 - 6,89 (m, 2H, Ar-H ⁵ , Ar-H ⁸), 7,12 - 7,21 (m, 2H, Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,31 - 7,34 (m, 5H, Ph), 7,76 (d, 2H, $J = 2,8$ Hz, Ar-H ³ , Ar-H ⁵)	
MS (ESI)	m/z (%) = 473 (100 MH ⁺)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3401, 2345, 2364, 1669, 1507, 1307, 1264, 1207, 1184, 1131, 1030, 842	
T_t	185-186 °C	
Elementna analiza (CHN) (C₂₇H₂₄N₂O₆ × 1/5 H₂O)	Izračunano C 68,63 % H 5,12 % N 5,93 %	Izmerjeno C 68,02 % H 5,64 % N 6,20 %

4.4.10 Sinteza etil 2-(benzil(4-((cianofenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata



1,46 g (3,92 mmol) spojine **P39** smo raztopili v 50 mL DKM in dodali 525 μ L (1,2 eq, 4,70 mmol, 641 mg) etiloksalil klorida in 661 μ L (1,2 eq, 4,70 mmol, 411 mg) trietilamina. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč. DKM smo odparili pri znižanem tlaku. Dodali smo 50 mL EtOAc in ekstrahirali s citronsko kislino (3 x 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (3 x 50 mL) in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na_2SO_4 in EtOAc odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: petroleter/EtOAc = 1,5 : 1). Dobili smo spojine rumene barve.

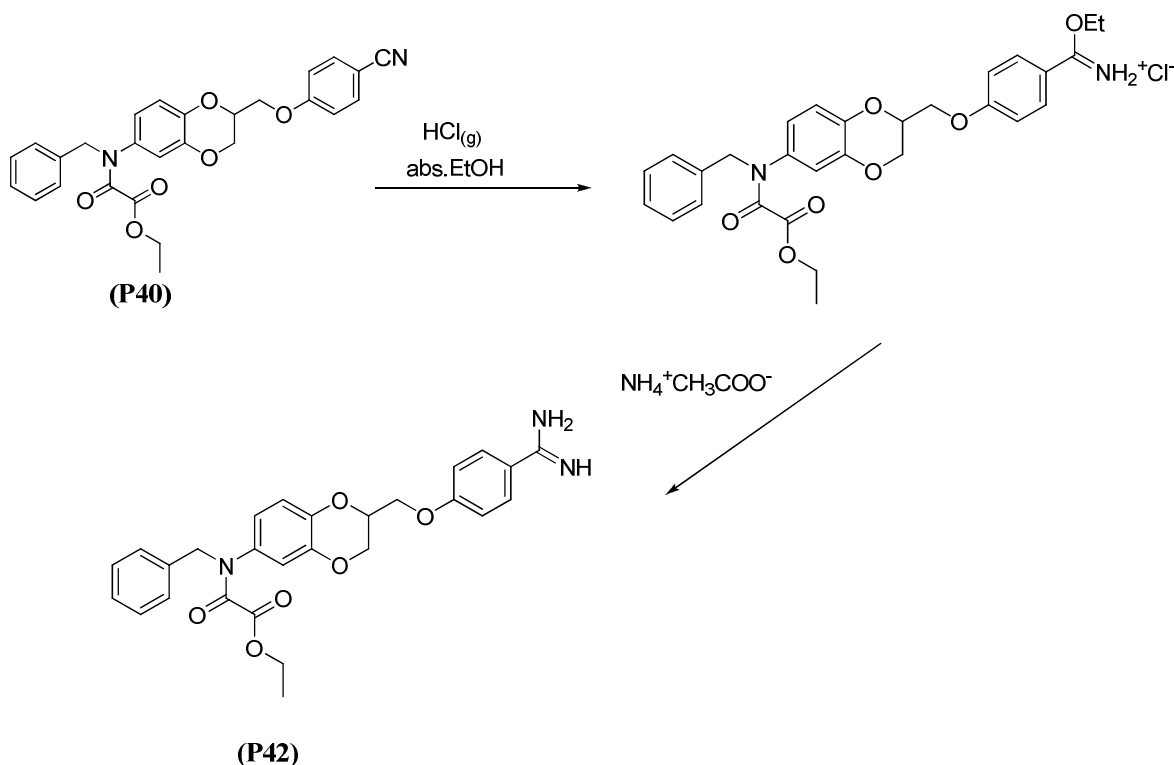
Izkoristek: 980 mg

51,9 %

Rf (petroleter/EtOAc = 1,5 : 1) = 0,24

Etil 2-(benzil(4-((cianofenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetat		$M_r = 472,49$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	drobni rumeni kristali	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 1,18 (t, 3H, $J = 7,11$ Hz, CH_2CH_3), 3,98 - 4,17 (q, 2H, $J = 7,38$ Hz, CH_3CH_2), 4,28 - 4,42 (m, 4H, CH_2O , CH_2O), 4,44 - 4,57 (m, 1H, CH), 4,89 (s, 2H, CH_2Ph), 6,59 (dd, 1H, $J_1 = 8,52$ Hz, $J_2 = 2,53$ Hz, Ar- H^6), 6,78 - 6,79 (m, 1H, Ar- H^5), 6,99 - 7,29 (m, 3H, Ar- H^2 , Ar- H^6 , Ar- H^8), 7,16-7,19 (m, 5H, Ph), 7,87 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, Ar- H^3 , Ar- H^5)	
MS (ESI)	m/z (%) = 373 (100 MH^+)	
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3293, 2365, 2345, 1664, 1507, 1332, 1185, 1143, 1032, 884	
T_t	184-186 °C	
Elementna analiza (CHN) ($\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6 \times 1/5 \text{H}_2\text{O}$)	Izračunano C 68,63 % H 5,12 % N 5,93 %	Izmerjeno C 68,05 % H 5,54 % N 5,86 %

4.4.11 Sinteza etil 2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata



412 mg (0,84 mmol) spojine **P40** smo raztopili v 20 mL brezvodnega EtOH. V bučko smo 30 minut uvajali plinasti HCl. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 48 h. EtOH smo odparili pri znižanem tlaku ter spojino spirali z brezvodnim dietiletom (3 x 30 mL), vendar beli kristali niso nastali. Oborino smo raztopili v 40 mL brezvodnega EtOH. Dodali smo 200,9 mg (3eq, 2,61 mmol) $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$. Reakcijsko zmes smo mešali 72 h. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Ker reakcija še ni potekla do konca, smo dodali še 134 mg (2 eq, 1,74 mmol) $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ in mešali še 48 h. Spojino smo očistili s kromatografsko kolono (MF:DKM/MeOH = 3:1) in metodo reverzne kromatografije. Frakcije, ki smo jih dobili s pomočjo reverzne kromatografije, smo preverili s HPLC, najbolj čiste frakcije združili ter topilo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo roza-bele kristale.

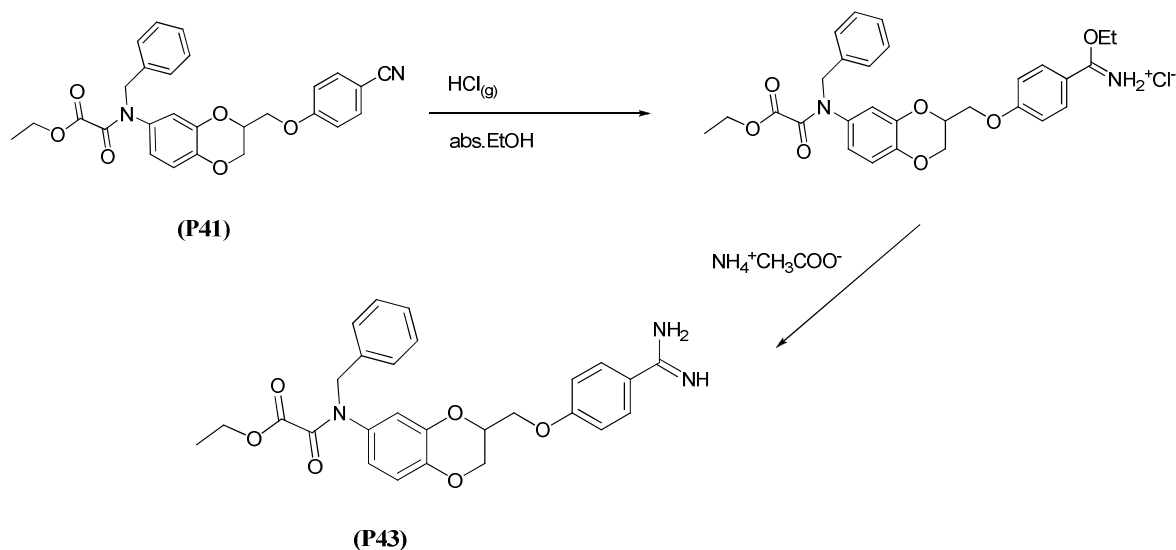
Izkoristek: 210 mg

49,3 %

R_f (DKM/MeOH = 3:1) = 0,7

Etil 2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetat		M_r = 489,52														
Struktura spojine:																
Izgled spojine	roza-beli kristali															
Analiza	Rezultati															
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, $J = 7,19$ Hz, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2}$), 3,99 (q, 2H, $J_1 = 7,07$ Hz, $\text{CH}_3\underline{\text{CH}_2}$), 4,08 - 4,68 (m, 5H, $\underline{\text{CH}_2\text{-O-}}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-O-}}$, $\underline{\text{CH}}$), 4,90 (s, 2H, $\text{Ph}\underline{\text{CH}_2\text{-}}$), 6,63 (dd, 1H, $J_1 = 8,59$ Hz, $J_2 = 2,53$ Hz, Ar-H ⁷), 6,87 (d, 1H, $J = 2,48$ Hz, Ar-H ⁵), 6,89 (d, 1H, $J = 8,59$ Hz, Ar-H ⁸), 7,10 - 7,39 (m, 7H, Ar-Ph, Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,83 (d, 2H, $J = 8,88$ Hz, Ar-H ³ , Ar-H ⁵), 8,85 (s, 2H, $\underline{\text{NH}_2}$), 9,15 (s, 2H, NH^+)															
MS (ESI)	m/z (%) = 138 (45), 490 (100 MH^+),															
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3411, 3121, 2345, 1736, 1669, 1610, 1507, 1203, 1185, 1143, 1032, 844															
T_t	171-173 °C															
Elementna analiza (CHN) (C₂₇H₂₇N₃O₆ × 1/2 H₂O)	<table border="0"> <tr> <td>Izračunano</td> <td></td> <td>Izmerjeno</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>66,25 %</td> <td>C</td> <td>65,10 %</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>5,56 %</td> <td>H</td> <td>5,42 %</td> </tr> <tr> <td>N</td> <td>19,61 %</td> <td>N</td> <td>20,02 %</td> </tr> </table>	Izračunano		Izmerjeno	C	66,25 %	C	65,10 %	H	5,56 %	H	5,42 %	N	19,61 %	N	20,02 %
Izračunano		Izmerjeno														
C	66,25 %	C	65,10 %													
H	5,56 %	H	5,42 %													
N	19,61 %	N	20,02 %													

4.4.12 Sinteza etil 2-(benzil(3-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetata



980 mg (2,0 mmol) spojine **P41** smo raztopili v 20 mL brezvodnega EtOH. V bučko smo 30 minut uvajali plinasti HCl. Reakcijsko zmes smo mešali 48 h in nato EtOH odparili pri znižanem tlaku. Spojino smo spirali z brezvodnim dietiletom (3 x 30 mL), vendar beli kristali niso nastali. Nastalo oborino smo raztopili v 40 mL brezvodnega EtOH in dodali 478,2 mg (3eq, 6,21 mmol) $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$. Reakcijsko zmes smo mešali 72 h. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Spojino smo očistili s kromatografsko kolono (MF:DKM/MeOH = 3:1) in metodo reverzne kromatografije. Frakcije dobljene s pomočjo metode reverzne kromatografije smo preverili na HPLC in najbolj čiste frakcije združili ter topilo odstranili pri znižanem tlaku. Dobili smo roza-bele kristale.

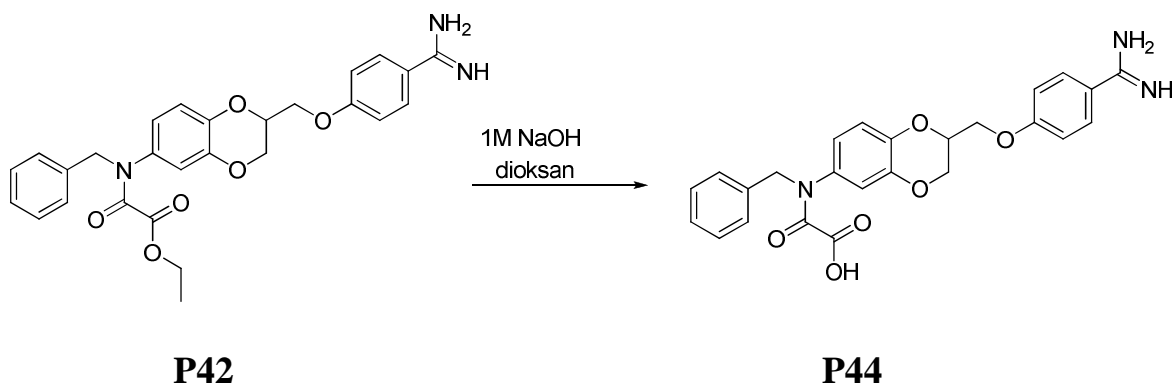
Izkoristek: 162 mg

15,8 %

R_f (DKM/MeOH = 3:1) = 0,71

Etil 2-(benzil(3-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetat		$M_r = 489,52$
Struktura spojine:		
Izgled spojine	roza-beli kristali	
Analiza	Rezultati	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, $J = 7,19$ Hz, CH_3CH_2), 3,99 (q, 2H, $J_1 = 7,07$ Hz, CH_3CH_2), 4,09 - 4,64 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-O-}$, $\text{CH}_2\text{-O-}$, CH), 4,90 (s, 2H, $\text{PhCH}_2\text{-}$), 6,63 (dd, 1H, $J_1 = 8,59$ Hz, $J_2 = 2,53$ Hz, Ar- H^6), 6,78 (d, 1H, $J = 2,48$ Hz, Ar- H^8), 6,90 (d, 1H, $J = 8,59$ Hz, Ar- H^5) 7,13 - 7,41 (m, 7H, Ar-Ph, Ar- H^2 , Ar- H^6), 7,83 (d, 2H, $J = 8,88$ Hz, Ar- H^3 , Ar- H^5), 8,87 (s, 2H, NH_2), 9,18 (s, 2H, NH^+)	
MS (ESI)	m/z (%) = 490,3 (100 MH^+)	
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3337, 2365, 2345, 1669, 1507, 1186, 1133, 842	
T_f	174-175 °C	
Elementna analiza (CHN) ($\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6 \times 2/7 \text{H}_2\text{O}$)	Izračunano	Izmerjeno
	C 66,25 %	C 66,43 %
	H 5,56 %	H 5,07 %
	N 19,61 %	N 19,98 %

4.4.13 Sinteza 2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetne kisline



162 mg (0,33 mmol) spojine **P43** smo raztopili v 25 mL dioksana. Dodali smo 1,98 mL (6 eq, 1,98 mmol) 1M NaOH. Reakcijsko zmes smo mešali 48 h pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Dioksan smo odparili pri znižanem tlaku in nakisali do pH = 1. Oborino smo filtrirali skozi fin filter papir in sušili pri 50 ° 24 h. Dobili smo rjavo oborino.

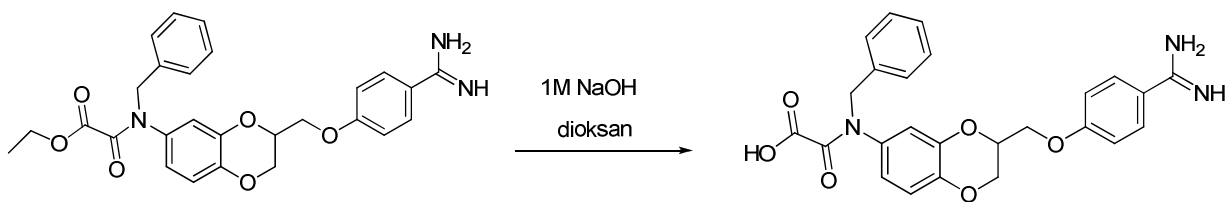
Izkoristek : 51 mg

37,2 %

Rf (DKM/MeOH = 3:1) = 0

2-(Benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenu[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetna kislina		M_r = 461,47
Struktura spojine:		
Izgled spojine	rjava spojina	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 3,98 - 4,01 (m, 2H, <u>CH</u> ₂ -O-), 4,21 - 4,27 (m, 2H, O- <u>CH</u> ₂ -), 4,61 - 4,66 (m, 1H, <u>CH</u>), 4,85 (s, 2H, <u>CH</u> ₂ -Ph), 6,65 - 6,77 (m, 3H, Ar-H ⁸ , Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,09 - 7,33 (m, 7H, Ph, Ar-H ³ , Ar-H ⁵), 7,78 - 7,83 (m, 2H, Ar-H ⁷ , Ar-H ⁵), 9,00 (s, 2H, NH ₂), 9,20 (s, 2H, NH) *COOH sk. ni vidna	
MS (ESI)	m/z (%) = 492 (50, MH ⁺), 390 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3421, 2367, 2354, 1623, 1507, 1499, 1256, 1189, 1116, 1045, 902, 815	
T_t	160-163 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izračunano	Izmerjeno
	C 65,07 %	C 65,22 %
	H 5,02 %	H 5,07 %
	N 9,11 %	N 8,86 %

4.4.14 Sinteza 2-(benzil(3-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetna kislina



P43

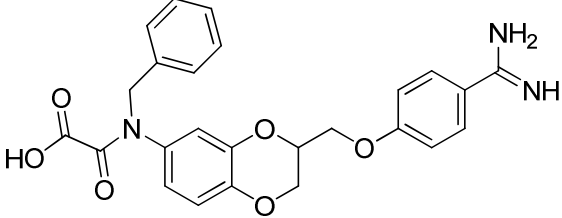
P45

126 mg (0,26 mmol) spojine **P43** smo raztopili v 25 mL dioksana. Dodali smo 1,54 mL (6 eq, 1,54 mmol) 1M NaOH. Reakcijsko zmes smo mešali 48 h pri sobni temperaturi. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ali je reakcija končana. Dioksan smo odparili pri znižanem tlaku in nakisali do pH = 1. Oborino smo filtrirali skozi fin filter papir in sušili pri 50°C 24 h. Dobili smo svetlo rjavo oborino.

Izkoristek : 62 mg

43,6 %

Rf (DKM/MeOH = 3:1) = 0

2-(Benzil(3-((4-karbamimidofilfenoksi)metil)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoocetno kislino		$M_r = 461,47$
Struktura spojine:		
		
Izgled spojine	svetlo rjava spojina	
Analiza	Rezultati	
¹H-NMR (DMSO, 300 MHz)	δ [ppm] = 4,17 - 4,29 (m, 2H, <u>CH</u> ₂ -O-), 4,39 - 4,45 (m, 2H, O- <u>CH</u> ₂ -), 4,52 - 4,55 (m, 1H, <u>CH</u>), 4,96 (s, 2H, <u>CH</u> ₂ -Ph), 6,69 - 6,82 (m, 3H, Ar-H ⁸ , Ar-H ² , Ar-H ⁶), 7,12 - 7,17 (m, 7H, Ph, Ar-H ³ , Ar-H ⁵), 7,19 - 7,25 (m, 2H, Ar-H ⁶ , Ar-H ⁵), 9,18 (s, 2H, NH ₂), *NH in COOH sk. nista vidni	
MS (ESI)	m/z (%) = 492 (50, MH ⁺), 390 (100)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3064, 1654, 1608, 1505, 1454, 1362, 1306, 1260, 1178, 1117, 1043, 1030, 960, 841	
T_t	169-171 °C	
Elementna analiza (CHN)	Izračunano	Izmerjeno
	C 65,07 %	C 64,78 %
	H 5,02 %	H 5,10 %
	N 9,11 %	N 9,22 %

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZA PREKURZORJEV ENANTIOMERNO ČISTIH BENZOKSAZINOV

- **Sinteza 2-(metilamino)-4-nitrofenola, 2-(metilamino)-5-nitrofenola in 2-(metilamino)fenola**

V primeru sinteze metiliranih derivatov smo uporabili poznano reakcijsko pot (40). Največ problemov smo imeli s sintezo 2-(metilamino)fenola, saj smo v več poskusih izolirali le dimetilni produkt. Izolacija mono-metiliranega produkta je uspela z mobilno fazo heksan/EtOAc = 3:1. Razmerje mono/dimetilni produkt je bil 1:3. Poskusili smo tudi z različnimi razmerji DKM/MeOH, vendar ločitev ni uspela. V primeru 2-(metilamino)-4-nitrofenola, 2-(metilamino)-5-nitrofenola nismo imeli večjih težav, saj smo v obeh primerih dobili po kristalizaciji čiste produkte. Da bi dobili večje izkoristke metiliranja, smo preizkusili z različnimi bazami (KF, NaHCO₃, KHCO₃, K₂CO₃). Najboljši izkoristek smo dobili z NaHCO₃, zato smo za sintezo nitro derivatov uporabili NaHCO₃, za sintezo 2-(metilamino)fenola pa KHCO₃ kot piše v predpisu (45).

- **Sinteza 2-(benzilamino)-4-nitrofenola, 2-(benzilamino)-5-nitrofenola in 2-(benzilamino)fenola (42)**

Benzilirane derivate smo sintetizirali po predpisu, kjer smo z redukativnim aminiranjem dobili zelene produkte. Pomembno je, da smo reakcijo delali v brezvodnih pogojih, saj bi voda vplivala na potek naše reakcije. Reakcijo smo izvajali nad molekularnimi siti, saj v prisotnosti vode nastane v reverzibilni ravnotežni reakciji manj imina, ki je naš vmesni produkt. Če med reakcijo vodo odstranjamo (fizikalno ali kemijsko), na primer z molekularnimi siti, se ravnotežna reakcija premakne v smer nastanka produkta (imina). Če imamo več imina, posledično z redukcijo dobimo več končnega produkta.

- **Poskus sinteze (4-metil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola in (4-benzil-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola**

Z modifikacijo predpisa (37) smo najprej poskusili s sintezo (4-metil-7-nitro-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanola. Ker spojina **12** v toluenu ni topna, samo razmišljali, da mogoče reakcija ne poteče zaradi slabe topnosti. Zato smo poskusili z dodajanjem različnih sotopil, ki so raztopil spojino. Suspenziji v toluenu smo dodali nekaj kapljic MeOH, acetona in DMF. Reakcija ni potekla v nobenem primeru. Poskusili smo še z različnimi topili: DMF, DKM in nekaj kapljic MeOH ter 1,2-dikloroetan in nekaj kapljic MeOH. Reakcija ni potekla v nobenem primeru. Odločili smo se, da zamenjamo bazo, zato smo poskusili s KF namesto LiClO₄, vendar tudi ta reakcija ni dala nobenih obetavnih rezultatov. Razmišljali smo, da je morda za neuspele reakcije razlog nitro skupina. Zadnji poskus je bila redukcija nitro skupine do amino spojine in nadaljnji poskus ciklizacije. Tudi to ni uspelo. Odločili smo se preveriti predpis (37), po katerem so 2-(benzilamino)fenol pretvorili v (4-benzil-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanol. Reakcijo smo najprej preverili pri sobni temperaturi, potem pa še pri 50 °C. Ko smo izolirano spojino preverili z NMR spektrom, smo videli, da tudi ta reakcija ni uspela. Zato smo nadaljnje sinteze opustili.

5.2 SINTEZA PREKURZORJEV ČISTIH ENANTIOMEROV 6- NITROBENZOKSAZINOV IN 7- NITROBENZOKSAZINOV Z RESOLUCIJO

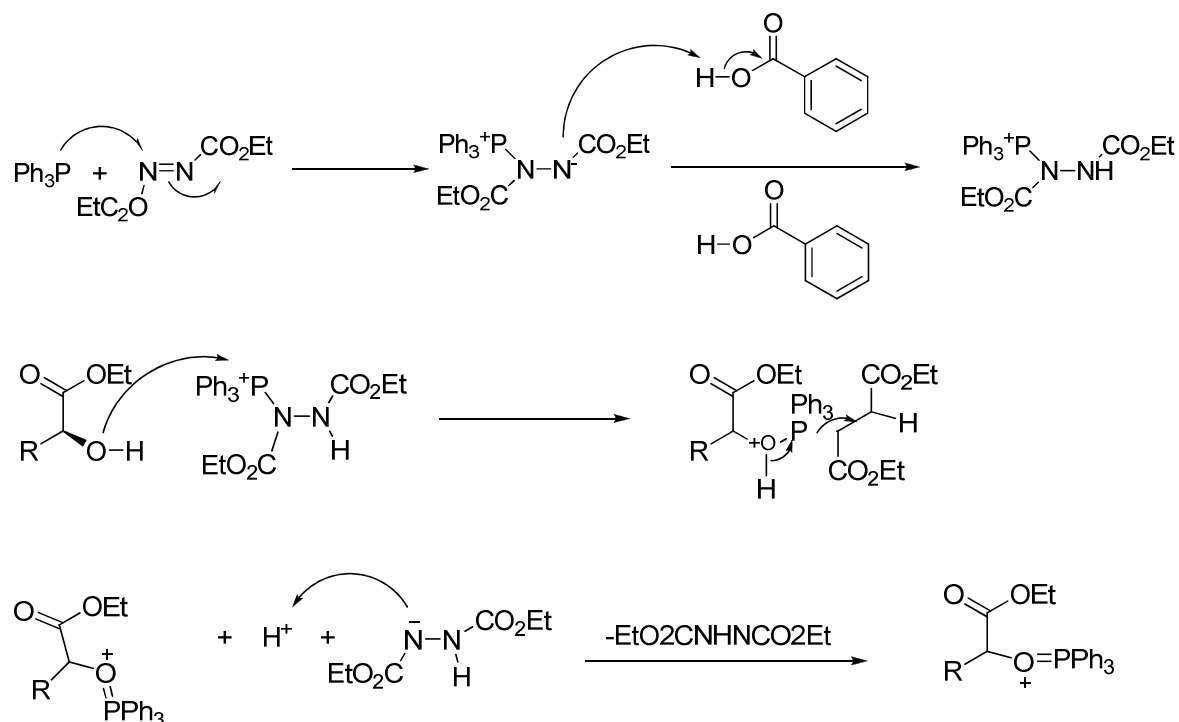
V primeru spojin s 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazinskim skeletom smo benzoksazinski skeletni obroč sintetizirali iz 2-amino-5-nitrofenola oz. 2-amino-4-nitrofenola in dietil 2-bromo-metilmalonata. Spojini **1** in **2** smo *N*-alkilirali. Na koncu smo izvedli še hidrolizo estra. Sledil je poskus resolucije z *R*-feniletilaminom in *S*-feniletilaminom. Nastali oborini smo pomerili sučnost. V primeru soli z *R*-feniletilaminom smo dobili specifične sučnosti od $[\alpha]_D = -6,0$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$) do $[\alpha]_D = -2,6$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Sučnosti praktično ni bilo. Nekatere vmesne vrednosti so imele tudi pozitiven predznak. V primeru soli z *S*-feniletilaminom smo dobili specifične sučnosti od $[\alpha]_D = +0,8$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$) do $[\alpha]_D = +2,2$ (brezvodni etanol, $c = 0,5$). Tu je bila specifična sučnost še nekoliko manjša. Tudi v tem primeru so nekatere vrednosti spremenile predznak. Poskuse

smo izvajali še 2 krat, vendar ni bilo bistvenih razlik. Po prekrystalizaciji se je sučnost nekoliko izboljšala, vendar še vedno ni bila zadosti velika, da bi lahko iz tega potrdili, da gre za čist enantiomer. Sledila je nevtralizacija, pri kateri naj bi dobili enantiomere kislinskega derivata. Tudi tem spojinam smo določevali optično sučnost. Sučnosti so bile še nekoliko manjše kot pred nevtralizacijo. Preverili smo tudi optične sučnosti matičnic. Vrednosti se spreminjajo od pozitivnih do negativnih vrednosti. Obe spojini smo preverili s kiralno modificirano stacionarno fazo. Na spektru smo dobili dva vrhova, ki se praktično prekrivata. S tem smo potrdili, da resolucija nitro derivatov pod uporabljanimi pogoji žal ne uspe.

5.3 SINTEZA SPOJIN Z BENZO[b][1,4]DIOKSINSKIM SKELETOM

Prvo stopnjo sinteze smo izvedli tako, da smo raztopini 4-nitrokatehola v DMF dodali bazo in epiklorhidrin. Pri povišani temperaturi smo dobili 6- in 7-nitro substituran benzoksazinski skelet, odvisno od baze, ki smo jo dodali.

Naslednja stopnja je bila Mitsunobu-jeva reakcija s 4-cianofenolom, trifenilfosfinom in diizopropil azidokarboksilat. Mitsunobujeva reakcija omogoča pretvorbo primarnih in sekundarnih alkoholov v estre, fenilne estre, etre, tioestre in drugo. Nukleofil mora imeti kisel proton, saj mora biti drugi reagent (DIAD) protoniran, da med reakcijo ne nastanejo stranski produkti. Nukleofili, ki jih lahko uporabimo za to reakcijo so: trifenilfosfat, ftalimid ali hidrogen azid. Trifenilfosfin v kombinaciji z DIAD tvori fosfonijev intermediat ki se veže na kisik alkoholne skupine in jo aktivira. Alkoholna skupina izstopi. Substituira jo karboksilat, merkaptil ali drug nukleofil (46). Pri Mitsunobi-jevi reakciji je bilo največ težav pri čiščenju spojine. Zaradi dvojnega čiščenja smo imeli manjše izkoristke kot bi bili sicer.



Slika 13 : Shema poteka Mitsunobu-jeve reakcije (46)

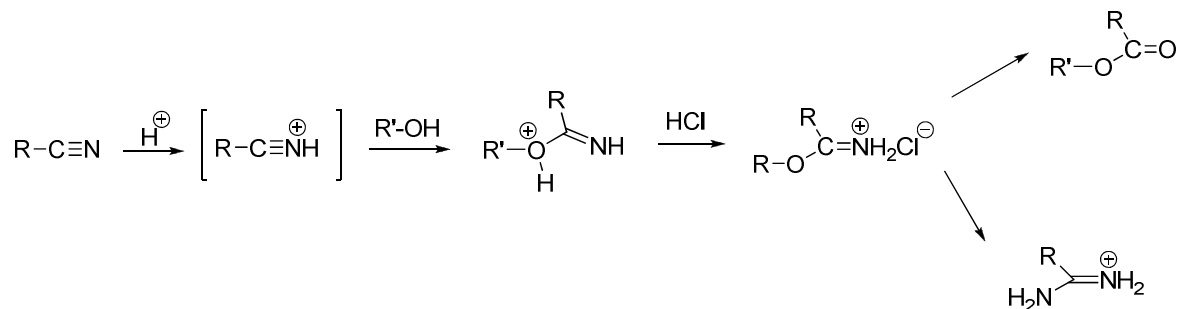
Redukcijo nitro skupin spojin **23** in **29** smo izvedli s katalitskim hidrogeniranjem. Uporabili smo paladij na ogljiku kot katalizator. Kot topilo smo uporabili brezvodni MeOH. Reakcijo smo izvajali 2h v reaktorju pri 25 bar. Po končani reakciji smo spojino izolirali s filtriranjem preko celita. Dobili smo zelo dober izkoristek.

Reduktivno aminiranje spojin **35** in **36** smo izvajali pri brezvodnih pogojih v atmosferi argona. V prvem delu reakcije smo na amin pripeli benzaldehid in v drugi stopnji izvedli redukcijo dvojne vezi z natrijevim borhidridom. Pri dodajanju reducenta je bila potrebna previdnost, saj je reakcija lahko zelo burna. Ko so prenehali izhajati vodikovi mehurčki, je reakcija potekla.

Sledilo je pripenjanje etiloksalilne skupine na sekundarni amin spojin **38** in **39**. Kot bazo za aktivacijo amino skupine smo uporabili trietilamin.

Ciano skupino spojine **40** in **41** smo s Pinnerjevo reakcijo pretvorili v amidin. Pinnerjeva reakcija je organska reakcija, kjer reagira nitril z alkoholom s pomočjo kislega katalizatorja, na primer s klorovodikovo kislino. Produkt, ki nastane je sol klorovodikove kisline z imino estrom oziroma z alkilnim imidatom, ki se imenuje Pinnerjeva sol. Reakcija je zaporedje nukleofilnih adicij (47) .

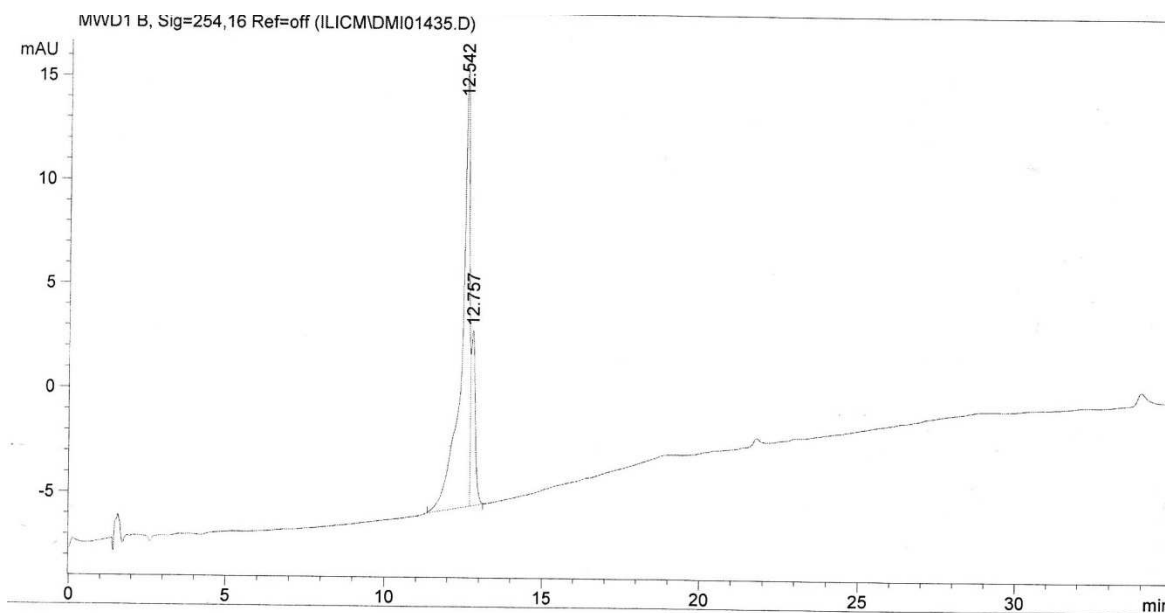
Za Pinnerjevo sintezo so potrebni popolnoma brezvodni pogoji, saj že manjše količine vode oziroma vlage reagirajo z iminoetri do amidov.



Slika 14: Shema poteka Pinnerjeve reakcije (48)

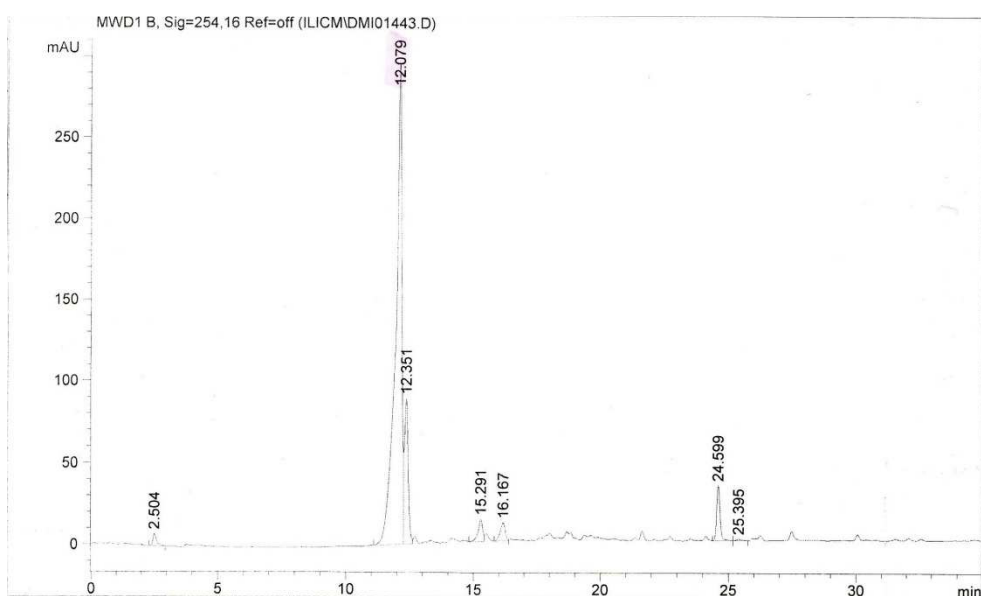
V našem primeru smo kot nukleofil uporabili amonijev acetat. Pred uporabo amonijevega acetata smo ga temeljito sprali z dietil etrom, saj ob prisotnosti vode in med daljšem skladiščenjem nastaneta amonijak in očetna kislina.

Spojino smo najprej očistili s kromatografsko kolono in s HPLC preverili čistost. Tokrat se je prvič na spektru pokazalo, da imamo prisotna oba enantiomera spojine (Slika 15). Na obeh spektrih smo dobili dva vrhova, ki se skoraj prekrivata. Z metodo reverzne kromatografije smo zbirali zelo majhne fregmente (8 mL), vendar obeh enantiomerov nismo mogli ločiti. Še vedno sta bila na vseh spektrih prisotna oba vrhova. Kljub temu smo zbrali najbolj čiste fragmente in jih združili za naslednji korak v sintezi. Izkoristek po Pinnerjevi reakciji je bil zelo slab.



Slika 15: Ena izmed frakcij spojine 42

V zadnji stopnji smo kot topilo uporabili dioksan ter izvedli hidrolizo estra z 1M NaOH do končnega produkta. Prav tako smo posneli HPLC spekter in na njem sta bila še vedno prisotna oba skoraj prekrivajoča se vrhova (Slika 16). Tako smo ovrgli možnost, da bi bila v spojini prisotna kakšna nečistota, ki bi imela zelo podoben Rf.



Slika 16: HPLC spekter spojine 44

6 SKLEP

Izvedli smo sintezo gradnikov spojin z benzoksazinskim in benzodioksanskim skeletom, ki naj bi imele antitrombotično delovanje in naj bi hkrati delovale kot antagonisti fibrinogeneskega GPIIa/IIIb receptorja. Pri sintezni smo prišli do želene končne spojine le v dveh primerih. Ostali dve poti sinteze sta bili žal neuspešni že v prvih stopnjah. Ali bodo sintetizirane spojine dejansko kazale pozitivne učinke, bo potrebno najprej preveriti z *in vitro* testiranjem. Pri ločevanju z resolucijo smo naleteli na težave, saj spojine z nitro skupino ne moremo ločevati s fenilalkilaminom. To je verjetno posledica močnih elektroprivlačnih lastnosti nitro skupine. Za nadaljnje iskanje primerne metode za ločitev enantiomerov z resolucijo se nismo odločili, saj bi bilo to lahko zelo zamudno in ni nujno, da bi našli primerno metodo, ki bi ustrezala našim zahtevam. To pot sinteze smo opustili in smo se odločili, da bi poskusili dobiti čisti enantiomer že med samo sintezo. Neuspešnost ciklizacije spojin (4-metil-6-nitro-3,4-dihidro-2*H*-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanol in (4-metil-7-nitro-3,4-dihidro-2*H*-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)metanol bi lahko pripisali močnemu induktivnemu efektu nitro skupine. Ni pa popolnoma jasno, zakaj reakcije predpisane v članku (37), kljub večkratnim ponovitvam niso uspele. Razlog bi bil lahko v neustreznih pogojih ali pa v reagentih. Tretja veja je bila uspešna in tako smo prišli do dveh spojin **P44** (2-(benzil(2-((4-karbamidoilfenoksi)metil)2,3-dihidrobzeno[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetne kisline) in **P45** (2-(benzil(3-((4-karbamimidoilfenoksi)metil)-2,3-dihidrobzeno[b][1,4]dioksin-6-il)amino)-2-oksoacetne kisline), ki bi lahko bili potencialno učinkoviti sredstva proti strjevanju krvi. Spojini teoretično ustrezata vsem kriterijem učinkovitega dualnega antitrombotika.

7 LITERATURA

- 1 Furie, B., M.D.; Furie, B.C., Ph.D. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med*, **2008**, *359*, 938-949
- 2 Nordstrom, M.; Lindblad, B.; Bergqvist, D.; Kjellstrom, T. A prospective study of the incidence of deep vein thrombosis within a defined population. *J Intern Med*, **1992**, *232*, 155–60
- 3 McGilvray, I. D.; Rotstein, O. D. The role of the coagulation system in local and systemic inflammation. *World J Surg*, **1998**, *22*, 179–186
- 4 Berne, R.M; Levy, M.N.; Koeppen, B.M.; Stanton, B.A. Physiology. Mosby, 5th Ed., **2004**, 270-273
- 5 Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter J.M.; Flower, R.J. Rang and Dale's Pharmacology. Churchill Livingstone Elsevier, 6th Ed., **2007**, 331-346, 790
- 6 Furie. B.; Furie, B.C. Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest*, **2005**, *115*, 3355–62
- 7 <http://www.ouhsc.edu/platelets/platelets/platelets%20intro.html> (7.3.2011)
- 8 Olson, J.P.; Miller, L.L.; Troup, S.B. Synthesis of clotting factors by the isolated perfused rat liver. *J Clin Invest*, **1966**, *45*, 690–701.
- 9 Pendurthi, U.R.; Rao, L.V. Factor VIIa interaction with endothelial cells and endothelial cell protein C receptor. *Thromb Res*, **2010**, *125*, S19-22.
- 10 Ferguson, J.H.; Calcium and blood coagulation. *J Arm Med Assoc*, **1937**, *109*, 1818
- 11 Heit, J.A. Venous thromboembolism epidemiology: implications for prevention and management. *Semin Thromb Hemost*, **2002**, *28* (suppl 2), 3-13.
- 12 Kladnik-Januš, B. Farmakologija. Univerza v Mariboru, Visoka zdravstvena šola, **2006**, 95-985
- 13 <http://en.wikipedia.org/wiki/Streptokinase> (7.3.2011)
- 14 <http://www.proteases.org/structure.php?start=760> (7.3.2011)
- 15 Whitlon, D.S.; Sadowski, J.A.; Suttie, J.W. Mechanism of coumarin action: Significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*, **1978**, *17*, 1371-7

- 16 Rodríguez-Cabrera, M.A.; Barona-Dorado, C.; Leco-Berrocal, I.; Gómez-Moreno, G.; Martínez-González, J.M. Extractions without eliminating anticoagulant treatment: A literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **2010**, *141*, 1435-41.
- 17 Mahadoo, J.; Heibert, L.; Jaques, L.B. Vascular sequestration of heparin. *Thromb Res*, **1978**, *12*, 79-90
- 18 Glimelius, B.; Busch, C.; Hook, M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. *Thromb Res*, **1978**, *12*, 773-82.
- 19 Hirsh, J.; Raschke, R.; Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, **2004**, *126*, 188S-203S.
- 20 Šabovič, M., Kozak, M., Žuran, I., Berden, P., Mavri, A., Vene, N., Blinc, A., Peternel, P. Smernice za odkrivanje in zdravljenje venske tromboze. *Zdrav vestn*, **2005**, *74*, 137- 42
- 21 Weitz, J.I. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med*, **1997**, *337*, 688-98.
- 22 Hirsh, J.; Weitz, J.I. New anticoagulant drugs; *Chest* **2001**, *119*, no.1 suppl, 95S-107S
- 23 Eriksson, B.I.; Dahl, O.E.; Rosencher, N. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet*, **2007**, *370*, 949–56.
- 24 Huel, N.H.; Nar, H.; Priepke, H.; Ries, U.; Stassen, J.M.; Wienen, W. Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem*, **2002**, *45*, 1757–66.
- 25 Ansell, J. Warfarin versus new agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2010**, *2010*, 221-8.
- 26 Roehrig, S.; Straub, A.; Pohlmann, J. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *48*, 5900–8
- 27 Eriksson, B.I.; Borris, L.C.; Dahl, O.E. A once-daily, oral, direct Factor Xa inhibitor, rivaroxaban (BAY 59-7939), for thromboprophylaxis after total hip replacement. *Circulation*, **2006**, *114*, 2374–81
- 28 Bode, W. Structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin. Thromb. Hemostasis*, **2006**, *32 (suppl.1)*, 16-31

- 29 Anderluh Štefančič, P.; Anderluh, M.; Ilaš, J.; Mravljak, J.; Sollner Dolenc, M.; Stegnar, M.; Kikelj, D. Toward a novel class of antithrombotic compounds with dual function. Discovery of 1,4-benzoxazin-3(4H)-one derivatives possessing thrombin inhibitory and fibrinogen receptor antagonistic activities. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 3110-3113
- 30 Howard, N.; Abell, C.; Blakemore, W.; Chessari, G.; Congreve, M.; Howard, S.; Jhoti, H.; Murray, C.W.; Seavers, L.C.; van Montfort, R.L. Application of fragment screening and fragment linking to the discovery of novel thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1346-55.
- 31 Lefkovits, J.; Plow, E.F.; Topol, E.J. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine, *N Engl J Med*, **1995**, *332*, 1553-1559
- 32 Collier, B.S. Blockade of Platelet GPIIb/IIIa Receptors as an Antithrombotic Strategy *Circulation*, **1995**, *92*, 2373-2380
- 33 Ilaš, J.; Jakopin, Z.; Borštnar, T.; Stegnar, M.; Kikelj, D. 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazine derivatives combining thrombin inhibitory and glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonistic activity as a novel class of antithrombotic compounds with dual function. *J Med Chem*, **2008**, *51*, 5617-29
- 34 Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B.S.; Wang, J.-H.; Springer, T.A. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutic. *Nature*, **2004**, *432*, 59-67.
- 35 Ciprandi, A; Horn, F; Termignoni, C. Saliva of hematophagous animals: source of new anticoagulants. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, **2003**, *25*, 250-262
- 36 Ilaš, J.; Tomasić, T.; Kikelj, D. Novel potent and selective thrombin inhibitors based on a central 1,4-benzoxazin-3(4H)-one scaffold. *J Med Chem*, **2008**, *51*, 2863-7
- 37 Breuning, M.; Winnacker, M.; Steiner, M. Efficient one-pot synthesis of enantiomerically pure 2-(hydroxymethyl)-morpholines. *Eur. J. Org. Chem*, **2007**, 2100-2106
- 38 Kikelj, D.; Suhadolc, E.; Urleb, U.; Žbontar, U. A Convenient Synthesis of 3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2H-1,4-benzoxazine-2-carboxylic Acids and 3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2H-pyrido[**3, 2b**]-1,4-oxazine-2-carboxylic Acid, *J. Heterocyclic Chem*, **1993**, *30*, 597
- 39 Rutar, A.; Žbontar, U.; Kikelj, D.; Leban, I.; Enantiomers of 2-Methyl- and 2,4-Dimethyl-3-oxo-3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazine-2-carboxylic Acid: Preparation by Resolution, Determination of Absolute Configuration, and Curtius Rearrangement. *Chirality*, **1998**, *10*, 791-799

- 40 Kalgutkar, A.S.; Kozak, K.R.; Crews B.C.; Hochgesang, G. P.; Marnett, L. J. Covalent Modification of Cyclooxygenase-2 (COX-2) by 2-Acetoxyphenyl Alkyl Sulfides, a New Class of Selective COX-2 Inactivators. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4800-4818
- 41 Boothroyd, B.; Clark, E.R. Aminophenoxazines as possible antitubercular agents. Method of the synthesis of 3-aminophenoxazine. *J Chem Soc*, **1953**, 1499-1504
- 42 Abdel-Magid, A.F.; Carson, K.G.; Harris, B.D.; Maryanoff, C.A.; Shah R.D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3849-3862
- 43 Kikelj, D.; Ilaš, J. Ring opening of 2-(benzylamino)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)ones and 2-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3-ones. *Helv Chim Acta*, **2008**, *91*, 654-664
- 44 Anderluh, M.; Cesar, J.; Stefanic, P.; Kikelj, D.; Janes, D.; Murn, J.; Nadrah, K.; Tominc, M.; Addicks, E.; Giannis, A.; Stegnar, M.; Dolenc, M.S. Design and synthesis of novel platelet fibrinogen receptors antagonists with 2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one scaffold. A systematic study. *Eur J Med Chem*, **2005**, 25-49
- 45 Augstein, J.; Green, S.M. Adrenergic neurone blocking agents delivered from 1,4-benzodioxan. *J Med Chem*, **1965**, *8*, 446-56
- 46 <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/mitsunobu-reaction.shtml> (7.3.2011)
- 47 Pinner, A.; Klein F. Umwandlung der Nitrile in Imide. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1877**, *10*, 1889-1897.
- 48 http://en.wikipedia.org/wiki/Pinner_reaction (7.3.2011)