

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJ OJSTERŠEK

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni program farmacije

Zagorje ob Savi, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJ OJSTERŠEK

**SINTEZA DVOJNIH FLUORESCENČNO-SPINSKIH
OZNAČEVALCEV KUMARINSKEGA TIPA**

**SYNTHESIS OF DOUBLE FLOURESCENT-SPIN PROBES OF
COUMARINE TYPE**

DIPLOMSKA NALOGA

Zagorje ob Savi, 2011

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka. Spektroskopske meritve in elementne analize so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Inštitutu Jožef Štefan.

ZAHVALA

- Mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za strokovne nasvete in vzpodbudo
- Vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela, še posebej somentorju doc. dr. Janezu Mravljaku in asist. Stanetu Pajku

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc

Zagorje ob Savi, april 2011

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Vovk

VSEBINA

I. POVZETEK.....	v
II. SEZNAM OKRAJŠAV.....	vi
1. UVOD.....	1
1.1 Nitroksidne spinske sonde kot orodja za preiskovanje molekulske dinamike in mikrostrukture	1
1.2 Dvojne fluorescenčno-spinske sonde kot orodja za proučevanje molekulske dinamike... 	3
1.3 Nitroksidne redoks sonde in pasti	4
1.4 Spinsko označevanje v biokemiji in biofiziki	6
1.4.1 Proteini in encimi	6
1.4.1.1 Konformacijske spremembe v proteinih in encimih ter mehanizem intramolekulske dinamike	7
1.4.1.2 Struktura encimskih aktivnih centrov	7
1.4.2 Usmerjeno spinsko označevanje – <i>Site-Directed Spin-Labeling</i> (SDSL)	8
1.4.3 Biološke membrane	9
1.4.4 Nukleinske kisline	10
1.4.4.1 DNK	11
1.4.4.2 RNK	12
1.4.5 Polisaharidi	13
1.4.5.1 Bombaž in celuloza	13
1.4.5.2 Ciklodekstrini	14
2. NAČRT ZA DELO	15
2.1 REAKCIJSKE SCHEME.....	18
3. MATERIALI IN METODE.....	21
3.1 Reagenti in topila	21
3.2 Kromatografske metode.....	21
3.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)	21
3.2.2 Kolonska kromatografija	21
3.3 Določevanje tališč	22
3.4 Spektroskopske metode	23
3.4.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)	23
3.4.2 Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)	23
3.4.3 Fluorescenčna spektroskopija	23
3.4.4 Infrardeča spektroskopija (IR)	23
3.4.5 Masna spektrometrija (MS).....	24
3.5 Elementne analize	24
3.6 Nomenklatura in risanje spojin	24
4. EKSPERIMENTALNI DEL.....	25
4.1 SINTEZE.....	25

4.1.1	SINTEZA IZHODNE SPOJINE	25
4.1.1.1	7-(Dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksilna kislina (B)	25
4.1.2	SINTEZA REAGENTOV	26
4.1.2.1	4-Metoksi-4-oksobutan-1-amonijev klorid (C).....	26
4.1.2.2	5-Metoksi-5-oksopentan-1-amonijev klorid (D) [14],[29],[31]	27
4.1.3	SINTEZE NOVIH SPOJIN.....	28
4.1.3.1	7-(Dietilamino)-2-okso- <i>N</i> -(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (1) ..	28
4.1.3.2	7-(Dietilamino)- <i>N</i> -(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (2)	30
4.1.3.3	Metil 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)acetat (3)	31
4.1.3.4	2-(7-(Dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)ocetna kislina (4)	33
4.1.3.5	7-(Dietilamino)-2-okso- <i>N</i> -(2-okso-2-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)etil)-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (5)	35
4.1.3.6	7-(Dietilamino)- <i>N</i> -(2-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetil)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (6)	36
4.1.3.7	Etil 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)propanoat (7).....	38
4.1.3.8	3-(7-(Dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)propanojska kislina (8)	39
4.1.3.9	7-(Dietilamino)-2-okso- <i>N</i> -(3-okso-3-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)propil)-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (9)	41
4.1.3.10	7-(Dietilamino)- <i>N</i> -(3-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-3-oksopropil)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (10)	43
4.1.3.11	Metil 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)butanoat (11)	44
4.1.3.12	4-(7-(Dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)butanojska kislina (12)	46
4.1.3.13	7-(Dietilamino)-2-okso- <i>N</i> -(4-okso-4-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)butil)-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (13)	48
4.1.3.14	7-(Dietilamino)- <i>N</i> -(4-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-4-oksobutil)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (14)	50
4.1.3.15	Metil 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)pentanoat (15)	51
4.1.3.16	5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamido)pentanojska kislina (16)	53
4.1.3.17	7-(Dietilamino)-2-okso- <i>N</i> -(5-okso-5-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)pentil)-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (17)	55
4.1.3.18	7-(Dietilamino)- <i>N</i> -(5-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-5-oksopentil)-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karboksamid (18)	57
4.2	MERITVE EPR SPEKTROV NITROKSIDOV	59
4.2.1	MERITVE EPR SPEKTROV V ETANOLU.....	59
4.2.2	MERITVE EPR SPEKTROV V MICELIH.....	59
4.2.3	OKSIDACIJA SPOJINE 5 Z VODIKOVIM PEROKSIDOM IN MERITEV EPR SPEKTRA	61
4.3	MERITVE EKSCITACIJ IN EMISIJ.....	63
4.3.1	PRIPRAVA RAZTOPIN ZA MERITVE EMISIJ IN EKSCITACIJ	63
4.3.2	MERITVE EKSCITACIJSKIH SPEKTROV	63
4.3.3	MERITVE EMISIJSKIH SPEKTROV.....	68
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	73
5.1	Sinteza	73
5.2	Izolacija in čiščenje	78
5.3	NMR analize.....	87

5.4	Analiza EPR spektrov	88
5.5	Oksidacija spojine 5 z vodikovim peroksidom in snemanje EPR spektra.....	90
5.6	Meritve ekscitacijskih in emisijskih spektrov	91
6.	<i>SKLEP</i>	100
7.	<i>LITERATURA</i>	101
8.	<i>PRILOGE</i>	106

I. POVZETEK

V diplomski nalogi smo pripravili spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo fluorofor in nitroksid, in raziskali, kako vpliva razdalja med fluoroforom in nitroksidom na dušenje fluorescence. Naš namen je bil, da s spreminjanjem razdalje med fluoroforom in nitroksidom dosežemo čim večje dušenje fluorescence. Sintetizirali smo pet parov spojin sonda-past, ki vsebujejo enak fluorofor kumarinskega tipa ter nitroksid (fluorescenčno-spinske sonde) ali nitroksidu analogen sekundarni amin (fluorescenčno-spinske pasti), ki ju povezuje homologen aminokislinski distančnik. Pri prvem paru spojin sonda-past smo na kumarinski fluorofor preko amidne vezi neposredno vezali nitroksid oz. analogen sekundarni amin, pri ostalih parih pa smo med kumarinskim fluoroforom in nitroksidom oz. analognim sekundarnim aminom vezali različno dolge aminokislinske (uporabili smo glicin, β -alanin, γ -aminomasleno kislino in 5-aminovalerijansko kislino). Iz primerjave fluorescence fluorescenčno-spinskih sond in pasti z enakim aminokislinskim distančnikom smo določili dušenje fluorescence zaradi prisotnosti nitroksida v strukturi, iz primerjave dušenja fluorescence pri parih sonda-past z različnim aminokislinskim distančnikom v strukturi, pa smo ugotovili vpliv razdalje med nitroksidnim delom molekule in kumarinskim fluoroforom na dušenje fluorescence. Največje dušenje fluorescence smo dosegli pri dvojni fluorescenčno-spinski sondi, pri kateri je bil nitroksid neposredno vezan na kumarinski fluorofor (brez vmesnega aminokislinskega distančnika) – dušenje fluorescence je bilo 80% pri 10^{-2} M raztopini v DMSO. Pri ostalih dvojnih fluorescenčno-spinskih sondah, kjer sta bila kumarinski fluorofor in nitroksid ločena z aminokislinskim distančnikom (razdalja med fluoroforom in nitroksidom se je večala z naraščanjem dolžine aminokislinskega distančnika), je bilo dušenje fluorescence manjše. Na primeru dvojne fluorescenčno-spinske pasti smo izvedli oksidacijo sekundarnega amina do nitroksida s H_2O_2 in izmerili EPR spekter. Dvojne fluorescenčno-spinske sonde smo vgradili v micelle iz tritona-x-100, cetrimida in SDS-a ter vgraditev potrdili z EPR spektroskopijo. Sonde so se najboljše vgradile v micelle iz SDS-a, najslabše pa v micelle iz tritona-x-100. Vse sintetizirane spojine smo ustrezno karakterizirali.

II. SEZNAM OKRAJŠAV

5-AVA	<i>5-aminovaleric acid</i> : 5-aminovalerijanska kislina = 5-aminopentanojska kislina
bp	bazni par
CD	<i>circular dichroism</i> : cirkularni dikroizem
CETRIMID	cetrimonijev bromid = heksadecil-trimetil-amonijev bromid
CW ESR	<i>continuous wave electron paramagnetic resonance</i> : kontinuirana elektronska spinska (paramagnetna) resonanca
d	dublet
DEER	<i>double electron-electron resonance</i> : dvojna elektronsko-elektronska resonanca
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ED EPR	<i>echo-detected EPR</i> : EPR detektirana s spinskim odmevom
EI	elektronska ionizacija
EPR (ESR)	<i>electron paramagnetic resonance (electron spin resonance)</i> : elektronska paramagnetna resonanca (elektronska spinska resonanca)
ESRI ali EPRI	<i>ESR imaging</i> : slikanje z elektronsko spinsko (paramagnetno) resonanco
ET	<i>electron transfer</i> : elektronski transfer – prenos elektronov
eq	ekvivalent
FAB	<i>fast atom bombardment</i> = obstreljevanje s hitrimi atomi
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> : γ-aminomaslena kislina = 4-aminobutanojska kislina
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> : najvišja (z elektronom) zasedena molekulska orbitala
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> = visokoločljivostna tekočinska kromatografija
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> = masna spektrometrija visoke ločljivosti
IR	infrardeča spektroskopija
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> : najnižja (z elektronom) nezasedena molekulska orbitala
m	multiplet
MF	mobilna faza
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> : slikanje z magnetno resonanco
MS	masna spektroskopija
MW	mikrovalovi
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> : jedrska magnetna resonanca
PAS	površinsko aktivna snov
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> : fosfatni pufer
PELDOR	<i>pulse electron - electron double resonance</i> : pulzna elektronsko-elektronska dvojna resonanca
q	kvartet
R _f	retencijski faktor
RNK	ribonukleinska kislina
s	singlet
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> : natrijev dodecil sulfat
SDSL	<i>site-directed spin-labeling</i> : usmerjeno spinsko označevanje

SOMO	<i>singly occupied molecular orbital</i> : z enim elektronom zasedena molekulska orbitala
SPPEPR	<i>spin-probe-partitioning electron paramagnetic resonance</i> : elektronska paramagnetna resonanca s porazdelitvijo spinske sonde
t	triplet
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil
TLC	<i>thin layer chromatography</i> = tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TRFQ	<i>time-resolved fluorescence quenching</i> : časovno-odvisno dušenje fluorescence
TRITON-X-100	polietilen glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil eter
T _{tal}	temperatura tališča
T _{vr}	temperatura vrelišča

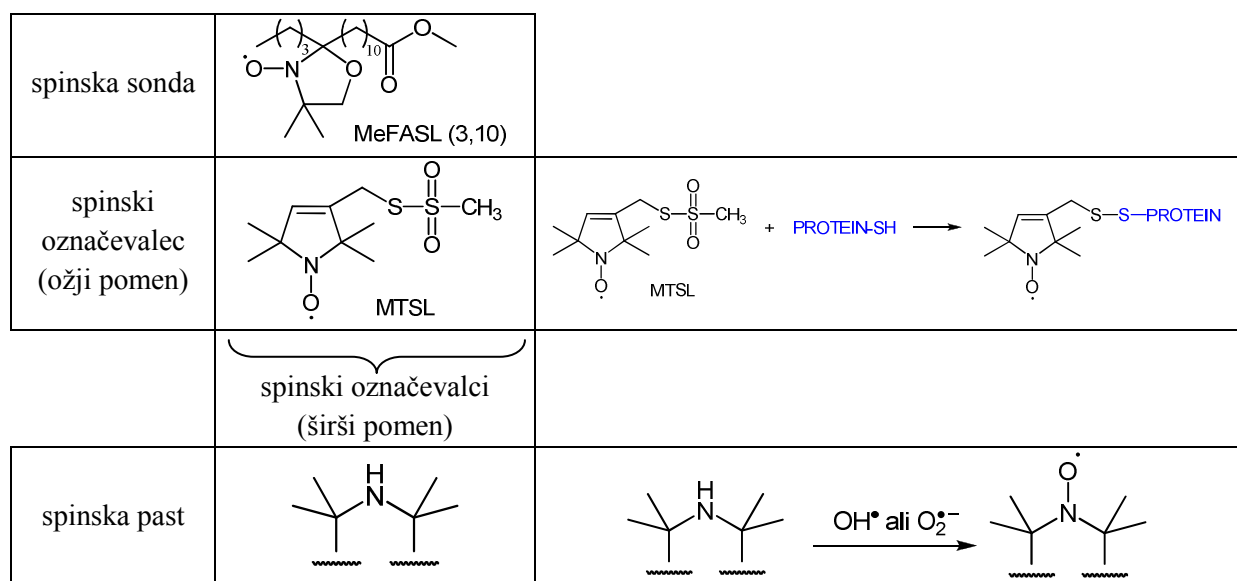
1. UVOD

1.1 Nitroksidne spinske sonde kot orodja za preiskovanje molekulske dinamike in mikrostrukture

Poznavanje lastnosti molekulske dinamike različnih materialov (tekočin, polimerov, organskih in anorganskih materialov) in bioloških sistemov so ključnega pomena za razumevanje funkcionalne aktivnosti, tehnoloških karakteristik, stabilnosti, kompatibilnosti itd. omenjenih materialov in bioloških sistemov. Metode spinskega označevanja z nitroksidi so pomembno orodje za raziskovanje molekulske mobilnosti oz. dinamike in strukture na tem področju. [1]

Pri proučevanju molekulske dinamike, mikrostrukture, lokalnega pH-ja, lokalne polarnosti, reaktivnih kisikovih/dušikovih zvrsti itd. uporabljamo različna molekulska orodja:

- **Spinske sonde** so paramagnetne molekule, ki v svoji strukturi vsebujejo nesparjen elektron (običajno gre za stabilen nitroksidni radikal). Spinske sonde dodamo vzorcu, ki ga proučujemo; te vstopajo v nekovalentne interakcije s sistemom (npr. biološke membrane) in »poročajo« o svoji neposredni okolici.
- **Spinske pasti** ne dajejo EPR (elektronska paramagnetna resonanca) signala, saj ne vsebujejo nesparjenega elektrona (spinske pasti so diamagnetne molekule). Spinske pasti lahko reagirajo s kratkoživimi radikali kot sta npr. hidroksilni radikal (OH^\bullet) ali superoksidni radikal (O_2^\bullet). Nastane paramagnetna molekula (običajno nitroksid), ki daje EPR signal.
- Izraz **spinski označevalec** se v širšem pomenu besede nanaša tako na spinske sonde kot tudi na kovalentno pripete paramagnetne dele (makro)molekul ali paramagnetne reagente, ki jih uporabljamo za označevanje. V ožjem pomenu besede je spinski označevalec molekula ali del (makro)molekule, ki daje EPR signal (paramagnetna molekula) in jo lahko kovalentno vežemo na neko drugo (makro)molekulo. S spinskim označevalcem torej (preko kovalentne vezave) spinsko označimo sicer diamagnetno molekulo, ki po kovalentni vezavi spinskega označevalca daje EPR signal (primer je spinsko označevanje proteinov).



Slika 1. Primer strukture spinske sonde, spinske pasti in spinskega označevalca (v ožjem in širšem pomenu besede).

Osnovna ideja spinskega označevanja je modifikacija izbranih mest preiskovanega materiala s specifičnimi spojinami – običajno nitroksidi –, ki jih vežemo kovalentno (v tem primeru govorimo o spinskih označevalcih (ang. *spin label*)) ali nekovalentno (v tem primeru govorimo o spinskih sondah (ang. *spin probe*)). Lastnosti tako vezanega nitroksida omogočajo spremljanje stanja biološkega matriksa v okolici nitroksida z ustreznimi fizikalnimi metodami, najbolj običajno z EPR spektroskopijo. Prednost metode spinskega označevanja je predvsem v pridobivanju direktne informacije o lokalni strukturi, mobilnosti, mikropolarnosti, kislosti, redoks statusu in elektrostatskem potencialu dela molekule, kjer se nahaja spinski označevalec ali spinska sonda. [1]

Rotacija in intramolekularno gibanje molekule v kondenzirani fazi sta v veliki meri modulirana z molekularno dinamiko drugih molekul v okolici. Vzroka temu sta relativno tesno pakiranje molekul tekočin in trdnih snovi ter obstoj statičnih in dinamičnih defektov v takšnih sistemih. [1]

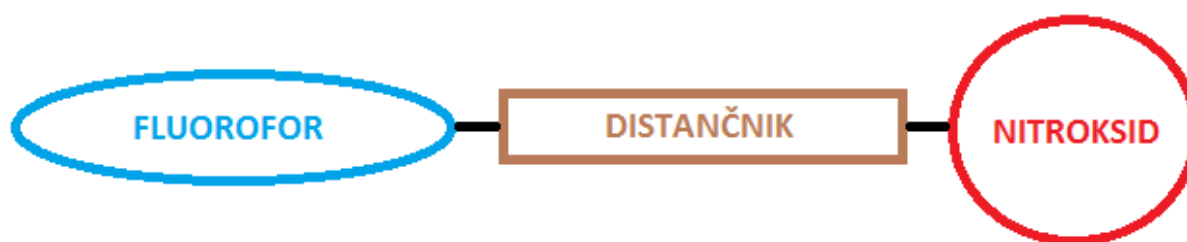
Moderne EPR tehnike (npr. CW ESR – *continuous wave electron paramagnetic resonance*, pulzne EPR metode, ED EPR – *echo-detected EPR*, multifrekvenčna ESR spektroskopija, ESRI – *ESR imaging* in MRI – *magnetic resonance imaging*) v kombinaciji z računskimi pristopi prinašajo širok spekter metod za proučevanje molekularnega gibanja nitroksidov. Kombinacija teh tehnik omogoča dostop do dinamičnih procesov okarakteriziranih s širokim spektrom korelacijskih časov in do meritev molekularnega gibanja nitroksida z omenjenimi korelacijskimi časi ter amplitudo (*ending low-amplitude high-frequency vibration*). Meritve parametrov spinske relaksacije omogoča preučevanje vibracijskih procesov v mediju. Molekularno dinamično stanje sistema, ki ga opazujemo, je mogoče razbrati tudi z meritvami dinamičnih interakcij med nitroksidi in drugimi paramagnetnimi entitetami, ki so vključene v opazovani sistem. [1]

1.2 Dvojne fluorescenčno-spinske sonde kot orodja za proučevanje molekulske dinamike

Dvojne fluorescenčno-spinske sonde in pasti so se pojavile kot rezultat iskanja novih, hitrih in občutljivih metod za analizo antioksidativnih lastnosti bioloških sistemov ter novih načinov proučevanja molekulske dinamike. Izkazale so se tudi kot prikladni modeli za proučevanje biofizikalnih in biokemičnih procesov. [1]

Osnovna ideja je vključevala združitev kromofora (fluorofora) in nitroksida v eni molekuli za proučevanje mobilnosti takšne sonde. Pri spojinah tega tipa se izkorišča dejstvo, da stabilen nitroksiden radikal deluje kot močan intramolekulski dušilec (ang. *quencher*) ekscitirane oblike kromofora (nitroksid sicer intramolekulsko in intermolekulsko duši fluorescenco fluorofora, vendar je prispevek intramolekulskega dušenja precej večji). [1]

Večina dvojnih fluorescenčno-spinskih sond (spojin tipa fluorofor-nitroksid) vsebuje dve subfunkcionalni enoti molekule (kromofor oz. fluorofor in nitroksid), ki sta povezani z distančnikom (ang. *spacer*). Nitroksid deluje kot močan intramolekulski dušilec fluorescence kromofornega dela molekule. Če se nitroksid v molekuli dvojne fluorescenčno-spinske sonde reducira do hidrosilamina, oksidira do oksoamonijevega kationa ali reagira s C-radikalom, molekula izgubi EPR signal. Poveča se fluorescenca takšne spojine (poveča se kvantni izkoristek fluorescence), saj zaradi odsotnosti nitroksida ni več dušenja fluorescence. Substrati, ki reagirajo z nitroksidnim delom molekule, posledično zmanjšujejo z nitroksidom povzročeno intramolekulsko dušenje fluorescence fluorofora, zato pride do povečanja intenzitete fluorescence kromofora. Prav tako pa tekom takih reakcij nitroksid izgublja EPR signal. Možne so razne optimizacije fluorescence, EPR signala in redoks lastnosti dvojnih fluorescenčno-spinskih sond s spreminjanjem dolžine in strukture distančnika med kromoforom in nitroksidom, strukture fluorofora in strukture nitroksidnih delov molekule. [1]



Slika 2. Shema dvojne fluorescenčno-spinske sonde predstavljena z osnovnimi subfunkcionalnimi enotami molekule (fluoroforom, distančnikom in nitroksidom).

Dvojne fluorescenčno-spinske sonde ohranijo lastnosti fluorescence fluorofora in lastnosti nitroksidnih spinskih sond, poleg tega pa imajo več drugih prednosti, kot so:

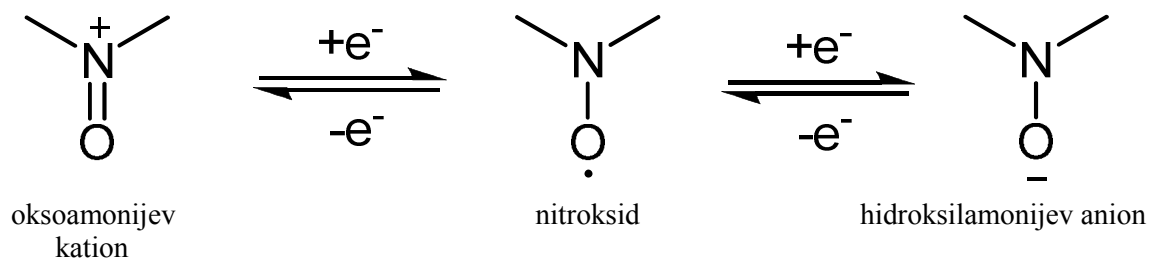
- možnost spremljanja (ang. *monitoring*) kinetike intramolekulskega dušenja fluorescence in elektronskih prenosov
- pridobivanje prostorsko in časovno odvisnih informacij tako o fluorescenci kot tudi o EPR obnašanju specifičnega dela sistema, ki ga opazujemo
- ocenjevanje mikropolarnosti in molekulske dinamike medija v bližini dveh različnih segmentov dvojnega fluorescenčno-spinske sonde (fluorofora in nitroksida)
- spremljanje procesov in sistemov katerekoli optične gostote z EPR tehniko in spremljanje pri nizki optični gostoti s spremljanjem fluorescence, ki je za dva ali tri velikostne rede bolj občutljiva kot EPR tehnika ali optična absorpcijska spektroskopija [1]

Metodo uporabe dvojnega fluorescenčno-spinskih sond lahko skupaj z meritvami fluorescence in EPR tehniko uspešno uporabimo za proučevanje lokalne molekulske dinamike medija in fotofizikalnih ter fotokemijskih efektov v kompleksnih bioloških sistemih, kot so proteini in biološke membrane. Takšne spojine je v smislu redoks senzorjev oz. spinskih pasti možno uporabiti tudi kot modele za fotokemijske in fotofizikalne procese ter kot materiale za fotostikala (ang. *photoswitching*). Ker so se dvojne fluorescenčno-spinske sonde začele uporabljati kasneje kot spinske sonde, je z uporabo prvih narejenih precej manj raziskav kot z uporabo drugih. [1]

1.3 Nitroksidne redoks sonde in pasti

Reakcije oksidacije in redukcije (redoks reakcije) so pomembne v živih organizmih, saj imajo ključno vlogo pri kemičnih, fotokemičnih in bioloških procesih pridobivanja energije. Po drugi strani pa so redoks reakcije vključene tudi v destruktivne procese, ki škodujejo živim organizmom (npr. nastanek reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti v živih organizmih). Nitroksidni radikali in spinske pasti (glej sliko 1) se pogosto uporabljajo za kvantitativno karakterizacijo redoks procesov in radikalskih poškodb v celicah ter celičnih organelih. Za proučevanju takšnih procesov se uporabljajo spinske-redoks sonde, ki izkoriščajo lastnost nitroksidov ter odgovarjajočih hidroksilaminov, da nastopajo v sledečih reakcijah: [2]

- redukcija nitroksida z reducentom do hidroksilamina
- oksidacija nitroksida do oksoamonijevega kationa
- oksidacija hidroksilamina z oksidantom do nitroksida



Slika 3. Redoks pretvorbe nitroksida do hidroksilamin aniona (redukcija) in oksoamonijevega kationa (oksidacija).

Nitroksidi se ne oksidirajo zlahka. Hitreje se reducirajo do hidroksilaminov. Redoks potencial za takšne pretvorbe je seveda različen za različne nitrokside (nitroksidi z različno strukturo imajo različne redoks potenciale) – npr. redoks potencial piperidinskih derivatov nitroksidov je dovolj velik, da takšni nitroksidi oksidirajo nekatere molekule, ki jih najdemo v bioloških sistemih, kot so askorbat, semikinoni in superoksidni radikali; pirolidinski nitroksidi so bolj stabilni na redukcijo z askorbatom v nevtralni raztopini v primerjavi s piperidinskimi nitroksidi itd. Derivati hidroksilaminov, ki nastanejo z redukcijo nitroksidov, se lahko direktno oksidirajo s superoksidnimi radikali, ali pa ob prisotnosti kisika in kovinskih ionov, ki so sposobni eno elektronskih redoks reakcij (Fe^{3+} , Cu^{2+} ioni). Omenjene lastnosti nitroksidov omogočajo njihovo uporabo kot spin-redoks sonde. Zahteve za učinkovite spin-redoks sonde so naslednje:

- dajo intenziven EPR signal, ki ga brez težave razberemo in interpretiramo
- hitro reagirajo s svojim reakcijskim partnerjem
- so specifične v smislu reakcije s točno določenim redoks reagentom
- možen izbor več nitroksidov, ki pokrivajo širok spekter redoks potencialov
- so kemijsko stabilne v stiku z neradikalnimi spojinami
- so kompatibilne z lastnostmi sistema, ki ga proučujemo, v smislu prisotnosti raznih kemijskih skupin, ki vplivajo na njihovo kemijsko reaktivnost, hidrofobnost, elektrostatski potencial
- niso toksične *in vivo*
- so komercialno ali sintezno dostopne (oz. enostavne za sintezo)

Poleg klasičnih nitroksidnih spojin, ki jih uporabljamo kot spinske-redoks sonde in detektiramo z EPR-spektroskopijo, lahko uporabljamo tudi dvojne fluorescenčno-spinske pasti, ki jih uporabimo kot redoks senzorje oz. redoks sonde. Reakcije slednjih lahko poleg uporabe EPR meritev spremljamo tudi z meritvijo fluorescence – opazujemo intramolekulsko dušenje fluorescence fluorofora zaradi prisotnosti nitroksida ter upad dušenja fluorescence (porast intenzitete fluorescence) zaradi pretvorbe nitroksida v hidroksilamin. Ob redukciji (lahko gre za fotoredukcijo ali kemijsko redukcijo) nitroksidnega dela molekule se zmanjša intenziteta EPR signala, poveča pa se kvantni izkoristek fluorescence. [2]

Dvojne fluorescenčno-spinske sonde lahko v kombinaciji s fotoiniciatorji uporabimo za detekcijo nastanka radikalov v polimernih filmih. Z uporabo fluorescenčne spektroskopije in fluorescenčnega mikroskopiranja v kombinaciji s fotoiniciacijo je možno proučevati nastanek

fotokislina-generatorja – nastanek le-tega ima za posledico porast fluorescence zaradi reakcije dvojne fluorescenčno-spinske sonde s C-radikali. [2]

Z dvojnimi fluorescenčno-spinskimi pastmi lahko detektiramo tudi hidroksilne radikale, ki nastanejo iz vodikovega peroksida v Fentonovi reakciji v mikromolarnih koncentracijah. Splošno gledano metodologija uporabe dvojnih fluorescenčno-spinskih pasti omogoča vpogled v biokemijski pomen reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (zlasti superoksidov, dušikovega oksida in vodikovega peroksida). [2]

Na področju uporabe redoks sond in pasti je bilo do sedaj narejenih več raziskav z nitroksidnimi redoks sondami in pastmi kot pa z uporabo dvojnih fluorescenčno-spinskih sond in pasti, saj so se zadnje začele uporabljati kasneje.

1.4 Spinsko označevanje v biokemiji in biofiziki

1.4.1 Proteini in encimi

Poleg že omenjenih področij uporabe je metodo spinskega označevanja možno uporabiti tudi pri proučevanju encimov in drugih proteinov ter na področju biofizike. Spinske in fluorescenčno-spinske označevalce je možno vključiti v izbrane dele makromolekul preko vezave s kovalentnimi vezmi, z adsorpcijo ali genetsko z uporabo označenih aminokislin. S pomočjo tako vezanih spinskih oz. fluorescenčno-spinskih označevalcev ali sond lahko proučujemo [3]:

- rotacijsko difuzijo in nihanje (ang. *wobbling*) oz. konformacijski prostor označevalcev
- hitrostno konstanto dinamične spinske izmenjave med nitroksidi ter nitroksidi in drugimi paramagnetnimi molekulami
- statično spinsko izmenjavo in dipol-dipol interakcije med nitroksidi in nitroksidi ter drugimi paramagnetnimi molekulami
- dipol-dipol interakcije med spinom nitroksidnega elektrona in spinom protona oz. jedrnim spinom
- dušenje singletnih in tripletnih ekscitiranih stanj naravnih in umetnih kromoforov z nitroksidi

Zgoraj omenjene meritve omogočajo proučevanje strukturnih in dinamičnih lastnosti proteinov in encimov, ko so: razdalje med izbranimi funkcionalnimi skupinami; lokalna intramolekulska dinamika (molekulska “dihanje”); rotacijska difuzija makromolekul; konformacijski prehodi; porazdelitev elektrostatskega potenciala preko molekul; mikrostruktura vezavnih mest (tudi aktivna mesta encimov); lokalni pH v različnih delih molekul; lokalna polarnost (navidezna dielektrična konstanta); in kinetika encimskih reakcij.

Prav tako lahko spremljamo učinke zunanjih dejavnikov – temperature, ionske moči, pH-ja, sestave, koncentracije substrata in inhibitorja – na te parametre. [3]

Molekulska dinamika proteinov je ključni dejavnik, ki vpliva na glavne lastnosti proteinov - encimsko katalizo, konformacijske prehode, medmolekulsko prepoznavanje in stabilnost. Od konca 60-ih let prejšnjega stoletja pa do danes je bilo razvitih več metod proučevanja dinamike proteinov, ki vključujejo uporabo označevanja proteinov (fluorescenčno označevanje, spinsko označevanje in kombinacija obojega z uporabo dvojnih fluorescenčno-spinskih označevalcev, ter označevanje z radioaktivnimi izotopi), NMR spektroskopije, optične spektroskopije, fluorescenčne spektroskopije, diferencialne dinamične kalorimetrije (DSC; ang. *differential scanning calorimetry*), rentgenske kristalografije in tehnik nevtronskega razprševanja (ang. *neutron scattering*). Vpeljava biofizikalnih označevalnih metod, kot je označevanje makromolekul z nitroksidi, je bil eden ključnih korakov, ki je preko EPR meritev omogočal spremljanje intramolekulske dinamike proteinov. Več raziskav je bilo narejenih z uporabo spinskih označevalcev kot pa z uporabo dvojnih fluorescenčno-spinskih označevalcev, saj so se zadnji začeli uporabljati kasneje. [3]

1.4.1.1 Konformacijske spremembe v proteinih in encimih ter mehanizem intramolekulske dinamike

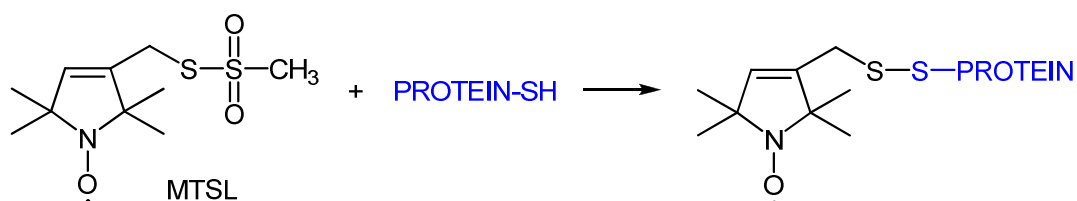
Metoda spinskega označevanja se uspešno uporablja za detekcijo različnih tipov konformacijskih sprememb. Sem spadajo npr. denaturacija in procesi zvijanja ter razvijanja proteinov, preddenaturacijski fenomeni, transglobularni alosterični prehodi, interglobularni alosterični prehodi, konformacijski prehodi v aktivnih mestih encimov. Prva omemba alosteričnih učinkov je sledila spinski označbi konjskega hemoglobina. Rezultati študije so pokazali, da se pri vezavi kisika v aktivno mesto hemoglobina, komponente EPR spektra razcepijo. Raziskave na posameznih podenotah hemoglobina so pokazale, da do glavnih alosteričnih učinkov pride na površini β -podenot v področju stika z α -podenotami. [3]

1.4.1.2 Struktura encimskih aktivnih centrov

Z uporabo spinskega označevanja z nitroksidi je možno raziskovati tudi aktivne centre encimov oz. mehanizme katalize. Prva študija tega tipa je vključevala uporabo spinsko označenega substrata za aktivno mesto encima α -kimotripsina. Tekom te študije so odkrili, da je bila mobilnost spinskega označevalca signifikantno hitrejša, kot pa je bila hitrost celega globularnega encima (mobilnost so spremljali z EPR spektroskopijo). Zanimiv poizkus je bil narejen tudi tekom študije aktivnega centra gliceraldehid-3-fosfataze. Sintetizirali so več sond, ki so bile analogne NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid) in ATP (adenozintrifostat). Sonde so vsebovale ^2H in ^{15}N . Spin-spin dipol-dipol razcepitev v EPR spektru označenega encima je odgovarjala 1,2 nm razdalji med nitroksidi, kar se je skladalo s podatki pridobljenimi z rentgensko kristalografijo. [3]

1.4.2 Usmerjeno spinsko označevanje – *Site-Directed Spin-Labeling (SDSL)*

Uporaba načrtnih usmerjenih mutacij v kombinaciji EPR spektroskopijo je botrovala rojstvu nove spinsko-označevalne metode z uporabo nitroksidov. Z uporabo znanj molekulske genetike je možno modificirati izbrano aminokislino (in s tem peptid ali protein) ali pa nukleotid (in s tem DNK ali RNK) z drugo izbrano odgovarjajočo kemijsko entiteto (npr. z nitroksidom označena aminokislina ali nukleotid). Z uporabo modernih EPR metod (EPR pri visokem polju, pulzirajoči EPR, multikvantni EPR in EPRI) je možno pridobiti podrobno informacijo o molekulski strukturi in dinamiki označene regije. Glavna prednost SDSL je možnost, da gremo preko omejitev uporabe aminokislin, ki so primerne za označevanje v nativnih proteinih. Široko uporabljen postopek v proteinskem SDSL je namreč zamenjava izbrane aminokislina za cistein preko točkovne mutacije. Novo vstavljeni cistein nato kemično modificiramo z nitroksidnim radikalom, ki vsebuje reaktivno skupino preko katere je omogočena kovalentna vezava nitroksida na –SH skupino cisteina v proteinu (na cistein kovalentno pripnemo spinski označevalec – glej sliko 4). Takšen nitroksid je npr. 1-oksi-2,2,5,5,-tetrametil-3-pirolin-3-(metil)metantiosulfonat (MTSL). [3]



Slika 4. Primer kovalentne vezave spinskega označevalca na protein. MTSL (spinski označevalec) se veže na prosto cisteinsko –SH skupino v proteinu (nastane disulfidna vez); rezultat je spinsko označen protein. [3]

Med topnimi proteini so na takšen način najprej proučili spinsko-označen lizocim, ki se je izkazal kot primeren model za raziskovanje strukture, dinamike in konformacijskih sprememb proteinov in encimov. Z enako tehniko so proučili tudi rodopsin in bakterijski rodopsin, pri čemer so prišli do informacij o strukturi in strukturnih spremembah različnih regij v obliki zank, ki niso na voljo s kakšno drugo metodo. Preiskovali so tudi mišične proteine – študirali so npr. dinamiko hidrofobne zanke aktina, in sicer tako, da so se poslužili štirih mutacij z vključitvijo cisteina v strukturo. Med drugim so prišli do spoznanja, da pozicija zanke v filamentu v raztopini lahko zavzame različna konformacijska stanja, ki stabilizirajo ali destabilizirajo filament. Nenazadnje so z SDSL metodo preiskovali tudi membranske proteine v *E.coli* in pa aktivacijo fosfatidilholina v človeškem srcu z (*R*)-3-hidroksibutirat dehidrogenazo (BDH), ki v aktivnem mestu niso vsebovale sulfhidrilnih skupin. [3]

1.4.3 Biološke membrane

Metoda spinskega označevanja je uporabna zlasti za kvantitativne meritve kemičnih, biokemičnih in fizikalnih procesov v bioloških membranah in modelnih membranah, ki simulirajo biološke membrane. Pri uporabi spinskih in fluorescenčno-spinskih označevalnih metod za proučevanje bioloških membran, je pomembna informacija o poziciji samega označevalca znotraj biološke membrane. S proučevanjem lokalizacije nitroksidne komponente spinskih sond v bioloških membranah relativno glede na vodno in lipidno fazo je bilo dokazano, da obstaja več različnih konformacij, ki jih ista spinska sonda zavzame v različnih bioloških membranah. Razvita je bila tudi metoda za merjenje globine sidranja fluorofora v biološki matriks (biološko membrano ali protein). Metoda temelji na dušenju fluorescence kromofora z nitroksidno sondo, ki je raztopljena in difundira skozi raztopino. Pri tem pride do interakcij izmenjave na daljših razdaljah med nitroksidom in fluoroforom. Micele, ki so enostaven model biološke membrane, lahko ovrednotimo s pomočjo spinskih sond ter dvojnih fluorescenčno-spinskih sond z uporabo SPPEPR (*spin-probe-partitioning electron paramagnetic resonance*) in TRFQ (*time-resolved fluorescence quenching*) eksperimentov. Metoda spinskega označevanja je uporabna tudi pri določevanju koncentracijskih profilov kisika in vode v bioloških membranah. [3]

Biološke in druge membrane imajo svojo mikrostrukturo. V nekaterih delih membrane so molekule bolj pravilno urejene, v drugih pa manj. Govorimo o manj urejeni tekoči fazi in bolj urejeni gelski fazi, ki sta v ravnotežju. Obe fazi lahko karakteriziramo preko porazdelitvenega koeficienta spinskega označevalca in njegovih dinamičnih parametrov, ki jih pridobimo s prilagajanjem EPR spektra dinamičnim modelom. Proučevanje dinamike membran je še eno področje, kjer je možna uporaba spinsko-označenih sond. Pri vezavi takšnih označevalcev na različnih mestih na alifatski verigi in z uporabo visokofrekvenčne EPR spektroskopije je bilo ugotovljeno, da je rotacija nitroksida v določenem temperaturnem območju anizotropna. To pomeni, da ima nitroksid v različnih smereh različne fizikalne lastnosti, kar pomeni, da je v membrani bolj omejen oz. manj gibljiv. Poleg vpliva temperature na gibljivost spinskih sond v membrani je prav tako možno proučevanje vpliva zunanega tlaka na gibljivost takšnih sond. Spinske sonde lahko pri povečevanju zunanega tlaka preidejo iz vezikularne faze v vodno fazo. [3]

Interakcija med proteinom in lipidom je pomemben faktor, ki določa stabilno termodinamsko asociacijo membranskega proteina z lipidi. Interakcija protein-lipid se spreminja z dolžino acilne verige lipidnih komponent v membrani. Z daljšanjem acilnih verig lipidnih komponent membrane pride do: sprememb konformacijskega prostora aminokislinskih stranskih verig; sprememb konformacije ogrodja proteina; sprememb nagibnih kotov transmembranskih segmentov proteina; sprememb vključevanja proteina v membrano ali njegovega agregatnega stanja v membrani; sprememb ureditve acilnih lipidnih verig. Z večanjem dolžine acilne verige pride tudi do faznega prehoda v nelamelarne strukture vključene v fosfolipidni dvosloj. Primer proučevanja interakcije protein-lipid je bila študija vključevanja bakteriofagnega proteina M13 v fosfolipidni dvosloj s podaljševanjem acilne verige. Pri študiji so uporabili

metodo SDSL v kombinaciji z EPR in CD. Zanimiva je tudi študija, pri kateri so modificirali fosfolipide z nitroksidnimi spinskimi označevalci. Zaradi prisotnosti nitroksida je prišlo do dušenja fluorescence triptofanskih ostankov, ki so jih s substitucijo namestili v strateška mesta izooblike citokroma P 450 CYP2C2 in tako identificirali regije citokroma, ki so se vstavile v membrano ter določili globino sidranja. [3]

Za aplikacijo metode spinskega označevanja na biološke in modelne membrane je na voljo več podatkov kot za uporabo in aplikacijo metode dvojnega fluorescenčno-spinskega označevanja, saj so se dvojne fluorescenčno-spinske sonde in označevalci začeli uporabljati kasneje kot spinske sonde in označevalci. Primer uporabe dvojne fluorescenčno-spinske sonde je znanstvena raziskava, pri kateri so s takšno sondo ocenili lokalno reaktivnost antioksidantov v micelih (model biološke membrane). V micele so vgradili dvojno fluorescenčno-spinsko sondo, nato pa te micele izpostavili raztopinam različnih antioksidantov, ki so vsebovali kislino $-\text{COOH}$ oz. eno ali več kisljih fenolnih $-\text{OH}$ skupin. Uporabili so naslednje antioksidante: Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonsilna kislina; vodotopen derivat vitamina E), BHT (butilhidroksitoluen), kavno kislino, galno kislino in kvercetin. Po vstopu antioksidanta v micel je potekla reakcija prenosa vodika iz kisljih skupin omenjenih antioksidantov na nitroksid v dvojni fluorescenčno-spinski sondi. Tekom te reakcije je fluorescenca raztopine naraščala, saj se je nitroksid v dvojni fluorescenčno-spinski sondi pretvarjal v hidroksilamin, ki nima sposobnosti dušenja fluorescence kromofora. Hitrost naraščanja fluorescence je korelirala s hitrostjo vstopanja antioksidanta v micel z vgrajeno dvojno fluorescenčno-spinsko sondo. Proces je bil odvisen predvsem od vrste uporabljenega micela (SDS ali triton-x-100), hidrofobnih lastnosti antioksidantov in polarnosti uporabljenega topila za pripravo raztopine antioksidantov. S časovno odvisno meritvijo fluorescence so določili opazovane (navidezne) hitrostne konstante vstopanja antioksidantov v micel, ki so odražale predvsem hidrofobne lastnosti antioksidantov. [35]

1.4.4 Nukleinske kisline

Splošni principi aplikacije nitroksidov za reševanje problemov strukture in dinamike DNK in RNK so podobni kot pri proteinih in polimerih. Vendarle obstaja nekaj specifičnih značilnosti, ki se pojavljajo na tem področju – najpomembnejše so: usmerjeno in specifično označevanje oligonukleotidov z nitroksidi; identifikacija določenega genoma; kompleksacija nukleinskih kislin s proteini, membranami ter protitumorinimi učinkovinami; spinsko lovljenje DNK radikalov. Glavni so trije trendi, ki so splošni in veljajo tako za DNK kot za RNK: (1) uporaba novih metod označevanja nukleinskih kislin; (2) študija okolice (»pokrajine«) in dinamike v bližini pozicije spinskega označevalca; (3) meritev razdalje med dvema mestoma. [3]

Pomemben korak pri proučevanju katerekoli nukleinske kisline je njena kemijska modifikacija z nitroksidnim spinskim označevalcem. Obstaja več metod, ki vključujejo:

kovalentno pripenjanje nitroksida na nukleotidne baze ali ribozne glukozilne obročje; alkilacijo –SH skupin; interkalacijo; encimatsko sintezo z uporabo označene baze; kompleksacijo s paramagnetnimi ioni. Novejši pristop vključuje sintezo specifičnih nitroksidnih derivatov, ki se vežejo na 4- ali 5-mesto pirimidinov preko alkilacije. [3]

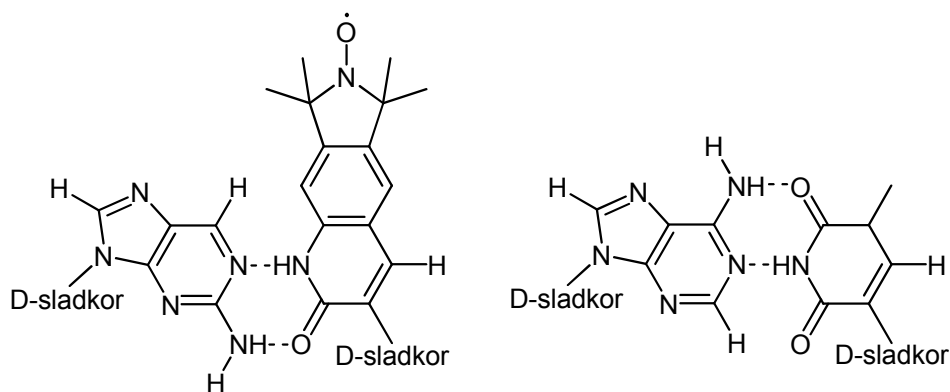
Usmerjeno spinsko označevanje (SDSL) nam ponuja podrobnejšo informacijo o mikrostrukturi in dinamiki nukleinskih kislin. V SDSL študijah se najpogosteje uporablja MTSL (1-oksi-2,2,5,5,-tetrametil-3-pirolin-3-(metil)metantiosulfonat), predvsem zaradi specifičnosti reakcije s sulfhidrilnimi (-SH) skupinami ter zaradi majhnega molekulskega volumna. Vendarle pa fleksibilnost tega označevalca povzroča probleme pri interpretaciji EPR spektra preiskovane nukleinske kisline. [3]

Na opazovan EPR spekter vplivajo tri različna gibanja: (1) obračanje celotne molekule; (2) torzijske oscilacije okrog vezi, ki povezujejo nitroksidno komponento z makromolekulo; (3) lokalno valovanje strukture makromolekule pri označenem mestu. Na področju meritev razdalj lahko z analizo efekta spin-spin izmenjave in dipol-dipol interakcij na obliki linij EPR spektra nitroksida merimo interspin razdalje v območju od 0,4 do 2,5 nm. Pri analizi CW EPR saturacijskih krivulj in pulznih metodah (kot je PELDOR) lahko ocenimo razdalje do 70 Å natančno. [3]

Za uporabo dvojnih fluorescenčno-spinskih označevalcev in pasti pri raziskavah na nukleinskih kislinah je zaenkrat na voljo manj podatkov kot za uporabo klasičnih nitroksidnih označevalcev.

1.4.4.1 DNK

Tudi pri proučevanju strukture in dinamike molekul DNK so bile uporabljene metode označevanja DNK z nitroksidi (spinsko označevanje DNK in metoda SDSL) in njihovimi derivati. Uporabne so npr. meritve razdalj med spinskimi označevalci, ki jih vežemo na izbrane pozicije v DNK, z DEER (*double electron-electron resonance*). Pri tem izbrane sekvence v nukleinski kislini zamenjamo z fosforotioati, te pa nato označimo z nitroksidi. Izmerjene razdalje lahko primerjamo z izračunanimi razdaljami sterično ugodnih konformacij. Iz študije fleksibilnosti serije DNK molekul, pri kateri so usmerjeno in rigidno vstavili spinske označevalce v segmente DNK velike 14-100 bp (bazni par), so ugotovili, da so purin-purin odseki in pirimidin-pirimidin odseki približno povprečno fleksibilni, pirimidin-purin odseki so skoraj 2x bolj fleksibilni, nasprotno pa so purin-pirimidin odseki le polovico toliko fleksibilni, kot je fleksibilna povprečna DNK. [3]

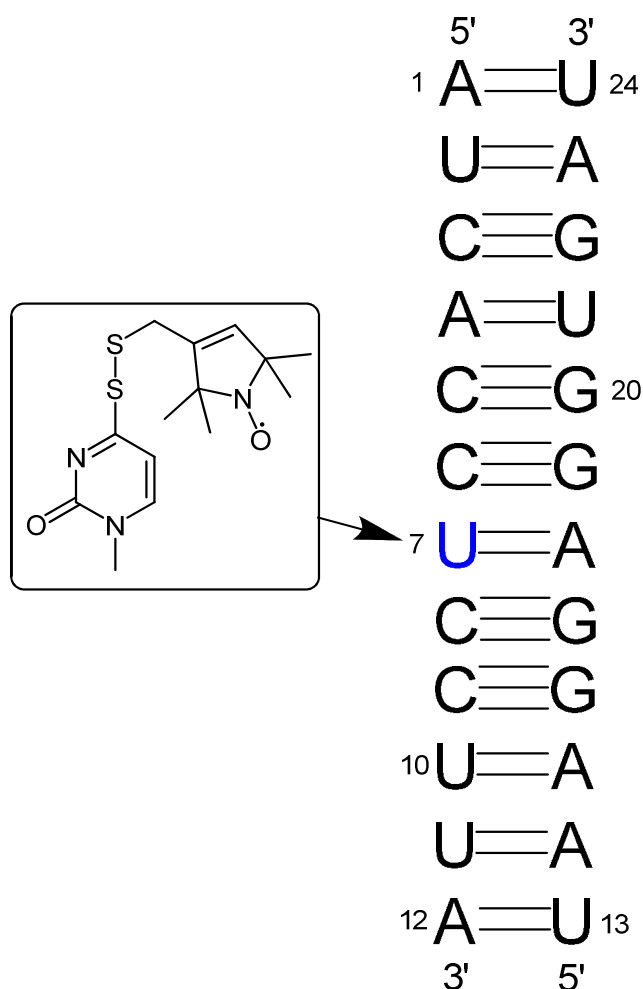


Slika 5. Primer rigidno vezanega spinskega označevalca v baznem paru (levo) v primerjavi z naravnim adenzin-timidin baznim parom (desno). [3]

Eden izmed načinov identifikacije iskanih segmentov DNK je priprava oligonukleotidov označenih z nitroksidi (fleksibilna oznaka, ne rigidna), ki jih lahko uporabimo kot molekulske senzorje. Na takšen način lahko identificiramo in celo kvantificiramo iskane segmente DNK z uporabo EPR spektroskopije. Pri tem načinu uporabe spinskih označevalcev se pogosto uporablja tudi SDSL (usmerjeno spinsko označevanje). Za meritve razdalj med označenimi deli lahko uporabimo meritev s PELDOR (*pulse electron - electron double resonance*). V splošnem se metode spinskega označevanja lahko poslužujemo tudi, kadar nas zanima dinamika molekule DNK kot take oz. kakšnega določenega segmenta te makromolekule. [3]

1.4.4.2 RNK

Pri raziskovanju RNK se uporablja tehnika usmerjenega spinskega označevanja (SDSL) za študije kompleksne 3D strukture te molekule. Podobno kot pri proteinski SDSL se pri RNK poslužujemo usmerjenega pripenjanja nitroksida oz. njegovega derivata, z namenom pridobivanja informacij o lokalni strukturi preko analize EPR spektra nitroksida. Možno je tako spremljanje strukture RNK v raztopini, kot tudi spremljanje specifične konformacijske spremembe na specifičnih mestih RNK molekule. Možen pristop je npr. pripenjanje nitroksidnega derivata z reaktivno –SH skupino (npr. 1-oksil-3-metansulfoniltiometil-2,5-dihidro-2,2,5,5,-tetrametil-1H-pirol) na uracil v RNK oz. na modificiran derivat uracila (npr. 4-tio derivat; glej sliko 6).



Slika 6. Primer spinskega označevanja RNK preko modificiranega uracila, ki je označen z nitroksidom. [3]

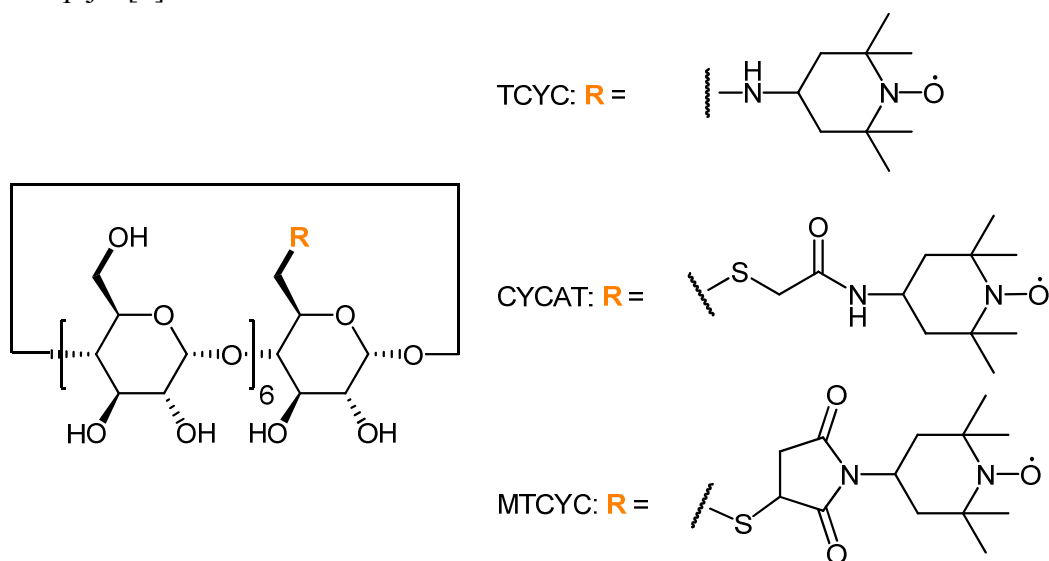
1.4.5 Polisaharidi

1.4.5.1 Bombaž in celuloza

Polisaharidi so sestavni del imunoglobulinov in drugih glikoproteinov, kot so bombažna vlakna, celuloze, dekstrini itd. S spinsko označevalno metodo je tudi pri takšnih polisaharidnih spojinah možno preiskovati mikrostrukturo, molekulsko dinamiko in konformacijske prehode. V splošnem so metode modifikacije polisaharidov z nitroksidnimi označevalci podobne kot za označevanje riboze in glikozilnih obročev nukleinskih kislin. [3] Spinsko označevalna metoda je bila npr. uporabljena za preiskovanje odvisnosti EPR parametrov spinsko označenih bombažnih vlaken v tekočem mediju od viskoznosti in temperature, termalnih plastičnih prehodov celuloze, supermolekulske strukture bombažne celuloze, učinkov UV-sevanja na mikrostrukturo bombaža in sprememb v strukturi bombažne celuloze tekom biosinteze. [3]

1.4.5.2 Ciklodekstrini

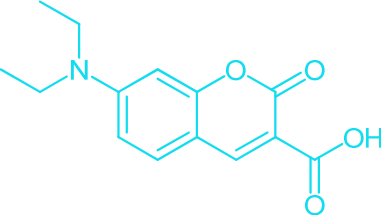
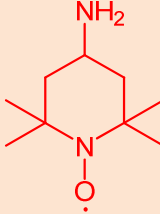
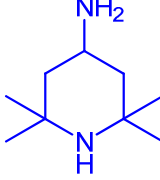
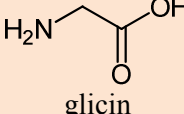
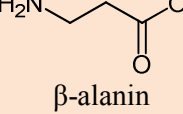
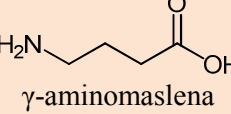
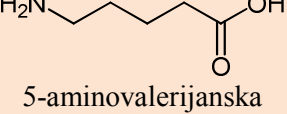
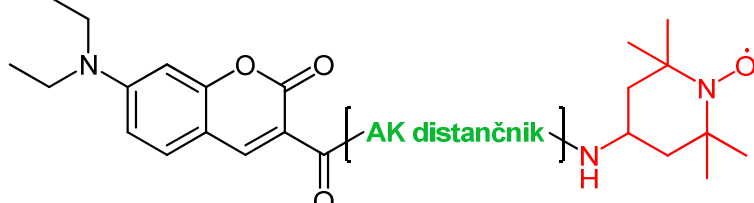
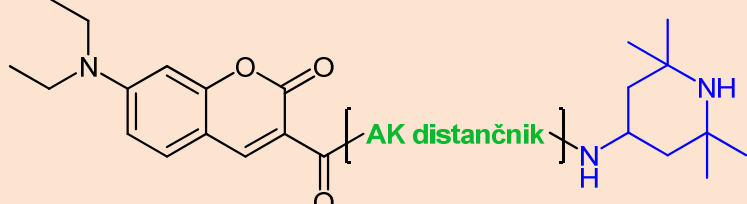
Aplikacija spinsko označevalnih metod na ciklodekstrine ima 3 glavne cilje: (1) preiskovanje nastanka inkluzijskih kompleksov med nitroksidi različnih struktur in z različnimi dekstrini; (2) preiskovanje dinamike sond in substrata v samih kompleksih; (3) uporaba dekstrinov za lovljenje in stabilizacijo spinskih sond in radikal-nitron aduktov. Primer uporabe spinsko označevalne metode na tem področju je spremljanje inkluzijskih kompleksov med fenolftaleinom oz. 1-adamantilaminom in spinsko označenimi β -ciklodekstrini z uporabo EPR spektroskopije. [3]



Slika 7. Primer spinsko označenih ciklodekstrinov. [3]

2. NAČRT ZA DELO

Prisotnost nitroksida v molekuli, ki sicer vsebuje fluorofor, ima za posledico zmanjšano fluorescenco takšne molekule. Efekt dušenja fluorescence z nitroksidom pogosto izkoriščamo kot orodje za raziskave na različnih področjih, kjer je potrebno pridobiti podatek o mikrookolju – podatek o pH, polarnosti, prisotnosti radikalskih procesov. Za pridobivanje teh informacij lahko uporabimo dvojne fluorescenčno-spinske sonde v kombinaciji s fluorescenčno spektroskopijo. Predvidevamo, da dušenje fluorescence, ki ga vrši nitroksid, pada z oddaljenostjo nitroksida od fluorofora (jakost dušenja fluorescence se zmanjšuje, če je nitroksid bolj oddaljen od fluorofora). Namen tega diplomskega dela je pripraviti serijo fluorescenčno-spinskih sond, ki bodo imele enak fluorofor (del molekule, ki fluorescira) in enak nitroksid (del molekule, ki duši fluorescenco fluorofora), vendar bosta ta dva dela molekule v isti spojini na različni oddaljenosti eden od drugega. Kot distančnik med fluoroforom in nitroksidom bomo uporabili aminokislino z različnim številom $-CH_2-$ skupin med $-COOH$ in $-NH_2$ skupino aminokislino: glicin, β -alanin, γ -aminomaslena kislina (GABA) in 5-aminovalerijanska kislina (5-AVA). Razlog za uporabo aminokislinskih distančnikov je v tem, da je amidna vez dokaj stabilna (v splošnem bolj kot estrska vez) in da je sinteza spojin, pri katerih tvorimo amidne vezi z reagenti sklapljanja (ang. *coupling reagents*), dokaj enostavna. Kot fluorofor bomo uporabili spojino kumarinskega tipa, in sicer 7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilno kislino, kot nitroksid pa spojino 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil. Ker bo potrebno oceniti vpliv dušenja fluorescence zaradi prisotnosti nitroksida v molekuli, bomo pripravili tudi serijo fluorescenčno-spinskih pasti, ki bodo strukturno analogne sintetiziranim fluorescenčno-spinskim sondam. Sintetizirane fluorescenčno-spinske pasti bodo namesto nitroksida vsebovala sekundarni amin, ki je strukturno analogen pri sintezi fluorescenčno-spinskih sond uporabljenemu nitroksidu. V ta namen bomo pri sintezi fluorescenčno-spinskih pasti na fluorofor oz. na aminokislinski distančnik vezali 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin. Vpliv dušenja fluorescence zaradi prisotnosti nitroksida bomo ovrednotili z uporabo fluorescenčne spektroskopije. Primerjali bomo fluorescenco strukturno analognih fluorescenčno-spinskih pasti in sond. Karakterizacija fluorescenčno-spinskih pasti in vmesnih produktov pri sintezi fluorescenčno-spinskih pasti in sond bo potekala z uporabo 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS, IR, elementne analize in meritve T_{tal} . Karakterizacija fluorescenčno-spinskih sond bo potekala z uporabo MS, IR, EPR, elementne analize ter meritve T_{tal} .

<p>Fluorofor</p>	 <p>7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karbonska kislina</p>			
<p>Nitroksid</p>	 <p>4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil</p>			
<p>Sekundarni amin (analogen uporabljenemu nitroksidu)</p>	 <p>4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin</p>			
<p>Aminokislina (distančniki)</p>	 <p>glicin</p>	 <p>β-alanin</p>	 <p>γ-aminomaslena kislina (GABA)</p>	 <p>5-aminovalerijanska kislina (5-AVA)</p>
<p>Struktura fluorescenčno-spinskih sond</p>				
<p>Struktura fluorescenčno-spinskih pasti</p>				

Slika 8. Spojine, potrebne za sintezo načrtovanih dvojnih fluorescenčno-spinskih sond in pasti (fluorofor, nitroksid, sekundarni amin in aminokislina); struktura dvojnih fluorescenčno-spinskih sond in pasti.

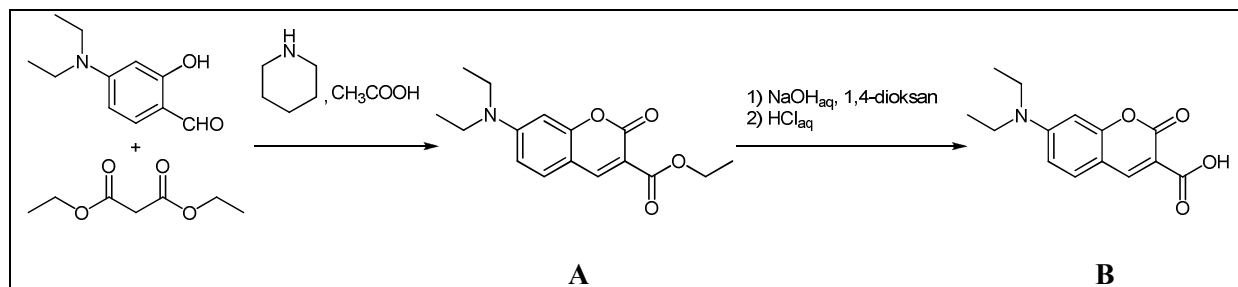
Delo bo potekalo na naslednji način (reakcijske sheme 1-8):

1. Pripravili bomo izhodno spojino 7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksilno kislino (**B**), tako da bomo izvedli ciklizacijo 4-(dietilamino)-2-hidroksibenzaldehida z dietilmalonatom do etil 7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksilata (**A**), le-tega pa hidrolizirali v bazičnem in uravnali pH.
2. Pripravili bomo z metilnim estrom zaščiteni aminokislini 4-metoksi-4-oksobutan-1-amonijev klorid (**C**) in 5-metoksi-5-oksopentan-1-amonijev klorid (**D**) iz GABA in 5-AVA z uporabo SOCl₂ ter MeOH.
3. Z uporabo reagenta za tvorbo peptidne vezi TBTU (*N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat) bomo pripravili 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**1**) iz izhodne spojine **B** in 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin.
4. Z uporabo reagenta za tvorbo peptidne vezi TBTU bomo pripravili tudi 7-(dietilamino)-*N*-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**2**) iz izhodne spojine **B** in 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila.
5. Pripravili bomo serijo spojin (metil 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)acetat (**3**); etil 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)propanoat (**7**); metil 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)butanoat (**11**); metil 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)pentanoat (**15**), in sicer tako, da bomo na izhodno spojino **B** s pomočjo reagenta za tvorbo peptidne vezi TBTU pripenjali zaščitene aminokislino glicin, β-alanin, GABA in 5-AVA (aminokislino bodo na –COOH skupini zaščitene v obliki metilnega ali etilnega estra).
6. Preizkusili bomo različne pogoje hidrolize odstranjevanja estrske zaščite iz spojin **3**, **7**, **11** in **15** ter tako dobili spojine s prosto –COOH skupino - to so spojine 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)ocetna kislina (**4**), 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)propanojska kislina (**8**), 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)butanojska kislina (**12**) in 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)pentanojska kislina (**16**).
7. Na spojine s prosto –COOH skupino **4**, **8**, **12** in **16** bomo s pomočjo reagenta za tvorbo peptidne vezi TBTU pripeli 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin in tako dobili spojine 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(2-okso-2-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)etil)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**5**), 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(3-okso-3-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)propil)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**9**), 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(4-okso-4-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)butil)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**13**) ter 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(5-okso-5-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)pentil)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**17**).
8. Na spojine s prosto –COOH skupino **4**, **8**, **12** in **16** bomo s pomočjo reagenta za tvorbo peptidne vezi TBTU pripeli tudi 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil in tako dobili spojine 7-(dietilamino)-*N*-(2-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**6**), 7-(dietilamino)-*N*-(3-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-3-oksopropil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**10**), 7-(dietilamino)-*N*-(4-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-

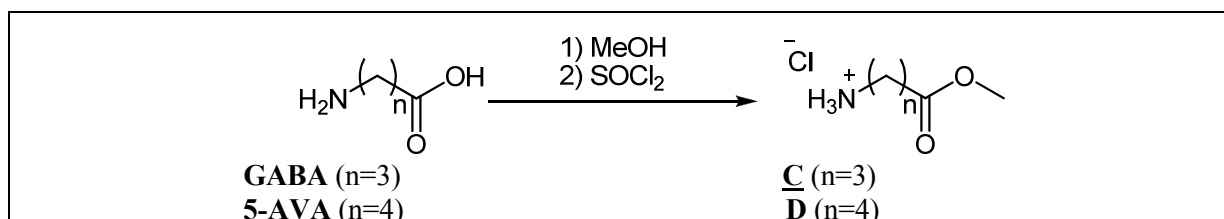
il)amino)-4-oksobutil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**14**) ter 7-(dietilamino)-*N*-(5-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-5-oksopentil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**18**).

2.1 REAKCIJSKE SCHEME

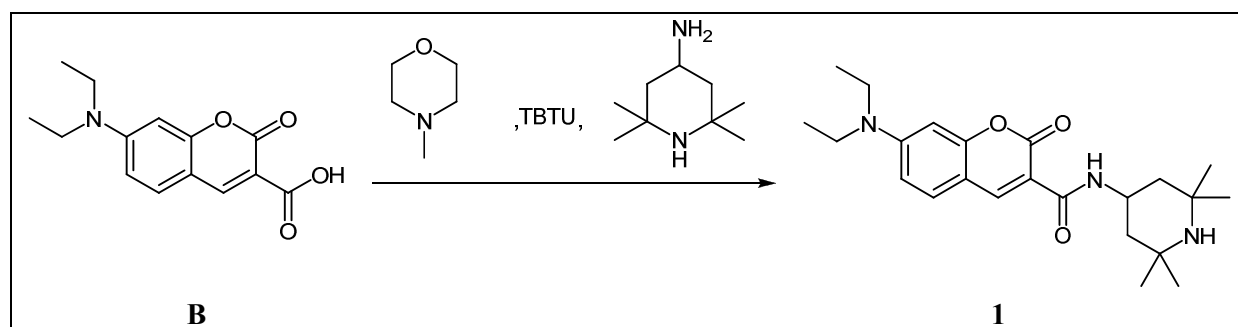
Reakcijska shema 1: Sinteza 7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksilne kisline (**B**)



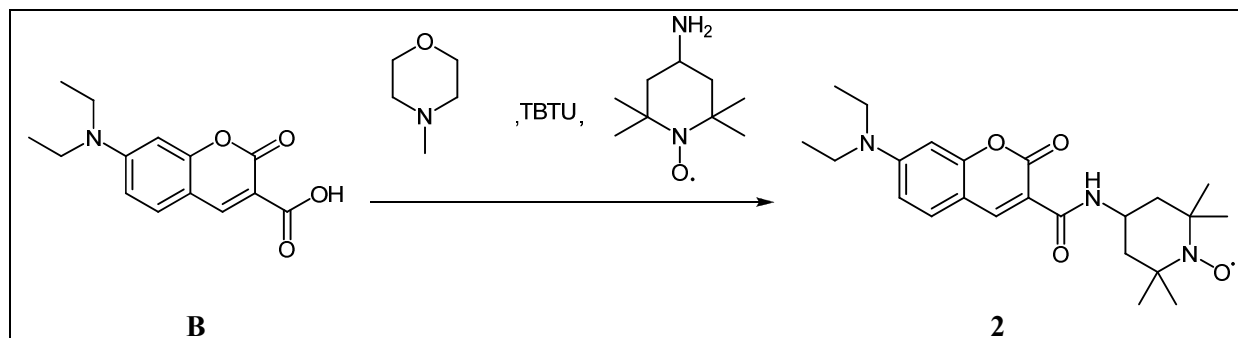
Reakcijska shema 2: Sinteza 4-metoksi-4-oksobutan-1-amonijevega klorida (**C**) in 5-metoksi-5-oksopentan-1-amonijevega klorida (**D**)



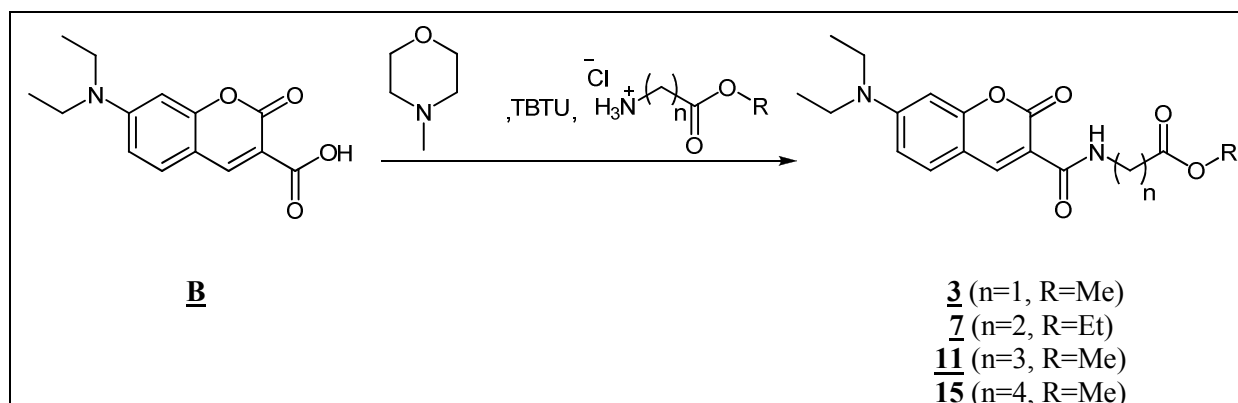
Reakcijska shema 3: Sinteza 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2*H*-kromen-3-karboksamida (**1**)



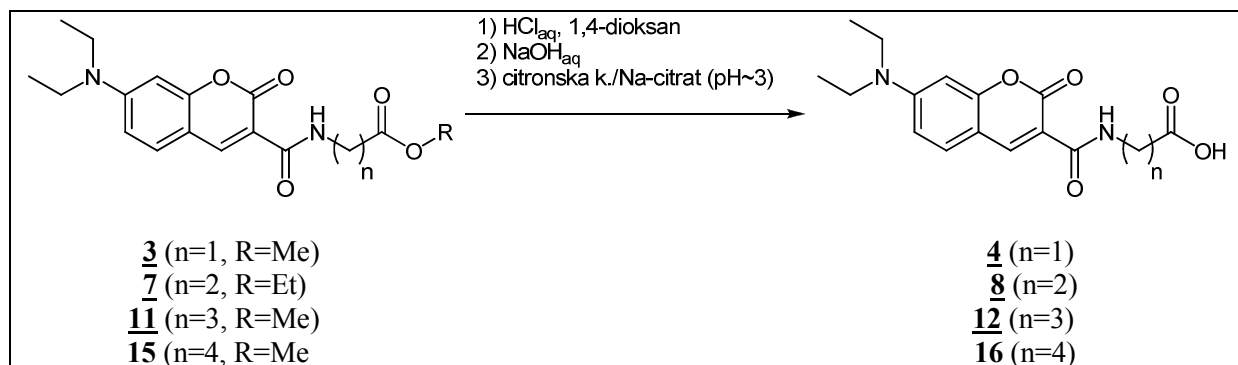
Reakcijska shema 4: Sinteza 7-(dietilamino)-*N*-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamida (**2**)



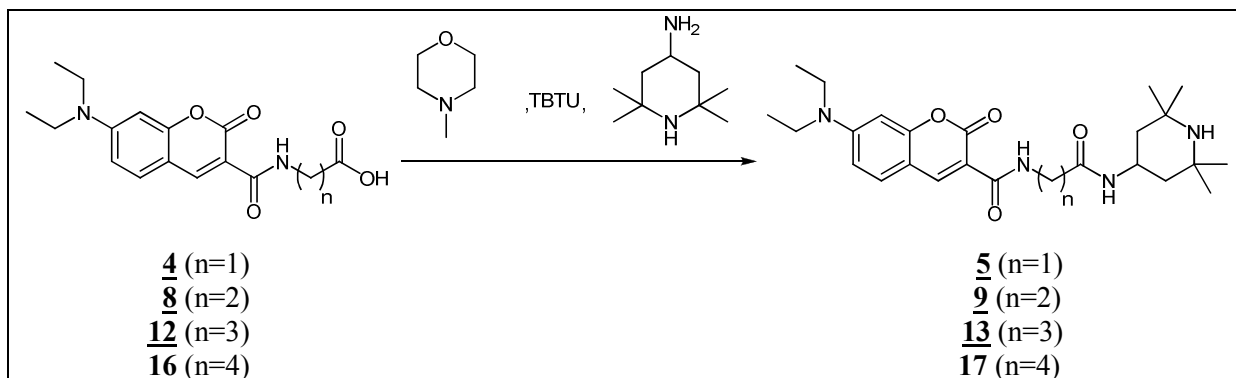
Reakcijska shema 5: Sinteza metil 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)acetata (**3**), etil 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)propanoata (**7**), metil 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)butanoata (**11**) in metil 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)pentanoata (**15**)



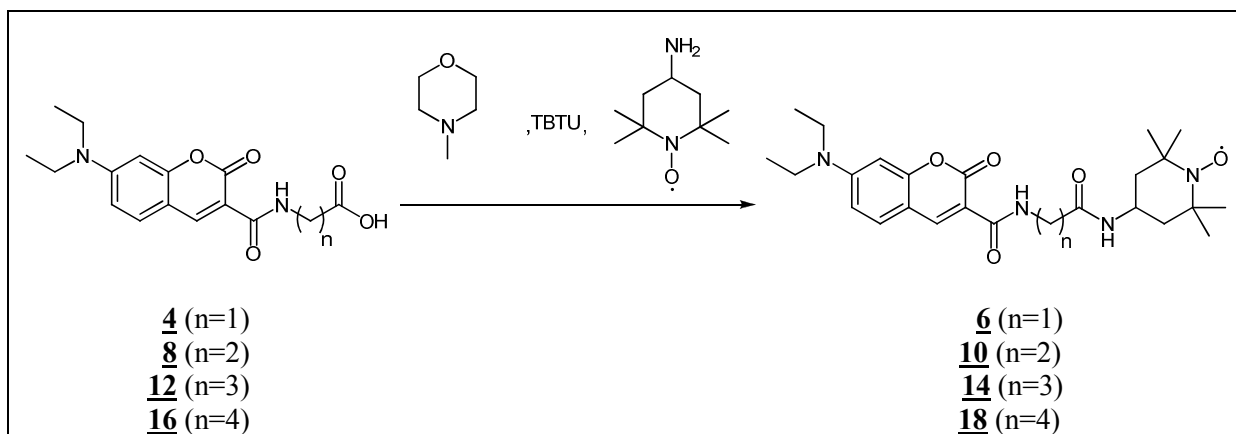
Reakcijska shema 6: Sinteza 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)ocetne kisline (**4**), 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)propanojske kisline (**8**), 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)butanojske kisline (**12**) in 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamido)pentanojske kisline (**16**)



Reakcijska shema 7: Sinteza 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(2-okso-2-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)etil)-2*H*-kromen-3-karboksamida (**5**), 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(3-okso-3-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)propil)-2*H*-kromen-3-karboksamida (**9**), 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(4-okso-4-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)butil)-2*H*-kromen-3-karboksamida (**13**) in 7-(dietilamino)-2-okso-*N*-(5-okso-5-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)pentil)-2*H*-kromen-3-karboksamida (**17**)



Reakcijska shema 8: Sinteza 7-(dietilamino)-*N*-(2-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamida (**6**), 7-(dietilamino)-*N*-(3-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-3-oksopropil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamida (**10**), 7-(dietilamino)-*N*-(4-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-4-oksobutil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamida (**14**) in 7-(dietilamino)-*N*-(5-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-5-oksopentil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamida (**18**)



3. MATERIALI IN METODE

3.1 Reagenti in topila

Pri sinteznem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros, Aldrich, Bachem, Carlo Erba, Fluka, Janssen, Kemika in Merck. Brezvodni CH_2Cl_2 smo pripravili po standardnem postopku, in sicer vedno svežega tik pred uporabo.

3.2 Kromatografske metode

3.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

S tankoplastno kromatografijo smo spremljali poteke reakcij, izolacij in čiščenj s kolonsko kromatografijo ali prekrizalizacijo. Uporabljali smo plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck) z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Na kromatografskih ploščah smo detektirali spojine pri valovni dolžini 254 in 366 nm. Kot orositveni reagent smo uporabljali ninhidrin, in sicer za detekcijo aminokislin ter zaščitenih aminokislin pri sintezi **C** in **D**. Orositveni reagent je bil pripravljen po standardnem postopku.

3.2.2 Kolonska kromatografija

Kolonska kromatografija je služila kot separacijska tehnika pri čiščenju spojin. Za čiščenje končnih spojin smo uporabili aparaturo Isolera One®, proizvajalca Biotage, na Fakulteti za farmacijo. Gre za metodo nizkotlačne kolonske kromatografije. Kot stacionarno fazo smo uporabili normalnofazni silikagel (KP-SIL) ali silikagel s prostimi aminske skupinami (KP-NH). Vzorci se s suhim nanosom ali s pomočjo minimalne količine dobro hlapnega topila nanašajo na predkolono (t.i. »*samplet*«) štirih različnih velikosti (predkolona vsebuje 1 g, 3 g, 10 g ali 34 g silikagela). Možno je tudi direktno injiciranje raztopine vzorca na kolono ali pa adsorpcija vzorca na silikagel, ki ga nato prenesemo v predkolono (t.i. »*samplet*«) oz. v manjšo kolono, ki jo privijemo zaporedno pred kolono, s katero izvajamo ločbo. Pri aparaturi Isolera One gre za adsorpcijsko »flash« kromatografijo. Spojine v odvisnosti od polarosti mobilne faze in karakteristik samih spojin potujejo različno hitro po stolpcu silikagela. Po ločbi, smo posamezne spojine detektirali z merjenjem absorbance, in sicer pri naslednji nastavitvi detektorja: $\lambda_{\text{spremljanja}} = 220 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{zbiranja}} = 254 \text{ nm}$ in prag zbiranja frakcij = 20 mAU.

Pri čiščenju sintetiziranih spojin smo uporabili gradientno spiranje spojin s kolone. Za čiščenje vsake spojine smo uporabili 2 do 3 mobilne faze različnih polarosti, pri čemer smo spiranje posamezne spojine s kolone začeli z najmanj polarno mobilno fazo »MF₁«, nato pa večali polarnost mobilne faze tako, da smo prvotni mobilni fazi »MF₁« dodajali čedalje večji delež bolj polarne mobilne faze »MF₂« (tako se je večal delež »MF₂« in manjšal delež »MF₁« v mobilni fazi, ki je tekla skozi kolono). Če čista »MF₂« (100%) ni bila dovolj polarna za zadostno potovanje posamezne spojine po koloni, smo zmanjševali delež »MF₂« in povečevali delež še bolj polarne »MF₃« v mobilni fazi, ki je tekla skozi kolono, dokler nismo dosegli, da je spojina, ki smo jo želeli očistiti, pripotovala iz kolone. Uporabljen gradient mobilnih faz »MF₁«, »MF₂« in »MF₃« za čiščenje posamezne spojine je v nadaljnjem besedilu označen kot »MF₁ → MF₂ → MF₃«, pri čemer je bilo potrebno vizualno spremljati potovanje vsake spojine po koloni (vse sintetizirane spojine so obarvane) in sproti prilagajati gradient polarosti mobilne faze, ki je tekla skozi kolono, z uravnavanjem deleža »MF₁«, »MF₂« in »MF₃«.

Mobilne faze, ki smo jih uporabljali, so bile:

- n-heksan
- n-heksan:EtOAc=9:1
- n-heksan:EtOAc=4:6
- CH₂Cl₂:n-heksan=7:3
- CH₂Cl₂:n-heksan=8:2
- CH₂Cl₂:n-heksan=1:1
- CH₂Cl₂
- CH₂Cl₂:MeOH=49:1
- CH₂Cl₂:MeOH=19:1
- CH₂Cl₂:MeOH=9:1
- CH₂Cl₂:MeOH=4:1

3.3 Določevanje tališč

Tališča smo določevali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Tališča niso korigirana.

3.4 Spektroskopske metode

3.4.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance DPX₃₀₀ v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Vzorci so bili posneti v devteriranih topilih DMSO-*d*₆, CDCl₃ in CD₃OD s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom pri 302 K. Spektre smo procesirali s programom MestReC Version 4.8.6.0 in NMRnotebook Version 2.60 build 0.2.

3.4.2 Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)

EPR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker X-band CW-ESR ESP 300 (Karlsruhe, Nemčija) v Laboratoriju za biofiziko in EPR centru na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. EPR meritve smo opravili pri frekvenci mikrovalov 9,59 GHz, moči 10 mW, modulacijski frekvenci 100 kHz in amplitudi modulacije 10⁻⁴ T. Spektre smo po potrebi sestavili iz 1 do 4 posnetkov, posnetih s hitrostjo 20,97 s/posnetek, z namenom, da bi dosegli boljše razmerje signal/šum. Podatki o pripravi vzorcev za snemanje EPR spektrov in temperaturi snemanja so navedeni v poglavju 4.2.

3.4.3 Fluorescenčna spektroskopija

Ekscitacijski in emisijski spektri so bili posneti na mikrotitrskem čitalcu TECAN Infinite® M1000 na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Podrobnejše informacije o pripravi raztopin in pogojih meritev so opisane v poglavju 4.3.

3.4.4 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer 1600 Series FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.4.5 Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru AUTOSPEC Q (VG-Analytical) z EI ali FAB tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.5 Elementne analize

Vsebnosti ogljika, dušika in vodika so bile določene s pomočjo analizatorja Perkin Elmer 240 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani.

3.6 Nomenklatura in risanje spojin

Za risanje strukturnih formul spojin in poimenovanje spojin po IUPAC nomenklaturi smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 11.0.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

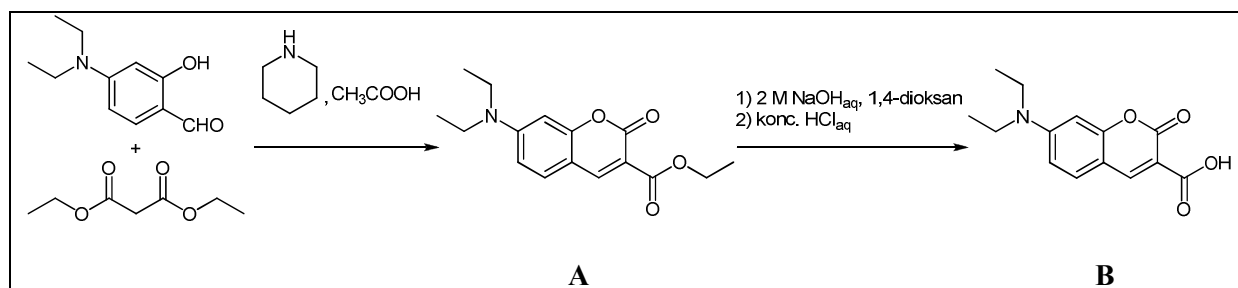
4.1 SINTEZE

4.1.1 SINTEZA IZHODNE SPOJINE

4.1.1.1 7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilna kislina (**B**)

[12],[15],[16],[17],[18],[19],[20],[21],[22],[23],[24]

REAKCIJA:

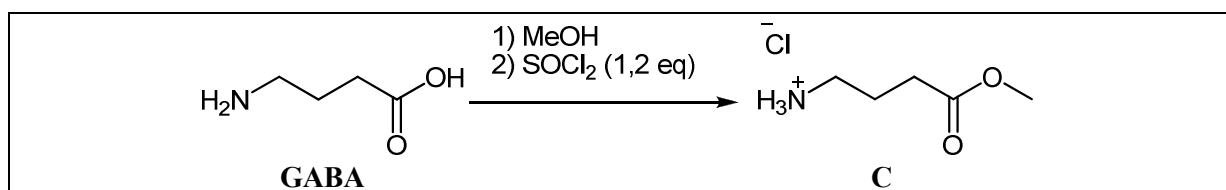


POSTOPEK:

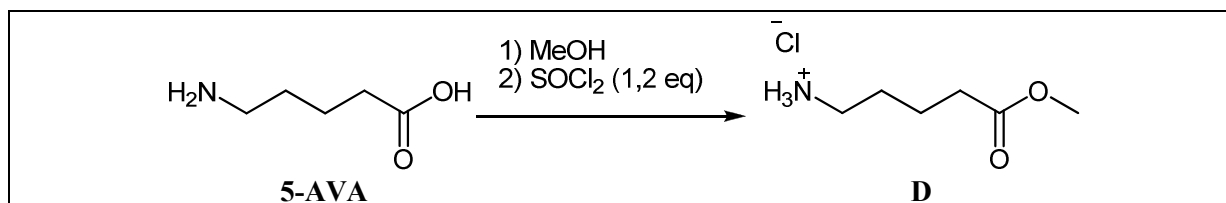
9,50 g (49,2 mmol) 4-(dietilamino)-2-hidroksibenzaldehida raztopimo v 130 mL brezvodnega EtOH. Nato dodamo 22,4 mL (148 mmol; 3 eq) dietilmalonata, 0,971 mL (9,83 mmol; 0,2 eq) piperidina in 0,281 mL (4,92 mmol; 0,1 eq) očetne kisline. Zmes mešamo 24 ur ob refluxu pri 94 °C. Potek reakcije spremljamo s tankoplastno kromatografijo. Po 24 h konec poteka reakcije izhodnih reagentov (nastanek spojine **A**) potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Iz reakcijske zmesi uparimo topilo pri znižanem tlaku, oljnati preostanek pa prelijemo s 120 mL 1,4-dioksana. Po kapljicah dodamo 172 mL 2M NaOH (7 eq) in ves čas dobro mešamo. Zmes se najprej zelo zgosti (potrebno je paziti na ustrezno mešanje zmesi), na koncu hidrolize pa se nekoliko razredči in nastane gosta rumena suspenzija. Potek hidrolize spremljamo s tankoplastno kromatografijo. Zmes nevtraliziramo s konc. HCl, uravnamo pH na 2-3 in ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/ H_2O / NaCl). Spojina **B** izpade v obliki kristalov intenzivno oranžne barve. Produkt odfiltriramo ter speremo s 50 mL mrzle prečiščene H_2O . Spojina **B** je dovolj čista, da služi kot izhodna spojina za nadaljnje sinteze, po potrebi pa jo lahko dodatno čistimo tako, da jo prekristaliziramo iz EtOH. Pred uporabo spojino **B** dobro posušimo.

REZULTATI:**Izgled:** oranžni kristali**Izkoristek:** 39,7% (5,10 g)**R_f** (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,39**T_{tal}** = 222-225 °C (T_{tal} = 224-225,5 °C [12])**IR (KBr):** 3448, 2976, 1737, 1664, 1618, 1578, 1512, 1403, 1356, 1266, 1209, 1189, 1130, 1082, 1008, 801 cm⁻¹**¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 1,26 (t, 6H, *J* = 7,17 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 3,49 (q, 4H, *J* = 7,12 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 6,52 (d, 1H, *J* = 2,45 Hz, H⁸-Ar); 6,70 (dd, 1H, *J*₁ = 2,50 Hz, *J*₂ = 9,05 Hz, H⁶-Ar); 7,44 (d, 1H, *J* = 9,04 Hz, H⁵-Ar); 8,64 (s, 1H, H⁴-Ar); 12,33 (s, 1H, -COOH).**4.1.2 SINTEZA REAGENTOV****4.1.2.1 4-Metoksi-4-oksobutan-1-amonijev klorid (C)**

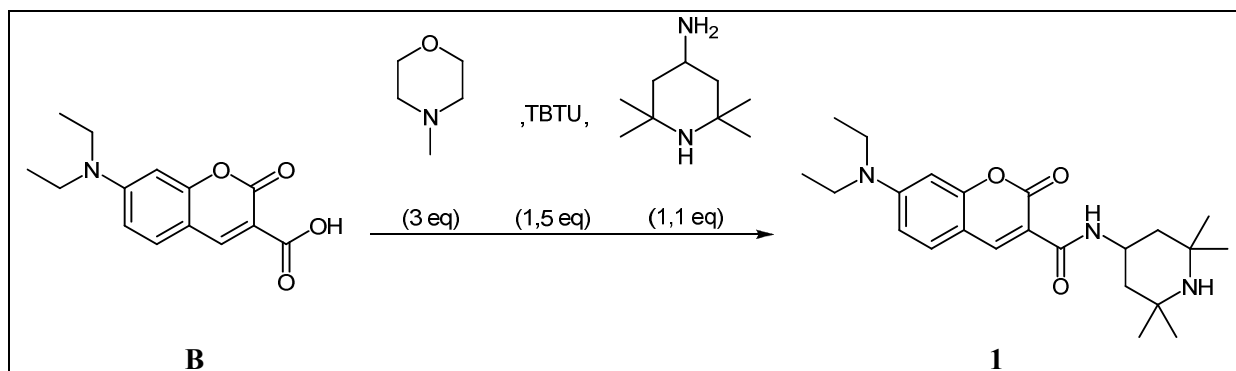
[13],[25],[26],[27],[28],[29],[30]

REAKCIJA:**POSTOPEK:**

10,0 g (97,1 mmol) 4-aminobutanojske kisline (GABA) raztopimo v ~ 200 mL brezvodnega MeOH. Zmes (bela suspenzija) ohladimo na ledeni kopeli in postopoma po kapljicah dodamo 8,45 mL (117 mmol; 1,2 eq) tionil klorida. Po 10-15 min odstranimo ledeno kopel. Zmes mešamo ~ 2 uri ob refluxu pri 80 °C. Potek reakcije spremljamo in konec reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Ko gre reakcija proti koncu, iz bele suspenzije nastane brezbarvna raztopina (metilni ester GABA-e je bolje topen v MeOH kot pa sama GABA). Odparimo topilo pri znižanem tlaku (spojina **C** izpade v obliki belih kristalov), izpadle kristale 3 x tritiriramo s ~ 50 mL n-heksana in produkt sušimo na vakuumski črpalki. Spojino **C** dodatno sušimo še v eksikatorju pri znižanem tlaku 5-7 dni.

REZULTATI:**Izgled:** beli kristali**Izkoristek:** 99,6% (14,6 g)**R_f (MeOH)** = 0,12 (orositveni reagent: ninhidrin)**T_{tal}** = 115-118 °C (T_{tal} = 120 °C [13])**IR (KBr):** 2956, 2494, 1992, 1733, 1601, 1517, 1430, 1387, 1299, 1218, 1155, 1069, 971, 882, 759 cm⁻¹**¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 1,77-1,87 (m, 2H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂-); 2,44 (t, 2H, *J* = 7,48 Hz, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂-); 2,73-2,84 (m, 2H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂-); 3,60 (s, 3H, -COO-CH₃); 8,14 (s, 3H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂-).**4.1.2.2 5-Metoksi-5-oksopentan-1-amonijev klorid (**D**) [14],[29],[31]****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

10,1 g (86,4 mmol) 5-aminopentanojske kisline (5-AVA) raztopimo v ~ 170 mL brezvodnega MeOH. Zmes (rjavobela suspenzija) ohladimo na ledeni kopeli in postopoma po kapljicah dodamo 7,52 mL (104 mmol; 1,2 eq) tionil klorida. Po 10-15 min odstranimo ledeno kopel. Zmes mešamo ~ 2 uri ob refluxu pri 85 °C. Potek reakcije spremljamo in konec reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Ko gre reakcija proti koncu, iz rjavobe suspenzije nastane raztopina (metilni ester 5-AVA-e je bolje topen v MeOH kot pa sama 5-AVA). Odparimo topilo pri znižanem tlaku (spojina **D** izpade v obliki rjavobelih kristalov), izpadle kristale 3 x trituriramo s ~ 50 mL n-heksana in produkt sušimo na vakuumski črpalki. Spojino **D** dodatno sušimo še v eksikatorju pri znižanem tlaku 5-7 dni.

REZULTATI:**Izgled:** rjavobeli kristali**Izkoristek:** 97,4% (14,1 g)**R_f (MeOH)** = 0,10 (orositveni reagent: ninhidrin)**T_{tal}** = 137-140 °C (T_{tal} = 142 °C [14])**IR (KBr):** 3458, 3040, 2671, 2520, 1736, 1600, 1576, 1520, 1475, 1446, 1421, 1387, 1346, 1272, 1197, 1152, 1068, 1054, 984, 951, 900, 882, 748 cm⁻¹**¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 1,55-1,59 (m, 4H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂CH₂-); 2,31-2,36 (m, 2H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂CH₂-); 2,69-2,80 (m, 2H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂CH₂-); 3,59 (s, 3H, -COO-CH₃); 8,07 (s, 3H, ⁻Cl⁺NH₃-CH₂CH₂CH₂CH₂-).**4.1.3 SINTEZE NOVIH SPOJIN****4.1.3.1 7-(Dietilamino)-2-okso-*N*-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2*H*-kromen-3-karboksamid (1)****REAKCIJA:****POSTOPEK:**

1,01 g (3,86 mmol) spojine **B** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 1,27 mL (11,6 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 1,86 g (5,80 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,742 mL (4,25 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, zopet preprihomo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Iz reakcijske zmesi uparimo topilo pri znižanem tlaku, oljnati preostanek pa prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 100 mL topila. Zmes ohladimo na

vodni kopeli in odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve). Produkt speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Nato produkt dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 110 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:n-heksan=7:3 → MF₂ = CH₂Cl₂ → MF₃ = CH₂Cl₂:MeOH=9:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: zelenorumeni kristali

Izkoristek: 43,9% (0,678 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% Et₃N) = 0,43

T_{tal} = 212-215 °C

IR (KBr): 3504, 3312, 2971, 2928, 2367, 1693, 1646, 1618, 1584, 1534, 1413, 1276, 1354, 1243, 1223, 1190, 1134, 794 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,04-1,14 (m, 8H, 2 x -CH₃, 2 x CH₂-H_a); 1,21-1,29 (m, 12H, 2 x -CH₃, 2 x -CH₂CH₃); 1,99 (dd, 2H, *J*₁ = 3,81 Hz, *J*₂ = 12,37 Hz, 2 x CH₂-H_b); 3,45 (q, 4H, *J* = 7,15 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 4,43 (tdt, 1H, *J*₁ = 3,84 Hz, *J*₂ = 7,84 Hz, *J*₃ = 12,19 Hz, -CONH-CH); 6,50 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H⁸-Ar); 6,64 (dd, 1H, *J*₁ = 2,53 Hz, *J*₂ = 8,95 Hz, H⁶-Ar); 7,42 (d, 1H, *J* = 8,93 Hz, -CONH-piperidin); 8,62 (d, 1H, *J* = 8,41 Hz, H⁵-Ar); 8,68 (s, 1H, H⁴-Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,31; 28,39; 34,87; 42,62; 44,93; 45,08; 50,93; 96,45; 108,30; 109,77; 110,42; 130,95; 147,75; 152,35; 157,46; 162,08; 162,55.

MS (ESI) = 400,2 (100%, M+H⁺).

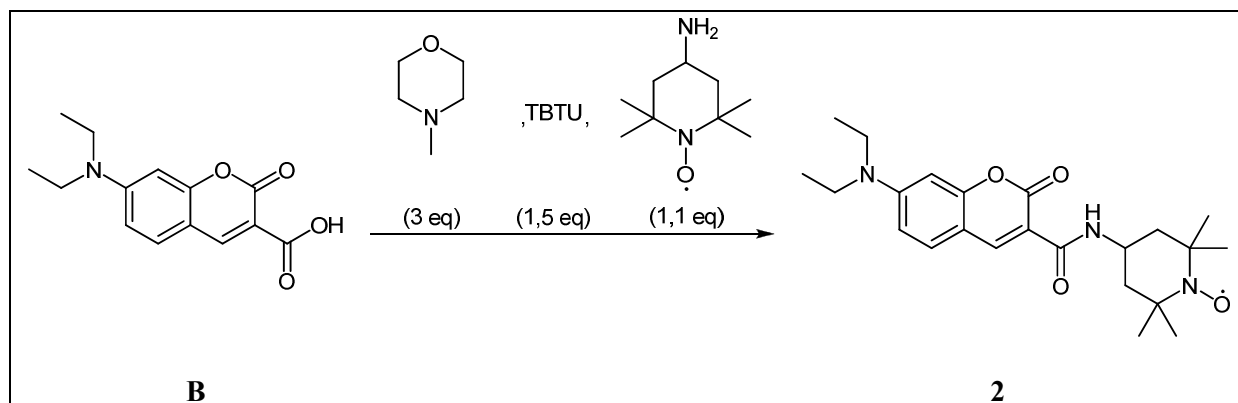
HRMS, *m/z*: izračunan za C₂₃H₃₃N₃O₃ = 400,2600 (M+H⁺), izmerjen = 400,2606.

Elementna sestava: C₂₃H₃₃N₃O₃

C ₂₃ H ₃₃ N ₃ O ₃	izračunana	dobljena
% C	69,14	68,84
% H	8,33	8,23
% N	10,52	10,44

4.1.3.2 7-(Dietilamino)-*N*-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**2**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

1,00 g (3,85 mmol) spojine **B** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 1,27 mL (11,5 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 1,86 g (5,77 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,724 g (4,23 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila, zopet preprihamo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H₂O (4 x 50 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 110 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:*n*-heksan=1:1 → MF₂ = CH₂Cl₂ → MF₃ = CH₂Cl₂:MeOH=9:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: oranžni kristali

Izkoristek: 30,7% (0,489 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,73

T_{tal} = 251-253 °C

IR (KBr): 3811, 3793, 3694, 3453, 3308, 2972, 2930, 2225, 1694, 1680, 1612, 1581, 1512, 1485, 1422, 1372, 1357, 1265, 1221, 1188, 1135, 1076, 795 cm⁻¹

MS (ESI) = 244,1 (100%), 415,2 (60%, M+H⁺).

HRMS, m/z : izračunan za $C_{23}H_{32}N_3O_4^+$ = 415,2471 ($M+H^+$), izmerjen = 415,2474.

EPR: a_N (etanol) = 1,61 mT ($T = 295$ K)

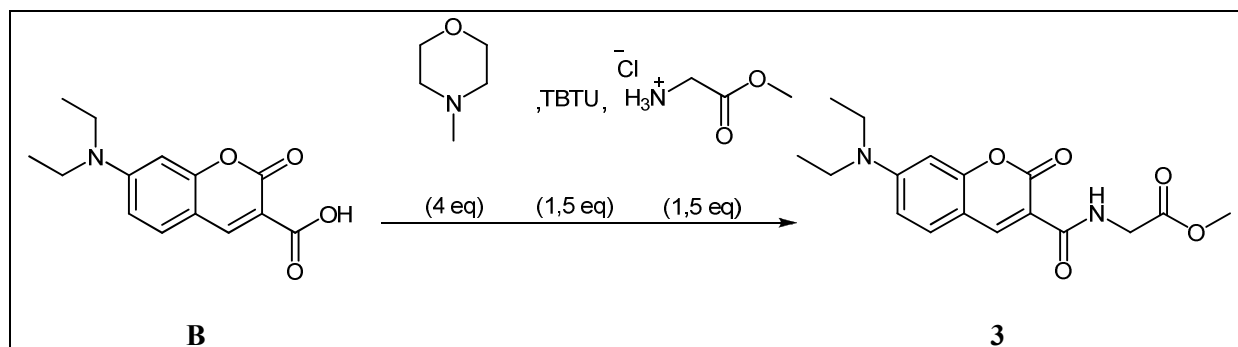
Elementna sestava: $C_{23}H_{32}N_3O_4^+$

$C_{23}H_{32}N_3O_4^+ \times 1/2 H_2O$	izračunana	dobljena
% C	65,23	65,11
% H	7,85	7,53
% N	9,92	9,84

Opomba: v 1H -NMR spektru bi morali videti signal za vodo, vendar 1H -NMR spektra nismo posneli, saj je spojina paramagnetna

4.1.3.3 Metil 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)acetat (**3**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

2,42 g (9,27 mmol) spojine **B** raztopimo v 160 mL brezvodnega CH_2Cl_2 . Nato dodamo 4,08 mL (37,1 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 4,46 g (13,9 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 1,75 g (13,9 mmol) 2-metoksi-2-oksoetanamonijevega klorida, zopet preprihamo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno vodno raztopino $NaHSO_4$ (8 x 40 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 100 g KP-SIL

kolono in naslednji gradient mobilnih faz: $MF_1 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2:MeOH=49:1 \rightarrow MF_3 = CH_2Cl_2:MeOH=9:1$. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Manj čiste frakcije združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku, ostanek pa prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Pri znižanem tlaku odparevamo topilo, dokler ne izpadejo prvi kristali produkta (kristali so obarvani rumeno). Nato zmes ohladimo na ledeni kopeli. Odfiltriramo izpadli produkt, ki ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc in združimo s produktom, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo. Tako dobljeno očiščeno spojino **3** dobro posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 66,2% (2,04 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 20:1) = 0,49

T_{tal} = 176-178 °C

IR (KBr): 3448, 3349, 2971, 1749, 1702, 1618, 1578, 1512, 1419, 1353, 1246, 1204, 1186, 1131, 791 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,24 (t, 6H, $J = 7,09$ Hz, 2 x -CH₂CH₃); 3,45 (q, 4H, $J = 7,13$ Hz, 2 x -CH₂CH₃); 3,77 (s, 3H, -COO-CH₃); 4,22 (d, 2H, $J = 5,62$ Hz, -CONH-CH₂-); 6,50 (d, 1H, $J = 2,42$ Hz, H⁸-Ar); 6,64 (dd, 1H, $J_1 = 2,49$ Hz, $J_2 = 8,96$ Hz, H⁶-Ar); 7,41 (d, 1H, $J = 8,95$ Hz, H⁵-Ar); 8,68 (s, 1H, H⁴-Ar); 9,20 (t, 1H, $J = 5,48$ Hz, -CONH-CH₂-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,81; 41,93; 45,48; 52,61; 96,96; 108,66; 110,03; 110,39; 131,59; 148,69; 153,09; 158,15; 162,92; 163,90; 170,53.

MS (ESI) = 85,0 (40%), 107,0 (75%), 146,1 (40%), 244,1 (50%), 333,1 (100%, M+H⁺), 355,1 (15%, M+Na⁺).

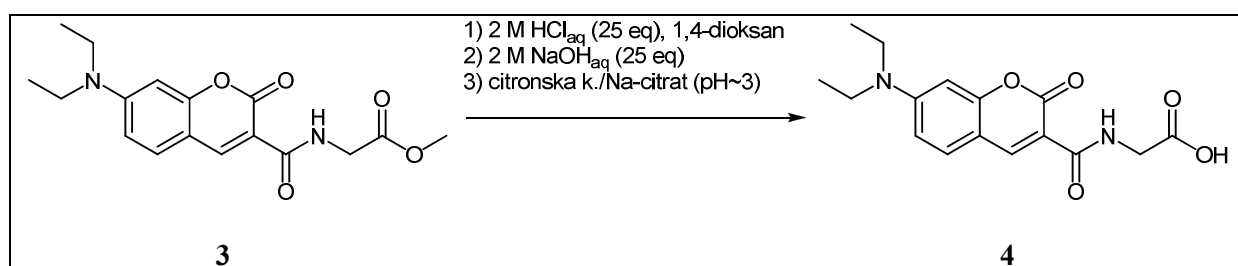
HRMS, m/z : izračunan za C₁₇H₂₀N₂O₅ = 333,1450 (M+H⁺), izmerjen = 333,1453.

Elementna sestava: C₁₇H₂₀N₂O₅

C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅	izračunana	dobljena
% C	61,44	61,35
% H	6,07	6,02
% N	8,43	8,34

4.1.3.4 2-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboxamido)ocetna kislina (**4**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

2,11 g (6,35 mmol) spojine **3** raztopimo v 80-120 mL 1,4-dioksana (po potrebi segrevamo, da se spojina **3** raztopi). Nato postopoma (po kapljicah) dodamo 25 eq 2 M HCl (79,1 mL). Hidroliza estra v kislem poteče v 1-2 urah. Potek hidrolize spremljamo s tankoplastno kromatografijo. Po končani hidrolizi v reakcijsko zmes postopoma in ob hlajenju na vodni kopeli dodamo 25 eq 2 M NaOH (79,1 mL). Na koncu dodamo še 20-50 mL citratnega pufra s pH~3. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, prenesemo v lij ločnik ter ekstrahiramo s 30-40 mL CH₂Cl₂ tolikokrat, da postane zgornja faza v lij ločniku praktično brezbarvna. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 100 mL topila. Zmes ohladimo na vodni kopeli (spojina **4** je slabše topna v EtOAc kot večina nečistoč), odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Produkt nato čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 100 g KP-SIL kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂ → MF₂ = CH₂Cl₂:MeOH=4:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt dobro posušimo.

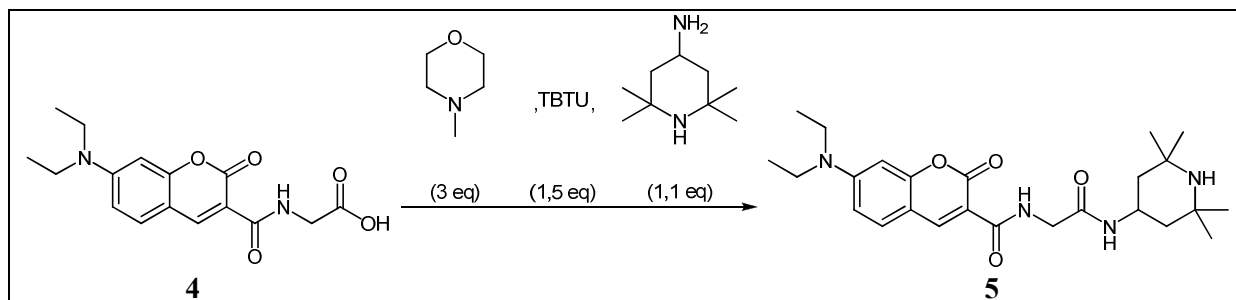
REZULTATI:**Izgled:** rumeni kristali**Izkoristek:** 63,7% (1,29 g)**R_f** (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,15**T_{tal}** = 283-287 °C**IR (KBr):** 3320, 3187, 3080, 2970, 2938, 2715, 2364, 2344, 1770, 1712, 1635, 1618, 1576, 1533, 1509, 1446, 1420, 1385, 1348, 1266, 1190, 1137, 1079, 800, 636 cm⁻¹**¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 1,18 (t, 6H, *J* = 6,95 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 3,52 (q, 4H, *J* = 7,04 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 4,07 (d, 2H, *J* = 5,50 Hz, -CONH-CH₂-); 6,66 (d, 1H, *J* = 2,30 Hz, H⁸-Ar); 6,84 (dd, 1H, *J*₁ = 2,40 Hz, *J*₂ = 9,02 Hz, H⁶-Ar); 7,73 (d, 1H, *J* = 9,00 Hz, H⁵-Ar); 8,70 (s, 1H, H⁴-Ar); 8,99 (t, 1H, *J* = 5,50 Hz, -CONH-CH₂-); 12,75 (s, 1H, -COOH).**¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) 12,29; 43,52; 44,31; 95,84; 107,60; 109,45; 109,98; 131,48; 147,53; 152,32; 157,20; 161,42; 161,53; 172,94.**HRMS, *m/z*:** izračunan za C₁₆H₁₈N₂O₅ = 317,1137 (M-H⁺), izmerjen = 317,1125.**Elementna sestava:** C₁₆H₁₈N₂O₅

C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅	izračunana	dobljena
% C	60,37	53,08
% H	5,70	5,79
% N	8,80	7,61

Opomba: elementna analiza odstopa za več kot 0,4%

4.1.3.5 7-(Dietilamino)-2-okso-*N*-(2-okso-2-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)etil)-2*H*-kromen-3-karboxamid (**5**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,601 g (1,89 mmol) spojine **4** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 0,623 mL (5,66 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 0,909 g (2,83 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,363 mL (2,08 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, zopet preprihomo z argonom in mešamo 2-3 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Iz reakcijske zmesi uparimo topilo pri znižanem tlaku, oljnati preostanek pa prelijemo s 100-150 mL MeOH. Del MeOH odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 30-50 mL topila. V zmes nato dodamo 250-300 mL EtOAc in jo ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/H₂O/NaCl). Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) ter ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc in posušimo. Produkt dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 28 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:n-heksan=1:1 → MF₂ = CH₂Cl₂ → MF₃ = CH₂Cl₂:MeOH=4:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 35,3% (0,304 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% Et₃N) = 0,37

T_{tal} = 262-265 °C

IR (KBr): 3904, 3808, 3752, 3386, 3325, 3162, 3015, 2979, 2936, 2859, 2822, 2488, 2374, 2346, 1700, 1617, 1573, 1509, 1421, 1388, 1352, 1310, 1266, 1225, 1214, 1190, 1134, 1084 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1,27 (t, 6H, *J* = 7,07 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 1,48-1,60 (m, 14H, 4 x -CH₃, 2 x CH₂-H_a); 2,11 (dd, 2H, *J*₁ = 3,70 Hz, *J*₂ = 13,70 Hz, 2 x CH₂-H_b); 3,38 (s, 1H, -NH-); 3,57 (q, 4H, *J* = 7,13 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 4,12 (s, 2H, -NH-CH₂-CONH-piperidin); 4,31-4,41 (m, 1H, -CONH-CH); 6,60 (d, 1H, *J* = 2,30 Hz, H⁸-Ar); 6,85 (dd, 1H, *J*₁ = 2,35 Hz, *J*₂ = 9,08 Hz, H⁶-Ar); 7,57 (d, 1H, *J* = 8,95 Hz, H⁵-Ar); 8,63 (s, 1H, H⁴-Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,28; 24,24; 29,87; 42,55; 44,33; 56,60; 95,84; 107,58; 109,05; 110,13; 131,60; 147,72; 152,49; 157,27; 161,56; 162,21; 167,87.

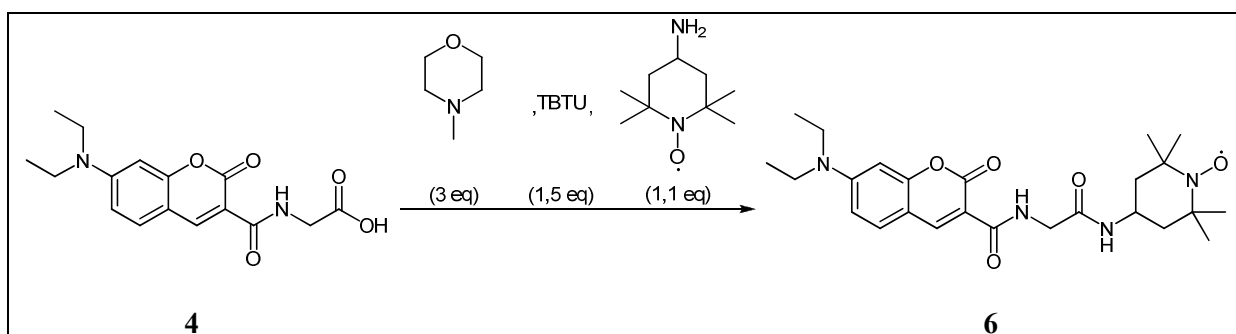
HRMS, *m/z*: izračunan za C₂₅H₃₆N₄O₄ = 457,2815 (M+H⁺), izmerjen = 457,2805.

Elementna sestava: C₂₅H₃₆N₄O₄

C ₂₅ H ₃₆ N ₄ O ₄	izračunana	dobljena
% C	65,76	65,89
% H	7,95	7,84
% N	12,27	12,32

4.1.3.6 7-(Dietilamino)-*N*-(2-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**6**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,573 g (1,80 mmol) spojine **4** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 0,594 mL (5,40 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 0,867 g (2,70 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,339 g (1,98 mmol)

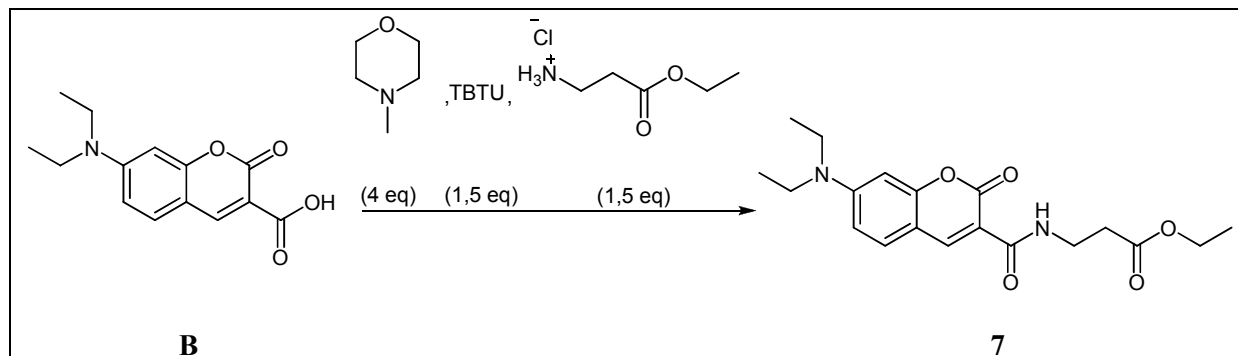
4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila, zopet prepriamo z argonom in mešamo 2-3 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H₂O (5 x 50 mL). Vmesno fazo (navadno izgine po četrtem spiranju s prečiščeno H₂O), ki se pojavi med organsko fazo in vodno fazo, odlivamo k odpadni vodni fazi. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 50 mL topila. Zmes ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/H₂O/NaCl). Odfiltriramo izpadli produkt (oranžnorumene barve), ki ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Produkt nato dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 28 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:n-heksan=1:1 → MF₂ = CH₂Cl₂ → MF₃ = CH₂Cl₂:MeOH=4:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:**Izgled:** oranžnorumeni kristali**Izkoristek:** 30,3% (0,257 g)**R_f** (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1) = 0,52**T_{tal}** = 247-250 °C**IR (KBr):** 3447, 3294, 3080, 2973, 2927, 1719, 1687, 1638, 1618, 1578, 1509, 1418, 1349, 1264, 1217, 1186, 1134, 1079, 1009, 792 cm⁻¹**HRMS, m/z:** izračunan za C₂₅H₃₅N₄O₅⁺ = 472,2686 (M+H⁺), izmerjen = 472,2701.**EPR:** a_N (etanol) = 1,60 mT (T = 295 K)**Elementna sestava:** C₂₅H₃₅N₄O₅⁺

C ₂₅ H ₃₅ N ₄ O ₅ ⁺	izračunana	dobljena
% C	63,67	63,63
% H	7,48	7,36
% N	11,88	11,84

4.1.3.7 Etil 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)propanoat (**7**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

2,02 g (7,73 mmol) spojine **B** raztopimo v 160 mL brezvodnega CH_2Cl_2 . Nato dodamo 3,40 mL (30,9 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 3,73 g (11,6 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 1,78 g (11,6 mmol) 3-etoksi-3-oksopropan-1-amonijevega klorida, zopet preprihomo z argonom in mešamo 2-3 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H_2O (5 x 50 mL). Vmesno fazo, ki se pojavi med organsko fazo in vodno fazo, odlivamo k odpadni vodni fazi. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 50 g KP-SIL kolono in naslednji gradient mobilnih faz: $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=49:1 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 58,4% (1,63 g)

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 9:1 + 3\% \text{CH}_3\text{COOH}$) = 0,67

T_{tal} = 129-133 °C

IR (KBr): 3811, 3790, 3696, 3663, 3329, 3047, 2973, 2281, 1728, 1612, 1529, 1513, 1412, 1352, 1267, 1230, 1190, 1135, 1075, 1017, 998, 794 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1,23-1,32 (m, 9H, 2 x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,66 (t, 2H, $J = 6,52$ Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-$); 3,47 (q, 4H, $J = 7,11$ Hz, 2 x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,71-3,77 (m, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-$); 4,20 (q, 2H, $J = 7,14$ Hz, $-\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 6,51 (d, 1H, $J = 2,46$ Hz, H^8-Ar); 6,65 (dd, 1H, $J_1 = 2,48$ Hz, $J_2 = 8,95$ Hz, H^6-Ar); 7,43 (d, 1H, $J = 8,93$ Hz, H^5-Ar); 8,70 (s, 1H, H^4-Ar); 9,08 (t, 1H, $J = 5,89$ Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12,77; 14,55; 29,99; 34,82; 35,59; 45,39; 60,96; 96,83; 108,61; 110,27; 110,46; 131,40; 148,27; 152,87; 157,96; 162,82; 163,48; 172,15.

HRMS, m/z : izračunan za $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5 = 361,1763$ ($\text{M}+\text{H}^+$), izmerjen = 361,1774.

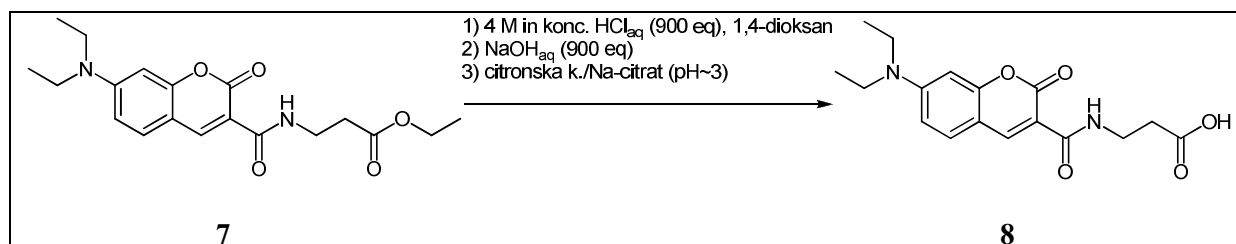
Elementna sestava: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$	izračunana	dobljena
% C	63,32	63,88
% H	6,71	6,92
% N	7,77	7,57

Opomba: elementna analiza odstopa za več kot 0,4%

4.1.3.8 3-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)propanojska kislina (**8**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

1,86 g (5,17 mmol) spojine **7** raztopimo v 120 mL 1,4-dioksana (po potrebi segrevamo, da se spojina **7** raztopi). Najprej dodamo 100 eq 4 M HCl (129 mL), nato pa postopoma (po kapljicah) dodamo 800 eq konc. HCl (343 mL). Hidroliza estra v kislem poteče v 24 urah. Potek hidrolize spremljamo in konec hidrolize potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Po

končani hidrolizi v reakcijsko zmes postopoma in ob hlajenju na ledeni kopeli dodamo 900 eq NaOH (186 g NaOH, ki ga raztopimo v ~ 300 mL prečiščene H₂O). Med nevtralizacijo se reakcijska zmes najprej zelo zgosti (nastane blede rumena kašasta zmes – potrebno je paziti na ustrezno mešanje), proti koncu nevtralizacije pa se nekoliko razredči, kar olajša mešanje, čeprav izpade precej produkta v obliki rumenih kristalov. Z uporabo 4 M HCl in/ali 4 M NaOH uravnamo pH na ~ 3. Na koncu dodamo še 60-70 mL citratnega pufra s pH~3. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, prenesemo v lij ločnik ter ekstrahiramo s 30-40 mL CH₂Cl₂ tolikokrat, da postane zgornja faza v liju ločniku praktično brezbarvna. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt prelijemo z 60-80 mL CH₂Cl₂ in nekajkrat segrejemo do vrelišča (spojina **8** je slabo topna v CH₂Cl₂, glavni nečistoči – spojina **B** in spojina **7** – pa sta boljše topni v CH₂Cl₂), nato pa zmes ohladimo na ledeni kopeli. Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzle mešanice CH₂Cl₂ in n-heksana v razmerju 1:1. Očiščeno spojino **8** nato dobro posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 75,4% (1,30 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,44

T_{tal} = 202-205 °C

IR (KBr): 3447, 3321, 3049, 2974, 2957, 2628, 1731, 1700, 1619, 1576, 1528, 1511, 1418, 1350, 1307, 1291, 1274, 1232, 1188, 1131, 1070, 1044, 823, 792 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1,14 (t, 6H, *J* = 6,75 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 3,44-3,57 (m, 6H, 2 x -CH₂CH₃, -CONH-CH₂CH₂-COOH); 4,07 (d, 2H, *J* = 5,50 Hz, -CONH-CH₂-); 6,60 (s, 1H, H⁸-Ar); 6,79 (d, 1H, *J* = 8,99 Hz, H⁶-Ar); 7,67 (d, 1H, *J* = 9,03 Hz, H⁵-Ar); 8,65 (s, 1H, H⁴-Ar); 8,82 (t, 1H, *J* = 5,76 Hz, -CONH-CH₂-); 12,31 (s, 1H, -COOH).

Opombe:

1. signal -CONH-CH₂CH₂-COOH je verjetno skrit v signalu DMSO-ja
2. signal pri 6,60 ppm bi moral biti d (6,60 ppm (d, 1H, *J* = 2,40 Hz, H⁸-Ar)) in ne s; vzrok je verjetno v slabi resoluciji
3. signal pri 6,79 ppm bi moral biti dd (6,79 ppm (dd, 1H, *J*₁ = 2,62 Hz, *J*₂ = 8,98 Hz, H⁶-Ar)) in ne d; vzrok je verjetno v slabi resoluciji

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13,16; 34,81; 35,76; 45,20; 96,69; 108,51; 110,08; 110,91; 132,39; 148,57; 153,26; 158,07; 162,51; 163,01; 174,02.

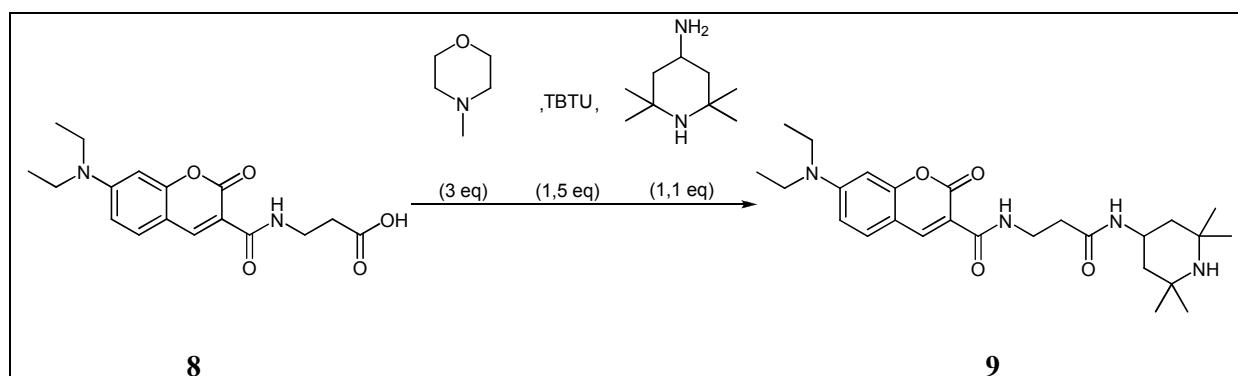
HRMS, m/z : izračunan za $C_{17}H_{20}N_2O_5 = 333,1450$ ($M+H^+$), izmerjen = 333,1460.

Elementna sestava: $C_{17}H_{20}N_2O_5$

$C_{17}H_{20}N_2O_5$	izračunana	dobljena
% C	61,44	61,32
% H	6,07	6,13
% N	8,43	8,43

4.1.3.9 7-(Dietilamino)-2-okso-*N*-(3-okso-3-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)propil)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**9**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,600 g (1,81 mmol) spojine **8** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH_2Cl_2 . Nato dodamo 0,595 mL (5,42 mmol) *N*-metilmorfolina (po dodatku *N*-metilmorfolina se zmes zbistri in nastane raztopina), premešamo ter dodamo 0,870 g (2,71 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,347 mL (1,99 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, zopet preprihomo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Iz reakcijske zmesi uparimo topilo pri znižanem tlaku, oljnati preostanek pa prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 100 mL topila. Zmes ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/ H_2O / $NaCl$) in odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve). Produkt speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Nato produkt dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 50 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: $MF_1 = CH_2Cl_2:n\text{-heksan}=8:2 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_3 = CH_2Cl_2:MeOH=9:1$. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih

zdržimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Pri sušenju na vakuumski črpalki nastane stabilna pena rumene barve.

REZULTATI:

Izgled: rumena stabilna pena

Izkoristek: 21,2% (0,180 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% Et₃N) = 0,42

T_{tal} = 85-91 °C (steklast prehod)

IR (KBr): 3447, 3302, 3246, 3121, 3044, 2981, 2943, 2860, 2714, 2479, 1699, 1632, 1616, 1575, 1560, 1534, 1508, 1458, 1426, 1382, 1350, 1314, 1265, 1228, 1191, 1138, 1083, 999, 793 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1,24 (t, 6H, *J* = 7,05 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 1,41-1,53 (m, 14H, 4 x -CH₃, 2 x CH₂-H_a); 2,07 (dd, 2H, *J*₁ = 3,51 Hz, *J*₂ = 13,73 Hz, 2 x CH₂-H_b); 2,50 (t, 2H, *J* = 6,27 Hz, -CONH-CH₂CH₂-CONH-piperidin); 3,54 (q, 4H, *J* = 7,10 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 3,69 (t, 2H, *J* = 6,15 Hz, -CONH-CH₂CH₂-CONH-piperidin); 4,25-4,36 (m, 1H, -CONH-CH); 4,82 (signal H₂O); 6,57 (d, 1H, *J* = 2,23 Hz, H⁸-Ar); 6,83 (dd, 1H, *J*₁ = 2,32 Hz, *J*₂ = 9,05 Hz, H⁶-Ar); 7,55 (d, 1H, *J* = 9,02 Hz, H⁵-Ar); 8,62 (s, 1H, H⁴-Ar).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13,17; 25,15; 30,78; 36,11; 36,39; 45,21; 57,53; 96,70; 108,50; 110,14; 111,02; 132,45; 148,58; 153,33; 158,10; 162,49; 162,98; 170,92.

HRMS, *m/z*: izračunan za C₂₆H₃₈N₄O₄ = 471,2971 (M+H⁺), izmerjen = 471,2980.

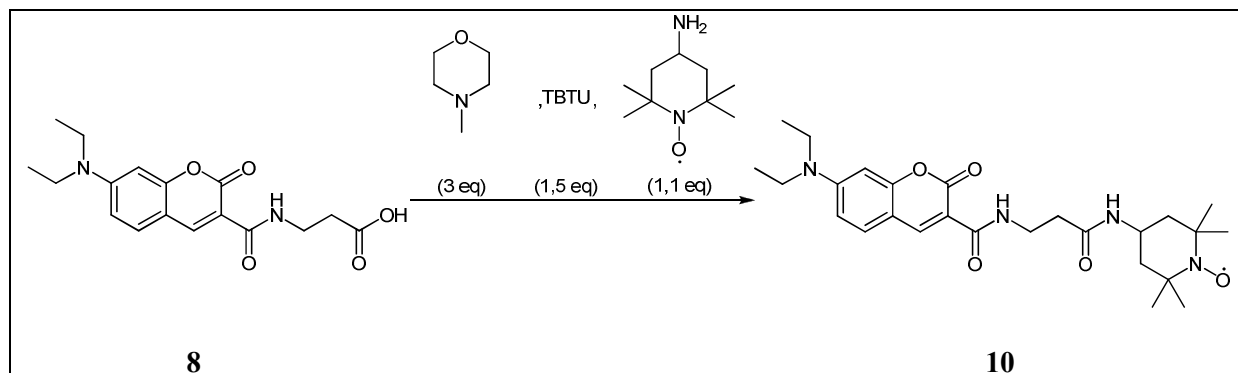
Elementna sestava: C₂₆H₃₈N₄O₄

C ₂₆ H ₃₈ N ₄ O ₄ x H ₂ O	izračunana	dobljena
% C	63,91	63,77
% H	8,25	8,06
% N	11,47	11,36

Opomba: v ¹H-NMR vidimo signal vode pri 4,82 ppm

4.1.3.10 7-(Dietilamino)-*N*-(3-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-3-oksopropil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**10**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

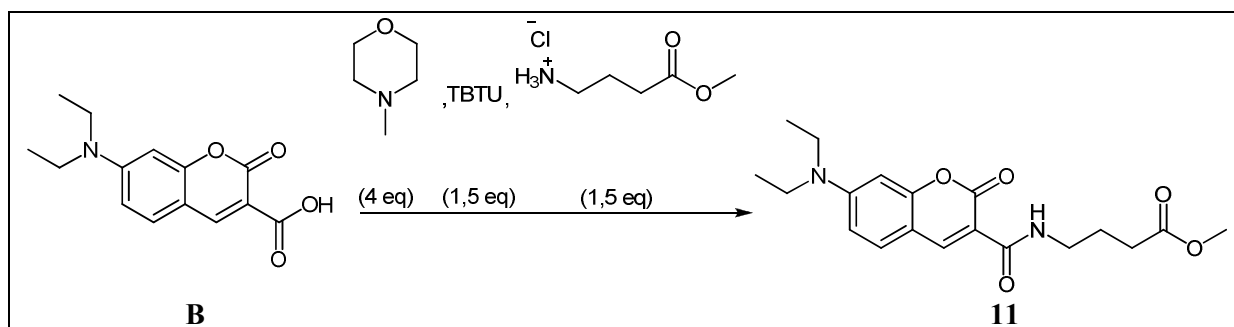
0,500 g (1,50 mmol) spojine **8** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 0,496 mL (4,51 mmol) *N*-metilmorfolina (po dodatku *N*-metilmorfolina se zmes zbistri in nastane raztopina), premešamo ter dodamo 0,725 g (2,26 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,283 g (1,66 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila, zopet preprihomo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H₂O (4 x 50 mL; po zadnjem spiranju s prečiščeno H₂O ostane vodna faza praktično brezbarvna). Vmesno fazo (navadno izgine že po prvem spiranju s prečiščeno H₂O), ki se pojavi med organsko fazo in vodno fazo, odlivamo k odpadni vodni fazi. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 50 mL topila. Zmesi dodamo ~ 150 mL *n*-heksana, nato pa jo ohladimo na zmesi ledu, vode, NaCl in acetona (po potrebi nekajkrat podrgnemo s stekleno palčko ob steklu, da kristali lažje izpadejo). Odfiltriramo izpadli produkt (oranžne barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Produkt nato dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 28 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:*n*-heksan=8:2 → MF₂ = CH₂Cl₂. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Pri sušenju na vakuumski črpalki nastane stabilna pena oranžne barve.

REZULTATI:**Izgled:** oranžna stabilna pena**Izkoristek:** 57,9% (0,422 g)**R_f**(CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,49**T_{tal}** = 99-105 °C (steklast prehod)**IR (KBr):** 3462, 3323, 3080, 2974, 2934, 1702, 1637, 1618, 1582, 1513, 1418, 1352, 1232, 1188, 1135, 1077, 793 cm⁻¹**HRMS, m/z:** izračunan za C₂₆H₃₇N₄O₅⁺ = 486,2842 (M+H⁺), izmerjen = 486,2835.**EPR:** a_N (etanol) = 1,61 mT (T = 295 K)**Elementna sestava:** C₂₆H₃₇N₄O₅⁺

C ₂₅ H ₃₅ N ₄ O ₅ ⁺ x 2/3 H ₂ O	izračunana	dobljena
% C	62,59	62,79
% H	8,01	7,67
% N	11,23	11,20

Opomba: v ¹H-NMR spektru bi morali videti signal za vodo, vendar ¹H-NMR spektra nismo posneli, saj je spojina paramagnetna

4.1.3.11 Metil 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)butanoat (**11**)

REAKCIJA:

POSTOPEK:

2,50 g (9,58 mmol) spojine **B** raztopimo v 150 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 4,21 mL (38,3 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 4,61 g (14,4 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihomo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 2,21 g (14,4 mmol) 4-metoksi-4-oksobutan-1-amonijevega klorida, zopet preprihomo z argonom in mešamo 2,5-3 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H₂O (4 x 50 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Oljnati preostanek prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Topilo odparevamo pri znižanem tlaku. Ko izpadejo prvi kristali produkta (kristali so obarvani rumeno), zmes ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/H₂O/NaCl). Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve), ki ga najprej speremo s ~ 30 mL mrzle mešanice EtOAc in *n*-heskana v razmerju 2:1, nato pa še s ~ 30 mL mrzle mešanice EtOAc in *n*-heskana v razmerju 1:2. Produkt posušimo in čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 100 g KP-SIL kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂ → MF₂ = CH₂Cl₂:MeOH=49:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 73,2% (2,53 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,63

T_{tal} = 150-152 °C

IR (KBr): 3342, 3047, 2972, 2930, 1740, 1690, 1641, 1616, 1579, 1508, 1474, 1452, 1414, 1372, 1353, 1318, 1293, 1262, 1238, 1225, 1190, 1164, 1136, 1090, 1080, 1058, 1010, 819, 796 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,23 (t, 6H, *J* = 7,12 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 1,90-2,00 (m, 2H, -CONH-CH₂CH₂CH₂-COO-); 2,41 (t, 2H, *J* = 7,46 Hz, -CONH-CH₂CH₂CH₂-COO-); 3,41-3,51 (m, 6H, 2 x -CH₂CH₃, -CONH-CH₂CH₂CH₂-COO-); 3,67 (s, 3H, -COO-CH₃); 6,49 (d, 1H, *J* = 2,44 Hz, H⁸-Ar); 6,64 (dd, 1H, *J*₁ = 2,46 Hz, *J*₂ = 8,96 Hz, H⁶-Ar); 7,42 (d, 1H, *J* = 8,93 Hz, H⁵-Ar); 8,69 (s, 1H, H⁴-Ar); 8,82 (t, 1H, *J* = 5,93 Hz, -CONH-CH₂-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,81; 25,38; 31,90; 39,21; 45,44; 51,96; 96,93; 108,73; 110,33; 110,61; 131,49; 148,40; 152,91; 157,99; 163,08; 163,61; 173,86.

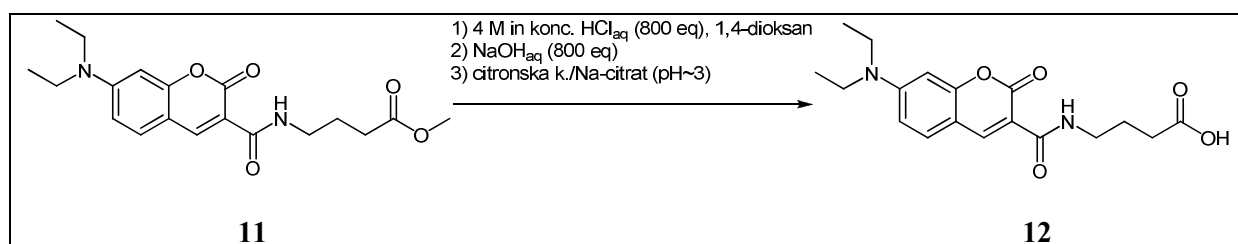
HRMS, m/z : izračunan za $C_{19}H_{24}N_2O_5 = 361,1763$ ($M+H^+$), izmerjen = 361,1452.

Elementna sestava: $C_{19}H_{24}N_2O_5$

$C_{19}H_{24}N_2O_5$	izračunana	dobljena
% C	63,32	63,41
% H	6,71	6,83
% N	7,77	7,80

4.1.3.12 4-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)butanojska kislina (**12**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

2,04 g (5,65 mmol) spojine **11** raztopimo v 80 mL 1,4-dioksana (po potrebi segrevamo, da se spojina **11** raztopi). Najprej dodamo 50 eq 4 M HCl (70,6 mL), nato pa postopoma (po kapljicah) dodamo 750 eq konc. HCl (351 mL). Potek hidrolize spremljamo in konec hidrolize potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Po končani hidrolizi v reakcijsko zmes postopoma in ob hlajenju na ledeni kopeli dodamo 800 eq NaOH (181 g NaOH, ki ga raztopimo v ~ 350 mL prečiščene H_2O). Med nevtralizacijo se reakcijska zmes najprej zelo zgosti (nastane blede rumena kašasta zmes – potrebno je paziti na ustrezno mešanje), proti koncu nevtralizacije pa se nekoliko razredči, kar olajša mešanje, čeprav izpade precej produkta v obliki rumenih kristalov. Z uporabo 4 M HCl in/ali 4 M NaOH uravnamo pH na ~ 3. Na koncu dodamo še 100-150 mL citratnega pufra s pH~3. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, prenesemo v lij ločnik ter ekstrahiramo s 30-40 mL CH_2Cl_2 tolikokrat, da postane zgornja faza v liju ločniku praktično brezbarvna. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt prelijemo z ~ 80 mL mešanice CH_2Cl_2 in n-heksana v razmerju 9:1 in nekajkrat segrejemo do vrelišča (spojina **12** je slabše topna v mešanici CH_2Cl_2 :n-heksan=9:1 kot glavni nečistoči – spojina **B** in spojina **11**), nato pa zmes ohladimo na ledeni kopeli. Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzle mešanice CH_2Cl_2 in n-heksana v razmerju 1:1. Produkt nato

dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 100 g KP-SIL kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂ → MF₂ = CH₂Cl₂:MeOH=9:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 73,2% (1,43 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,42

T_{tal} = 198-200 °C

IR (KBr): 3447, 3303, 3034, 2965, 2931, 2875, 1735, 1687, 1629, 1616, 1581, 1553, 1515, 1470, 1422, 1382, 1354, 1257, 1238, 1177, 1144, 1099, 1082, 823, 793 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1,14 (t, 6H, *J* = 6,95 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 1,69-1,79 (m, 2H, -CONH-CH₂CH₂CH₂-COOH); 2,26 (t, 2H, *J* = 7,39 Hz, -CONH-CH₂CH₂CH₂-COOH); 3,31 (signal H₂O); 3,48 (q, 4H, *J* = 7,05 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 6,61 (d, 1H, *J* = 2,35 Hz, H⁸-Ar); 6,80 (dd, 1H, *J*₁ = 2,41 Hz, *J*₂ = 9,01 Hz, H⁶-Ar); 7,67 (d, 1H, *J* = 9,00 Hz, H⁵-Ar); 8,62-8,66 (m, 2H, -CONH-CH₂-, H⁴-Ar); 12,06 (s, 1H, -COOH).

Opomba: signal -CONH-CH₂CH₂CH₂-COOH je verjetno skrit v signalu za H₂O

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13,17; 25,65; 32,11; 45,19; 96,72; 108,53; 110,40; 110,93; 132,36; 148,45; 153,24; 158,05; 162,58; 163,11; 175,02.

HRMS, *m/z*: izračunan za C₁₈H₂₂N₂O₅ = 345,1450 (M-H⁺), izmerjen = 345,1453.

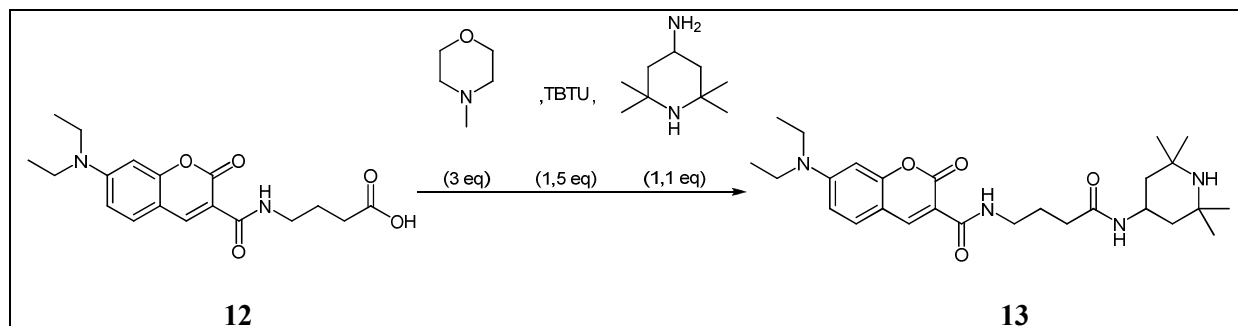
Elementna sestava: C₁₈H₂₂N₂O₅

C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₅ x 1/6 H ₂ O	izračunana	dobljena
% C	61,64	61,97
% H	6,80	6,47
% N	7,99	7,96

Opomba: v ¹H-NMR vidimo signal vode pri 3,31 ppm

4.1.3.13 7-(Dietilamino)-2-okso-*N*-(4-okso-4-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)butil)-2*H*-kromen-3-karboxamid (**13**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,669 g (1,93 mmol) spojine **12** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 0,637 mL (5,79 mmol) *N*-metilmorfolina (po dodatku *N*-metilmorfolina se zmes zbistri in nastane raztopina), premešamo ter dodamo 0,921 g (2,87 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,371 mL (2,12 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, zopet preprihamo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Iz reakcijske zmesi uparimo topilo pri znižanem tlaku, preostanek pa prelijemo s ~ 150 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 100 mL topila. Zmes ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/H₂O/NaCl) – spojina **13** se slabo raztaplja celo v vročem EtOAc, večina nečistoč pa je precej bolje topna tudi v mrzlem EtOAc. Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Nato produkt dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 50 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:n-heksan=8:2 → MF₂ = CH₂Cl₂ → MF₃ = CH₂Cl₂:MeOH=9:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Pri sušenju na vakuumski črpalki nastane stabilna pena rumene barve.

REZULTATI:

Izgled: rumena stabilna pena

Izkoristek: 76,3% (0,714 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% Et₃N) = 0,40

T_{tal} = 75-82 °C (steklast prehod)

IR (KBr): 3447, 2967, 2929, 2373, 2345, 1701, 1636, 1618, 1584, 1534, 1509, 1419, 1376, 1351, 1308, 1265, 1232, 1187, 1134, 1076, 1012, 794 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 0,87-0,98 (m, 8H, 2 x $-\text{CH}_3$, 2 x $\text{CH}_2\text{-H}_a$); 1,10-1,16 (m, 12H, 2 x $-\text{CH}_3$, 2 x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,58 (dd, 2H, $J_1 = 3,67$ Hz, $J_2 = 12,15$ Hz, 2 x $\text{CH}_2\text{-H}_b$); 1,68-1,77 (m, 2H, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CONH-piperidin}$); 2,08 (t, 2H, $J = 7,32$ Hz, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CONH-piperidin}$); 3,31 (signal H_2O); 3,48 (q, 4H, $J = 7,03$ Hz, 2 x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,0 (tdt, 1H, $J_1 = 3,73$ Hz, $J_2 = 7,93$ Hz, $J_3 = 12,14$ Hz, $-\text{CONH-CH}$); 6,61 (d, 1H, $J = 2,32$ Hz, $\text{H}^8\text{-Ar}$); 6,80 (dd, 1H, $J_1 = 2,39$ Hz, $J_2 = 9,01$ Hz, $\text{H}^6\text{-Ar}$); 7,62 (d, 1H, $J = 7,83$ Hz, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CONH-piperidin}$); 7,67 (d, 1H, $J = 8,98$ Hz, $\text{H}^5\text{-Ar}$); 8,60-8,64 (m, 2H, $-\text{CONHCH}_2\text{-}$, $\text{H}^4\text{-Ar}$).

Opomba: signal $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOH}$ je verjetno skrit v signalu za H_2O

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 12,26; 25,50; 28,55; 33,08; 34,49; 41,35; 44,29; 44,42; 50,32; 95,82; 107,61; 109,48; 110,04; 131,45; 147,53; 152,33; 157,14; 161,65; 162,15; 170,55.

MS (ESI) = 485,3 (100%, $\text{M}+\text{H}^+$).

HRMS, m/z : izračunan za $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4 = 485,3128$ ($\text{M}+\text{H}^+$), izmerjen = 485,3113.

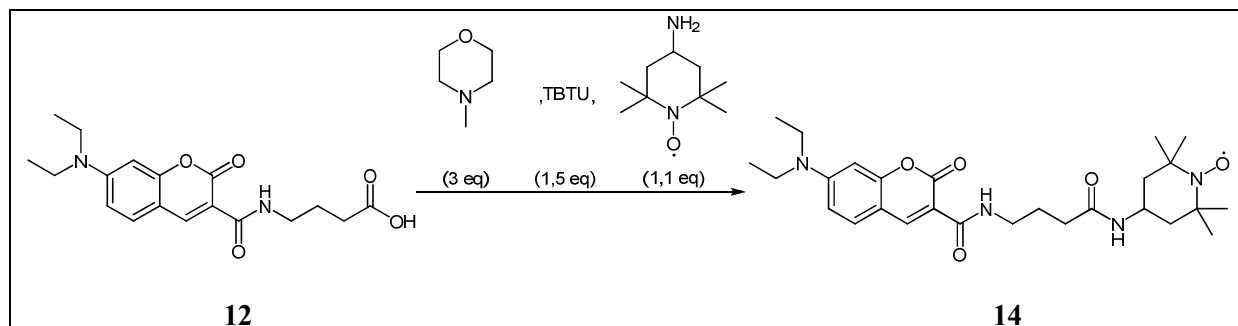
Elementna sestava: $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4$

$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4 \times 2/3 \text{H}_2\text{O}$	izračunana	dobljena
% C	65,30	65,69
% H	8,39	8,79
% N	11,28	11,30

Opomba: v ^1H -NMR vidimo signal vode pri 3,31 ppm

4.1.3.14 7-(Dietilamino)-*N*-(4-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-4-oksobutil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**14**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,633 g (1,83 mmol) spojine **12** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato dodamo 0,603 mL (5,48 mmol) *N*-metilmorfolina (po dodatku *N*-metilmorfolina se zmes zbistri in nastane raztopina), premešamo ter dodamo 0,880 g (2,74 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,344 g (2,01 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila, zopet preprihamo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H₂O (4 x 50 mL; po zadnjem spiranju s prečiščeno H₂O ostane vodna faza praktično brezbarvna). Vmesno fazo (navadno izgine že po prvem spiranju s prečiščeno H₂O), ki se pojavi med organsko fazo in vodno fazo, odlivamo k odpadni vodni fazi. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 50 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂:*n*-heksan=8:2 → MF₂ = CH₂Cl₂ → MF₃ = CH₂Cl₂:MeOH=9:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Pri sušenju na vakuumski črpalki nastane stabilna pena oranžne barve.

REZULTATI:

Izgled: oranžna stabilna pena

Izkoristek: 75,9% (0,693 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,58

T_{tal} = 77-85 °C (steklast prehod)

IR (KBr): 3462, 3328, 3080, 2973, 2932, 1701, 1637, 1618, 1582, 1542, 1534, 1511, 1419, 1352, 1233, 1188, 1135, 1077, 794 cm^{-1}

HRMS, m/z : izračunan za $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5^+$ = 500,2999 ($\text{M}+\text{H}^+$), izmerjen = 500,2980.

EPR: a_N (etanol) = 1,60 mT ($T = 295 \text{ K}$)

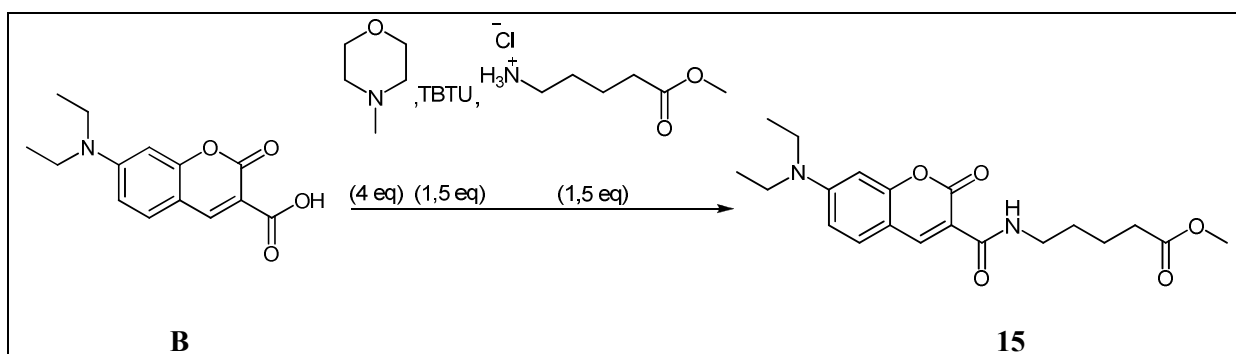
Elementna sestava: $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5^+$

$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5^+ \times 1/3 \text{ H}_2\text{O}$	izračunana	dobljena
% C	64,14	64,16
% H	7,91	8,30
% N	11,08	11,03

Opomba: v $^1\text{H-NMR}$ spektru bi morali videti signal za vodo, vendar $^1\text{H-NMR}$ spektra nismo posneli, saj je spojina paramagnetna

4.1.3.15 Metil 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)pentanoat (**15**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

2,50 g (9,58 mmol) spojine **B** raztopimo v 150 mL brezvodnega CH_2Cl_2 . Nato dodamo 4,21 mL (38,3 mmol) *N*-metilmorfolina, premešamo ter dodamo 4,61 g (14,4 mmol) TBTU-ja. Zmes preprihamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 2,41 g (14,4 mmol) 5-metoksi-5-oksopentan-1-amonijevega klorida, zopet preprihamo z argonom in mešamo 2,5-3

ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H₂O (5 x 50 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Oljnati preostanek prelijemo s 150-200 mL EtOAc. Topilo odparevamo pri znižanem tlaku. Ko izpadejo prvi kristali produkta (kristali so obarvani rumeno), zmes ohladimo na ledeni kopeli pri -10 °C (led/H₂O/NaCl). Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve), ki ga speremo s ~ 30 mL mrzle mešanice EtOAc in n-heskana v razmerju 2:1. Produkt posušimo in čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 100 g KP-SIL kolono in naslednji gradient mobilnih faz: MF₁ = CH₂Cl₂ → MF₂ = CH₂Cl₂:MeOH=49:1. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo.

REZULTATI:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 75,1% (2,69 g)

R_f (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,69

T_{tal} = 121-124 °C

IR (KBr): 3460, 3354, 3036, 2972, 2935, 2861, 2707, 2363, 2345, 1740, 1698, 1641, 1618, 1585, 1509, 1456, 1415, 1378, 1352, 1311, 1277, 1266, 1238, 1220, 1189, 1162, 1136, 1080, 1010, 797 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,23 (t, 6H, *J* = 7,12 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 1,60-1,78 (m, 4H, -CONH-CH₂CH₂CH₂CH₂-COO-); 2,36 (t, 2H, *J* = 7,09 Hz, -CONH-CH₂CH₂CH₂CH₂-COO-); 3,41-3,48 (m, 6H, 2 x -CH₂CH₃, -CONH-CH₂CH₂CH₂CH₂-COO-); 3,67 (s, 3H, -COO-CH₃); 6,49 (d, 1H, *J* = 2,41 Hz, H⁸-Ar); 6,64 (dd, 1H, *J*₁ = 2,42 Hz, *J*₂ = 8,94 Hz, H⁶-Ar); 7,42 (d, 1H, *J* = 8,93 Hz, H⁵-Ar); 8,69 (s, 1H, H⁴-Ar); 8,80 (t, 1H, *J* = 5,75 Hz, -CONH-CH₂-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,80; 22,78; 29,49; 34,06; 39,52; 45,43; 51,86; 96,92; 108,74; 110,30; 110,74; 131,43; 148,32; 152,87; 157,96; 163,10; 163,46; 174,15.

MS (ESI) = 244,1 (15%), 276,1 (10%), 375,2 (100%, M+H⁺).

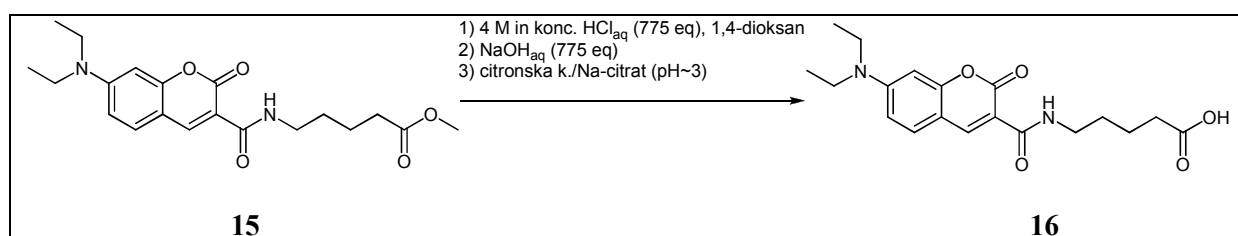
HRMS, *m/z*: izračunan za C₂₀H₂₆N₂O₅ = 375,1920 (M+H⁺), izmerjen = 375,1910.

Elementna sestava: C₂₀H₂₆N₂O₅

C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₅	izračunana	dobljena
% C	64,15	63,93
% H	7,00	7,05
% N	7,48	7,46

4.1.3.16 5-(7-(Dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karboksamido)pentanojska kislina (**16**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

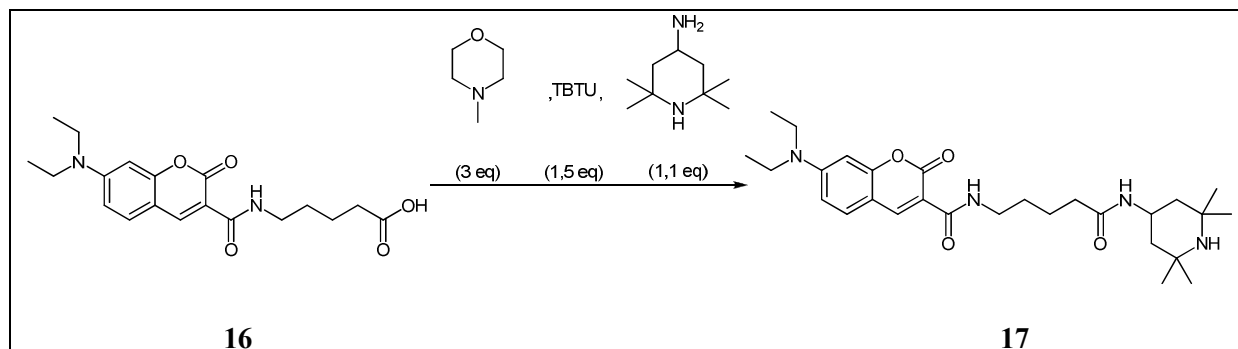
2,19 g (5,86 mmol) spojine **15** raztopimo v 80 mL 1,4-dioksana (po potrebi segrevamo, da se spojina **15** raztopi). Najprej dodamo 55 eq 4 M HCl (80,1 mL), nato pa postopoma (po kapljicah) dodamo 720 eq konc. HCl (349 mL). Potek hidrolize spremljamo in konec hidrolize potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Po končani hidrolizi v reakcijsko zmes postopoma in ob hlajenju na ledeni kopeli dodamo 775 eq NaOH (182 g NaOH, ki ga raztopimo v ~ 350 mL prečiščene H₂O). Med nevtralizacijo se reakcijska zmes najprej zelo zgosti (nastane blede rumena kašasta zmes – potrebno je paziti na ustrezno mešanje), proti koncu nevtralizacije pa se nekoliko razredči, kar olajša mešanje, čeprav izpade precej produkta v obliki rumenih kristalov. Z uporabo 4 M HCl in/ali 4 M NaOH uravnamo pH na ~ 3. Na koncu dodamo še 100-150 mL citratnega pufra s pH~3. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, prenesemo v lij ločnik ter ekstrahiramo s 30-40 mL CH₂Cl₂ tolikokrat, da postane zgornja faza v liju ločniku praktično brezbarvna. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt prelijemo z ~ 90 mL mešanice CH₂Cl₂ in n-heksana v razmerju 9:1 in nekajkrat segrejemo do vrelišča (spojina **16** je slabše topna v mešanici CH₂Cl₂:n-heksan=9:1 kot glavni nečistoči – spojina **B** in spojina **15**), nato pa zmes ohladimo na ledeni kopeli. Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzle mešanice CH₂Cl₂ in n-heksana v razmerju 1:1. Očiščeno spojino **16** nato dobro posušimo.

REZULTATI:**Izgled:** rumeni kristali**Izkoristek:** 76,0% (1,61 g)**R_f** (CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH) = 0,45**T_{tal}** = 169-171 °C**IR (KBr):** 3448, 3325, 2970, 2932, 2700, 2372, 2346, 1727, 1701, 1617, 1558, 1511, 1475, 1418, 1350, 1315, 1246, 1176, 1134, 1075, 1010, 822, 788 cm⁻¹**¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 1,14 (t, 6H, *J* = 6,95 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 1,50-1,55 (m, 4H, -CONH-CH₂CH₂CH₂CH₂-COOH); 2,25 (t, 2H, *J* = 5,90 Hz, -CONH-CH₂CH₂CH₂CH₂-COOH); 3,48 (q, 4H, *J* = 6,99 Hz, 2 x -CH₂CH₃); 6,61 (d, 1H, *J* = 2,24 Hz, H⁸-Ar); 6,79 (dd, 1H, *J*₁ = 2,36 Hz, *J*₂ = 9,00 Hz, H⁶-Ar); 7,67 (d, 1H, *J* = 8,98 Hz, H⁵-Ar); 8,58-8,65 (m, 2H, -CONH-CH₂-, H⁴-Ar); 12,00 (s, 1H, -COOH).Opomba: signal -CONH-CH₂CH₂CH₂CH₂-COOH je verjetno skrit v signalu za H₂O**¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ (ppm) 13,17; 22,88; 29,61; 34,19; 45,19; 96,71; 108,53; 110,38; 110,93; 132,35; 148,45; 153,22; 158,03; 162,63; 162,96; 175,21.**HRMS, *m/z*:** izračunan za C₁₉H₂₄N₂O₅ = 359,1607 (M-H⁺), izmerjen = 359,1601.**Elementna sestava:** C₁₉H₂₄N₂O₅

C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₅	izračunana	dobljena
% C	63,32	63,06
% H	6,71	6,90
% N	7,77	7,71

4.1.3.17 7-(Dietilamino)-2-okso-*N*-(5-okso-5-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)pentil)-2*H*-kromen-3-karboksamid (**17**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,835 g (2,32 mmol) spojine **16** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH_2Cl_2 . Nato dodamo 0,764 mL (6,95 mmol) *N*-metilmorfolina (po dodatku *N*-metilmorfolina se zmes zbistri in nastane raztopina), premešamo ter dodamo 1,12 g (3,48 mmol) TBTU-ja. Zmes prepihamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,445 mL (2,55 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina, zopet prepihamo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Iz reakcijske zmesi uparimo topilo pri znižanem tlaku, preostanek pa prelijemo s ~ 150 mL EtOAc. Del EtOAc odparimo pri znižanem tlaku, da ostane v bučki ~ 100 mL topila. Zmes ohladimo na ledeni kopeli pri $-10\text{ }^\circ\text{C}$ (led/ H_2O / NaCl) – spojina **17** se slabo raztoplja celo v vročem EtOAc, večina nečistoč pa je precej bolje topna tudi v mrzlem EtOAc. Odfiltriramo izpadli produkt (rumene barve) in ga speremo s ~ 30 mL mrzlega EtOAc ter posušimo. Nato produkt dodatno čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 50 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{n-heksan}=8:2 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Pri sušenju na vakuumski črpalki nastane zmes stabilne pene zelenorumenene barve in zelenorumenih kristalov.

REZULTATI:

Izgled: zmes zelenorumenene pene in zelenorumenih kristalov

Izkoristek: 61,4% (0,709 g)

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 9:1 + 3\% \text{Et}_3\text{N}$) = 0,33

T_{tal} = 61-67 $^\circ\text{C}$ (steklast prehod), 172-174 $^\circ\text{C}$ (kristali)

IR (KBr): 3447, 3328, 3080, 2968, 2930, 2870, 1701, 1654, 1647, 1638, 1618, 1583, 1541, 1534, 1511, 1419, 1352, 1232, 1188, 1135, 1077, 794 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 0,88-0,99 (m, 8H, 2 x $-\text{CH}_3$, 2 x $\text{CH}_2\text{-H}_a$); 1,11-1,16 (m, 12H, 2 x $-\text{CH}_3$, 2 x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,49-1,61 (m, 6H, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-}$ piperidin, 2 x $\text{CH}_2\text{-H}_b$); 2,06 (t, 2H, $J = 6,32$ Hz, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-}$ piperidin); 3,29 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-}$ piperidin); 3,31 (signal H_2O); 3,48 (q, 4H, $J = 7,09$ Hz, 2 x $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,99 (tdt, 1H, $J_1 = 3,83$ Hz, $J_2 = 7,96$ Hz, $J_3 = 12,33$ Hz, $-\text{CONH-CH}$); 6,61 (d, 1H, $J = 2,27$ Hz, $\text{H}^8\text{-Ar}$); 6,80 (dd, 1H, $J_1 = 2,31$ Hz, $J_2 = 9,08$ Hz, $\text{H}^6\text{-Ar}$); 7,56 (d, 1H, $J = 7,82$ Hz, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-}$ piperidin); 7,67 (d, 1H, $J = 8,97$ Hz, $\text{H}^5\text{-Ar}$); 8,61-8,64 (m, 2H, $-\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-}$ piperidin - in H^4).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 12,25; 22,87; 28,60; 28,78; 34,53; 35,12; 41,29; 44,27; 44,48; 50,28; 95,80; 107,60; 109,45; 110,02; 131,43; 147,52; 152,31; 157,11; 161,71; 162,00; 170,80.

HRMS, m/z : izračunan za $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4 = 499,3284$ ($\text{M}+\text{H}^+$), izmerjen = 499,3288.

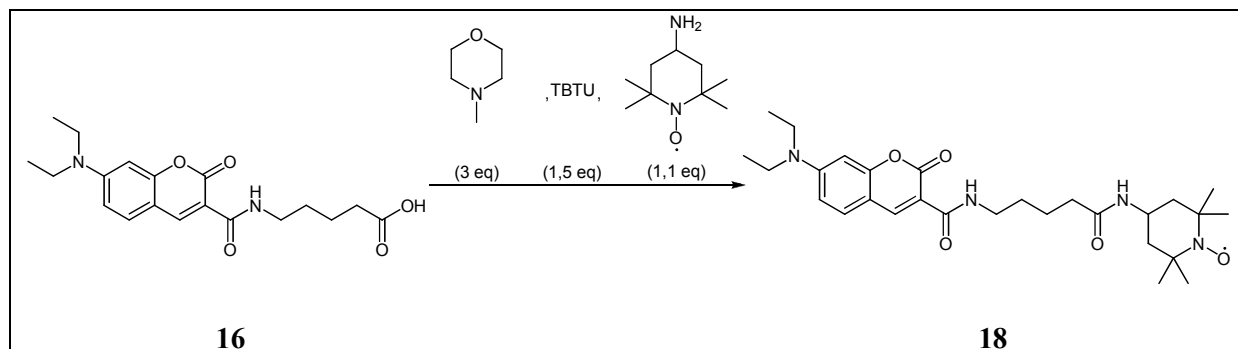
Elementna sestava: $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$

$\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	izračunana	dobljena
% C	65,09	65,38
% H	8,58	8,45
% N	10,84	10,88

Opomba: v ^1H -NMR vidimo signal vode pri 3,31 ppm

4.1.3.18 7-(Dietilamino)-*N*-(5-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-5-okso-pentil)-2-okso-2*H*-kromen-3-karboksamid (**18**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

0,730 g (2,03 mmol) spojine **16** raztopimo v 100 mL brezvodnega CH_2Cl_2 . Nato dodamo 0,668 mL (6,08 mmol) *N*-metilmorfolina (po dodatku *N*-metilmorfolina se zmes zbistri in nastane raztopina), premešamo ter dodamo 0,976 g (3,04 mmol) TBTU-ja. Zmes prepahamo z argonom in mešamo vsaj 30 min. Na koncu dodamo 0,382 g (2,23 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila, zopet prepahamo z argonom in mešamo 1,5-2 ure. Konec poteka reakcije potrdimo s tankoplastno kromatografijo. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in spiramo s prečiščeno H_2O (4 x 50 mL; po zadnjem spiranju s prečiščeno H_2O ostane vodna faza praktično brezbarvna). Vmesno fazo (navadno izgine že po prvem spiranju s prečiščeno H_2O), ki se pojavi med organsko fazo in vodno fazo, odlivamo k odpadni vodni fazi. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkt nato čistimo s pomočjo »flash« kromatografije z uporabo normalne stacionarne faze – uporabimo 50 g KP-NH kolono in naslednji gradient mobilnih faz: $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{n-heksan}=8:2 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$. S tankoplastno kromatografijo identificiramo čiste frakcije, ki jih združimo, uparimo topilo pri znižanem tlaku ter prečiščen produkt posušimo. Pri sušenju na vakuumski črpalki nastane stabilna pena rjavooranžne barve.

REZULTATI:

Izgled: rjavooranžna stabilna pena

Izkoristek: 91,3% (0,950 g)

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 9:1 + 3\% \text{CH}_3\text{COOH}$) = 0,57

T_{tal} = 183-185 °C

IR (KBr): 3313, 2975, 2934, 1701, 1663, 1637, 1617, 1583, 1530, 1513, 1418, 1230, 1200, 1187, 1133, 1074, 818, 791 cm^{-1}

HRMS, m/z : izračunan za $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5^+$ = 514,3155 ($\text{M}+\text{H}^+$), izmerjen = 514,3152.

EPR: a_{N} (etanol) = 1,61 mT ($T = 295 \text{ K}$)

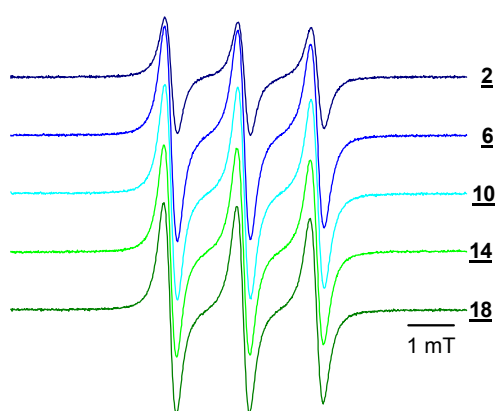
Elementna sestava: $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5^+$

$\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5^+$	izračunana	dobljena
% C	65,47	65,28
% H	8,05	8,08
% N	10,91	10,95

4.2 MERITVE EPR SPEKTROV NITROKSIDOV

4.2.1 MERITVE EPR SPEKTROV V ETANOLU

Pripravili smo 3 mM raztopine spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** v EtOH. Na analitski tehtnici smo v penicilinke natehtali približno točno 1 mg omenjenih spojin, jim z avtomatsko pipeto dodali takšen volumen EtOH, da je bila koncentracija 3mM in raztopine dali v ultrazvočno kadičko za toliko časa, da so nastale bistre raztopine. Spojinam **2**, **6**, **10**, **14** in **18** smo nato izmerili EPR spektre pri temperaturi 295 K (slika 9).



Slika 9. EPR spektri spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** v EtOH (T = 295 K)

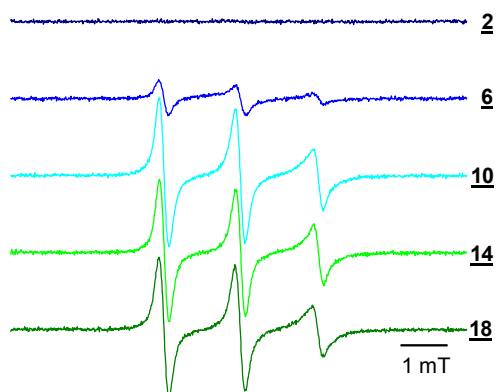
4.2.2 MERITVE EPR SPEKTROV V MICELIH

Spojine **2**, **6**, **10**, **14** in **18** smo vgradili v micele in jim pomerili EPR spektre. Micele smo pripravili tako, da smo odmerili 33 μ L 3 mM raztopine spinskega označevalca (spojine **2**, **6**, **10**, **14** in **18**) v EtOH v plastično epruveto in odparili topilo na rotavaporju pri znižanem tlaku. Nato smo dodali 100 μ L raztopine PAS v PBS pufru (pH = 7,4) in zmes stresali na stresalniku 1-2 min (uporabljene raztopine PAS so navedene v tabeli 1).

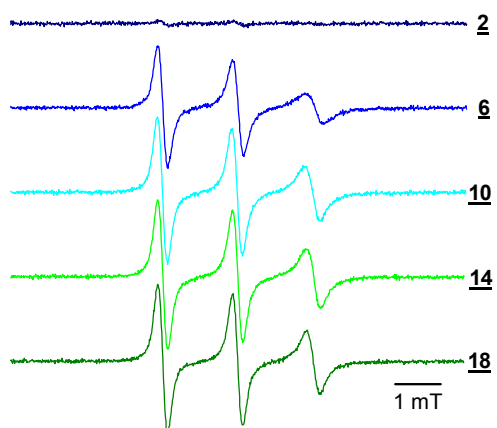
Tabela 1. Raztopine PAS, ki smo jih uporabili za tvorbo micelov.

PAS	koncentracija	pufer
TRITON-X-100	15 μ M	PBS pufer
CETRIMID	15 μ M	pH = 7,4
SDS	20 μ M	

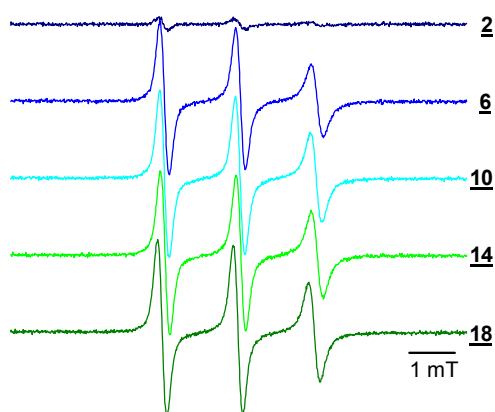
Tako pripravljenim raztopinam micelov označenih s spinskim označevalcem smo pomerili EPR spektre pri temperaturi 295 K (slike 10-12).



Slika 10. EPR spektri spojin 2, 6, 10, 14 in 18 vgrajenih v micelle iz PAS TRITON-X-100 (T = 295 K)



Slika 11. EPR spektri spojin 2, 6, 10, 14 in 18 vgrajenih v micelle iz PAS CETRIMID (T = 295 K)



Slika 12. EPR spektri spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** vgrajenih v micelle iz PAS SDS (T = 295 K)

4.2.3 OKSIDACIJA SPOJINE **5** Z VODIKOVIM PEROKSIDOM IN MERITEV EPR SPEKTRA

Posneli smo 3 EPR spektre z namenom, da ugotovimo oz. potrdimo nastanek nitroksida (nastanek spojine **6**) iz izhodne spojine **5**. V ta namen smo pripravili 3 raztopine:

- **Raztopina A:**

Pripravili smo 0,821 mM raztopino spojine **5**, in sicer tako, da smo v 25 mL bučko zatehtali 0,00525 g (0,0115 mmol) spojine **5**, dodali 7 mL MeOH in 7 mL H₂O, nato pa zmes premešali, da je nastala bistra raztopina.

- **Raztopina B:**

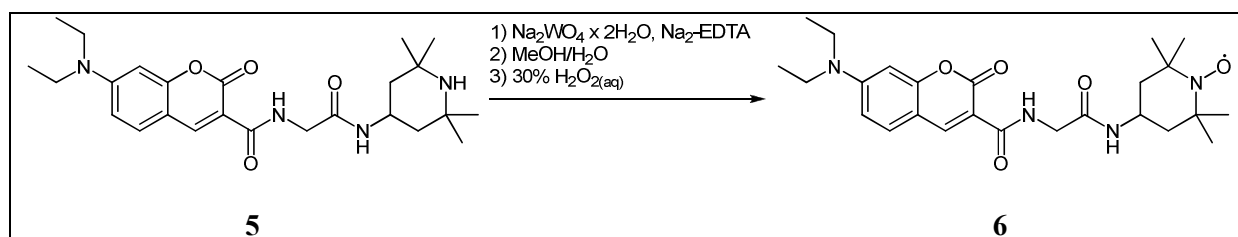
V 25 mL bučko smo zatehtali 0,00525 g (0,0115 mmol) spojine **5**, 0,0379 g (0,115 mmol; 10 eq) Na₂WO₄ × 2H₂O in 0,0428 g (0,115 mmol; 10 eq) Na₂-EDTA. Nato smo dodali 7 mL MeOH, 6 mL H₂O in 1,00 mL 30% vodne raztopine H₂O₂ (9,70 mmol; 843 eq). Zmes smo premešali, da je nastala raztopina z 0,821 mM koncentracijo spojine **5**.

- **Raztopina C:**

V 25 mL bučko smo zatehtali 0,00525 g (0,0115 mmol) spojine **5**, 0,0379 g (0,115 mmol; 10 eq) Na₂WO₄ × 2H₂O in 0,0428 g (0,115 mmol; 10 eq) Na₂-EDTA. Nato smo dodali 7 mL MeOH in 7 mL H₂O. Zmes smo premešali, da je nastala raztopina z 0,821 mM koncentracijo spojine **5**.

Tabela 2. Sestava raztopin A, B in C.

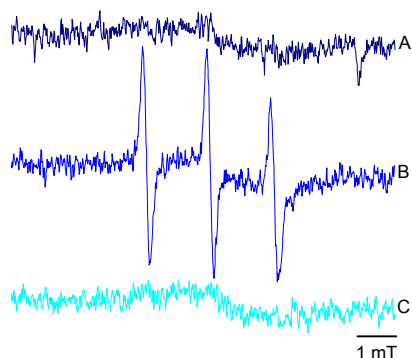
	Sestavine raztopin	Raztopina A	Raztopina B	Raztopina C
	Spojina 5	+	+	+
Reagenti za oksidacijo spojine 5 do nitroksida	Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O		+	+
	Na ₂ -EDTA		+	+
	H ₂ O ₂ (30% raztopina)		+	
Topila	MeOH	+	+	+
	H ₂ O	+	+	+
Koncentracija raztopine [mM]		0,821	0,821	0,821

Reakcija oksidacije spojine **5 do nitroksida (nastanek spojine **6**)**

Na-volframat dihidrat (Na₂WO₄ x 2H₂O) deluje v reakciji kot katalizator. Topen je v vodi, za boljše raztapljanje pa potrebuje Na₂-EDTA. Vodikov peroksid (H₂O₂) oksidira spojino **5** do nitroksida (spojina **6**). MeOH je dodan zaradi boljšega raztapljanja spojine **5** oz. s kombinacijo uporabe H₂O in MeOH kot topil dosežemo, da se raztopita tako Na-volframat kot tudi spojina **5**.

Snemanje EPR spektrov

Raztopinam A, B in C (katerih postopek priprave je opisan zgoraj) smo posneli EPR spektre pri temperaturi 295 K. Vsak spekter je bil posnet le enkrat (nismo izboljševali razmerja med signalom in šumom z večkratnim snemanjem EPR spektra). Posneti spektri so prikazani na sliki 13. Spekter raztopine A je označen z »A«, spekter raztopine B je označen z »B« in spekter raztopine C je označen s »C«.

**Slika 13. EPR spektri raztopin A, B in C.**

4.3 MERITVE EKSCITACIJ IN EMISIJ

4.3.1 PRIPRAVA RAZTOPIN ZA MERITVE EMISIJ IN EKSCITACIJ

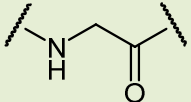
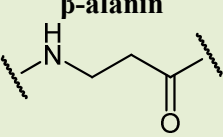
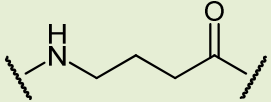
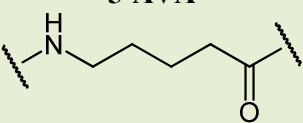
Pripravili smo 2, 3, 4, 5 in 6 mM raztopine spojin 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18 v DMSO. Na analitski tehtnici smo v penicilinke natehtali približno točno 10 mg omenjenih spojin, jim z avtomatsko pipeto dodali takšen volumen DMSO, da je bila koncentracija 2 mM in raztopine dali v ultrazvočno kadičko za toliko časa, da so nastale bistre raztopine. Pri spojinah, ki so se nekoliko težje raztapljale (predvsem 1 in 2, tudi 17 in 18), smo penicilinke segrevali, da smo raztopili celotno količino spojin. Tako pripravljene 2 mM raztopine smo razredčevali z DMSO, da smo dobili še 3, 4, 5 in 6 mM raztopine spojin 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18. Za pripravo 3 mM raztopin omenjenih spojin smo vzeli 60 μ L 2 mM raztopine posamezne spojine in ji dodali 540 μ L DMSO. Na enak način smo pripravili 4 mM raztopine omenjenih spojin iz 3 mM raztopin teh spojin itd. Pri spojinah 1 in 2 smo ob segrevanju in ob uporabi ultrazvočne kadičke le za kratek čas uspeli dobiti 2 mM homogeni suspenziji (ves produkt se ni raztopil), iz katerih smo potem naredili razredčitvi na 3 mM raztopini, ki pa sta ostali stabilni tudi pri sobni T (ni prišlo do obarjanja spojin 1 in 2).

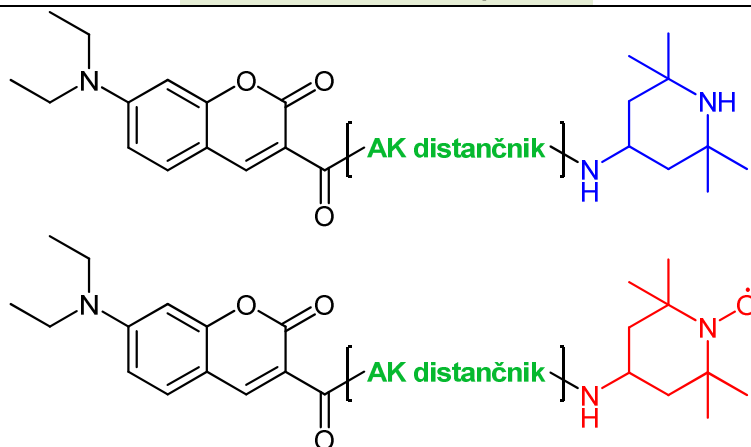
4.3.2 MERITVE EKSCITACIJSKIH SPEKTROV

Spojinam 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18 smo izmerili ekscitacijske spektre na instrumentu Tecan infinite M1000. Spojine smo ekscitirali pri valovnih dolžinah od 350 do 470 nm. Emisijo svetlobe smo merili pri 500 nm. Za snemanje ekscitacijskih spektrov smo uporabili 4 mM raztopine spojin 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18 v DMSO. Temperatura snemanja je bila 28,3 °C (301,3 K).

Na slikah 14-18 so prikazani ekscitacijski spektri 4 mM raztopin spojin 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18 v DMSO, in sicer v parih sekundarni amin/nitroksid z enakim aminokislinskim distančnikom med fluoroforom kumarinskega tipa in piperidinskim delom molekule (piperidinski del molekule je pri spojinah 2, 6, 10, 14 in 18 oksidiran do nitroksida, pri spojinah 1, 5, 9, 13 in 17 pa ne). V tabeli 3 so prikazani uporabljeni distančniki pri omenjenih spojinah in tipi spojin glede na piperidinski del molekule (oksidirana oblika je nitroksid, neoksidirana pa sekundarni amin).

Tabela 3. Prikaz uporabljenih aminokislinskih distančnikov pri spojinah, ki smo jim izmerili ekscitacijske in emisijske spektre, tipi spojin (»tip spojine« se nanaša na piperidinski del molekule – oksidirana je »nitroksid«, neoksidirana pa »sekundarni amin«) **in shema strukture »nitroksidov« ter »sekundarnih aminov«.**

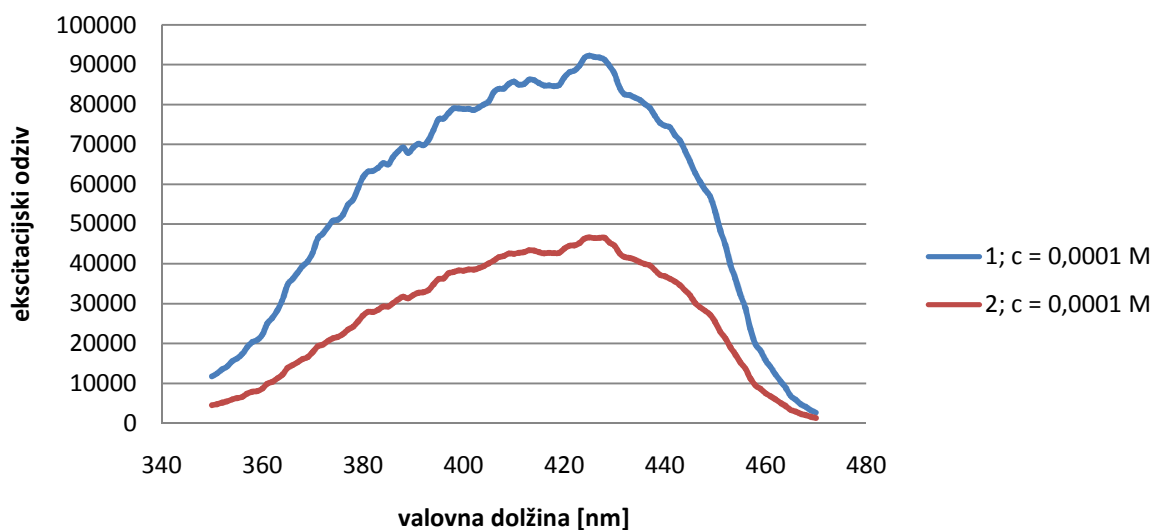
Spojina	Aminokislinski distančnik	Tip spojine (nanaša se na piperidinski del molekule)
<u>1</u>	/	sekundarni amin
<u>2</u>		nitroksid
<u>5</u>	glicin	sekundarni amin
<u>6</u>		nitroksid
<u>9</u>	β -alanin	sekundarni amin
<u>10</u>		nitroksid
<u>13</u>	GABA	sekundarni amin
<u>14</u>		nitroksid
<u>17</u>	5-AVA	sekundarni amin
<u>18</u>		nitroksid



Z daljšim aminokislinskim distančnikom narašča razdalja med fluoroforom kumarinskega tipa in piperidinskim delom molekule.

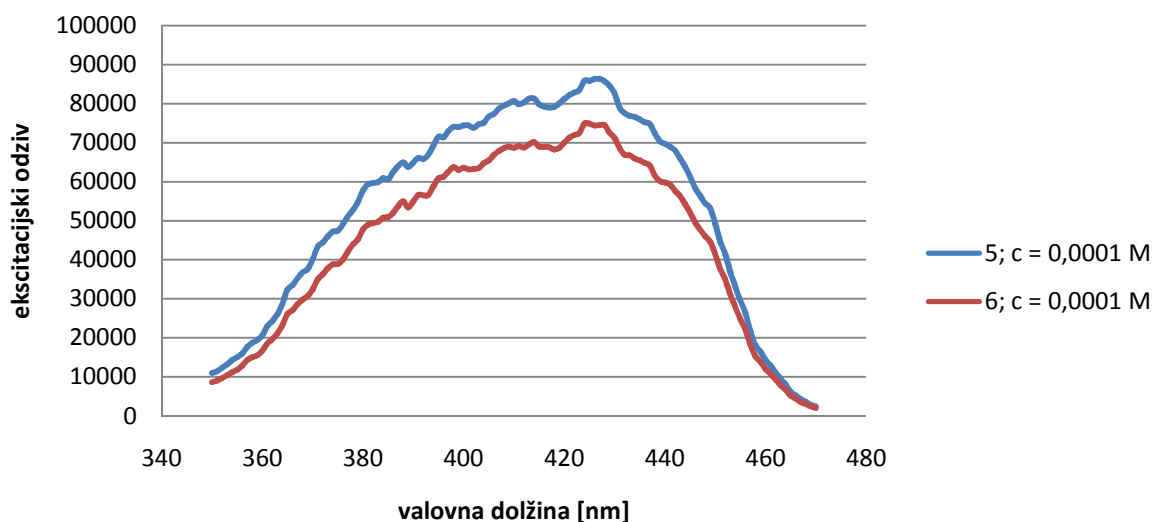
Prikaz ekscitacijskih spektrov 4 mM raztopin spojin 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18 v DMSO, in sicer v parih sekundarni amin-nitroksid z enakim aminokislinskim distančnikom v molekuli – slike 14-18:

Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 1 in 2 v DMSO



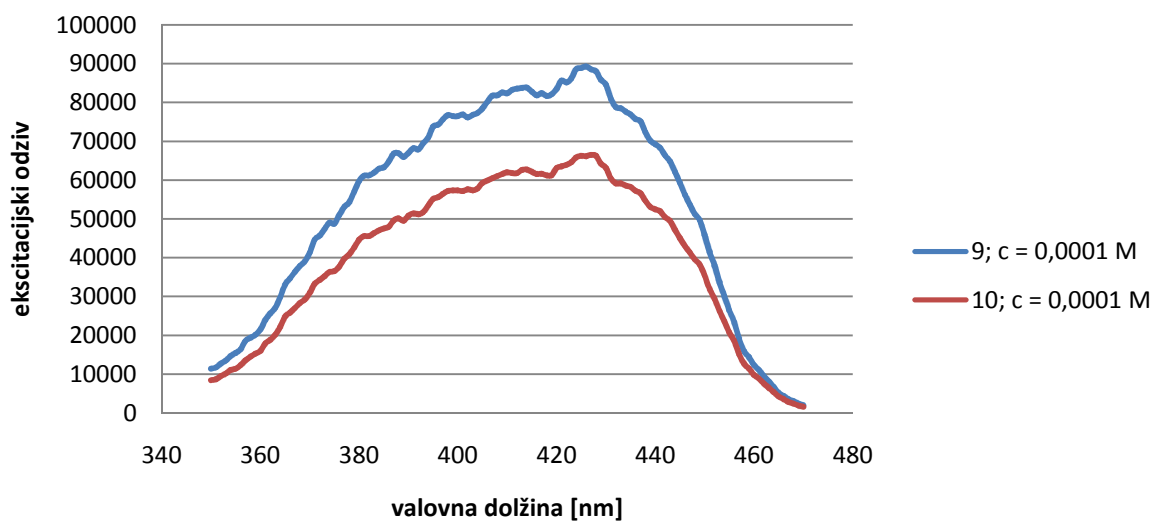
Slika 14. Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 1 in 2 v DMSO (med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule ni aminokislinskega distančnika).

Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 5 in 6 v DMSO



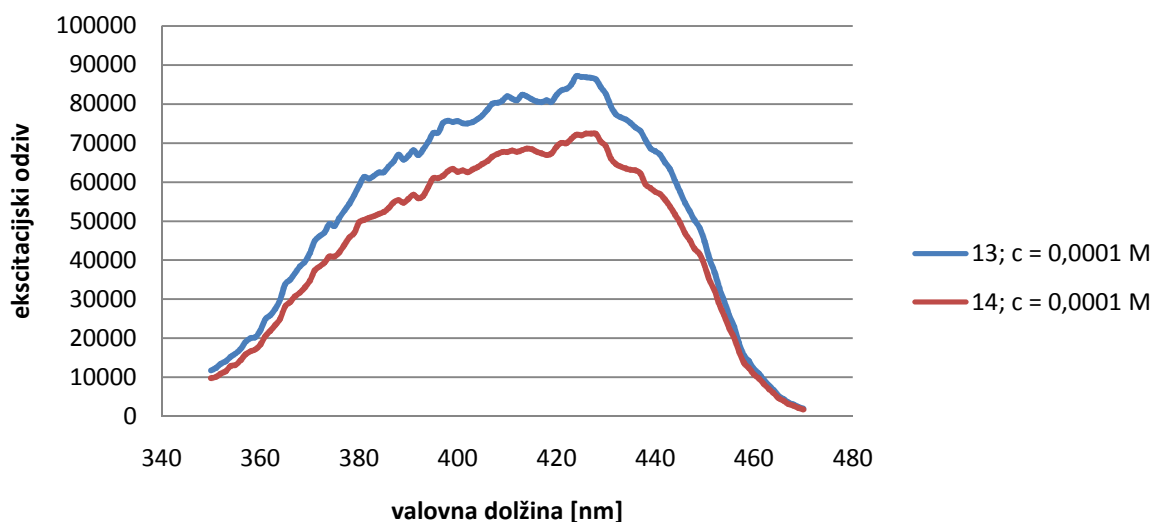
Slika 15. Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 5 in 6 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je glicin).

Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 9 in 10 v DMSO



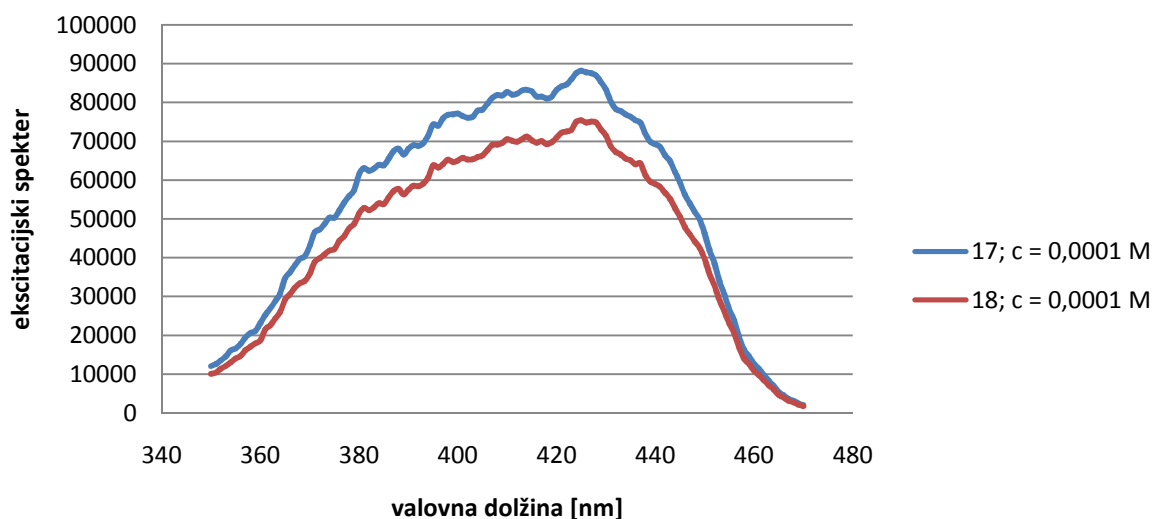
Slika 16. Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 9 in 10 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je β -alanin).

Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 13 in 14 v DMSO



Slika 17. Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 13 in 14 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je GABA).

Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 17 in 18 v DMSO

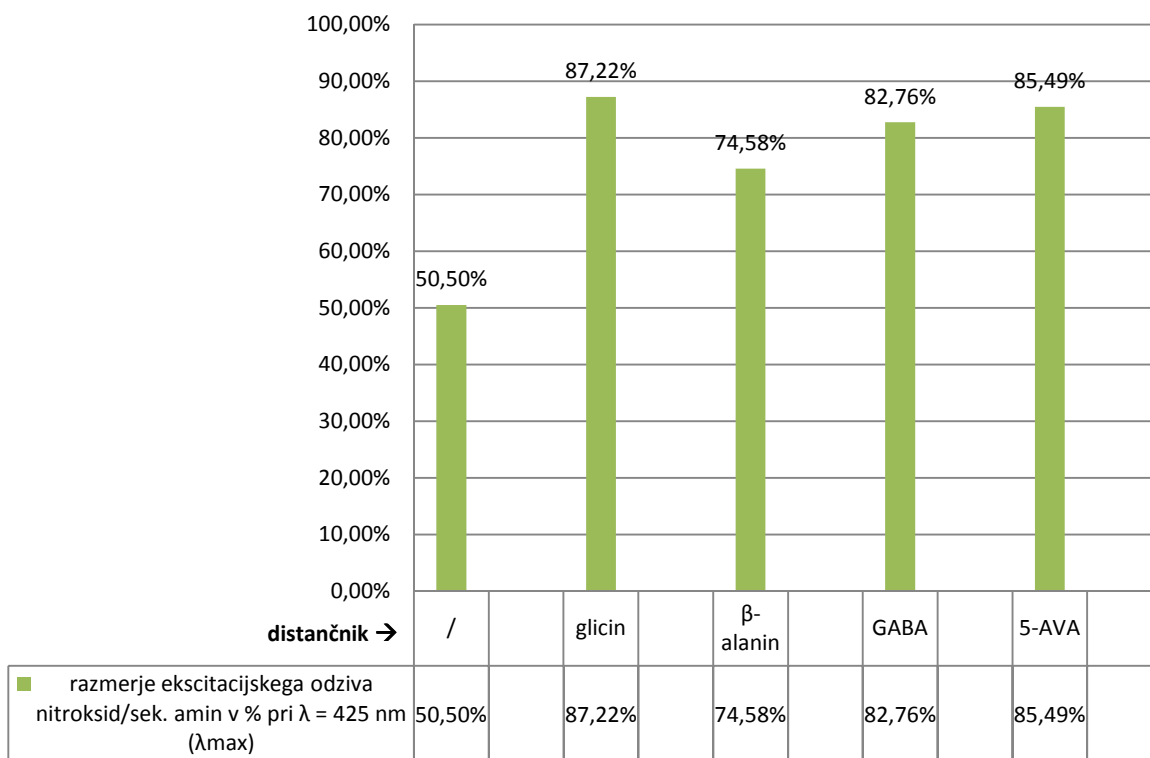


Slika 18. Ekscitacijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 17 in 18 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je 5-AVA).

Povprečna valovna dolžina ekscitacije, pri kateri je bil ekscitacijski odziv (emisija) največji, je bila 425 nm (λ_{\max}). Pri tej valovni dolžini smo izračunali razmerje ekscitacijskega odziva (emisije) med nitroksidom in sekundarnim aminom v odvisnosti od aminokislinskega distančnika (grafični prikaz na sliki 19). Spodaj je prikaz izračuna omenjenega razmerja v %.

$$\text{razmerje ekscit. odziva} = \left(\frac{\text{odziv nitroksida}}{\text{odziv sek. amina}} \right) \times 100\%$$

Razmerje ekscitacijskega odziva nitroksid/sek. amin v % pri $\lambda = 425 \text{ nm}$ (λ_{max})



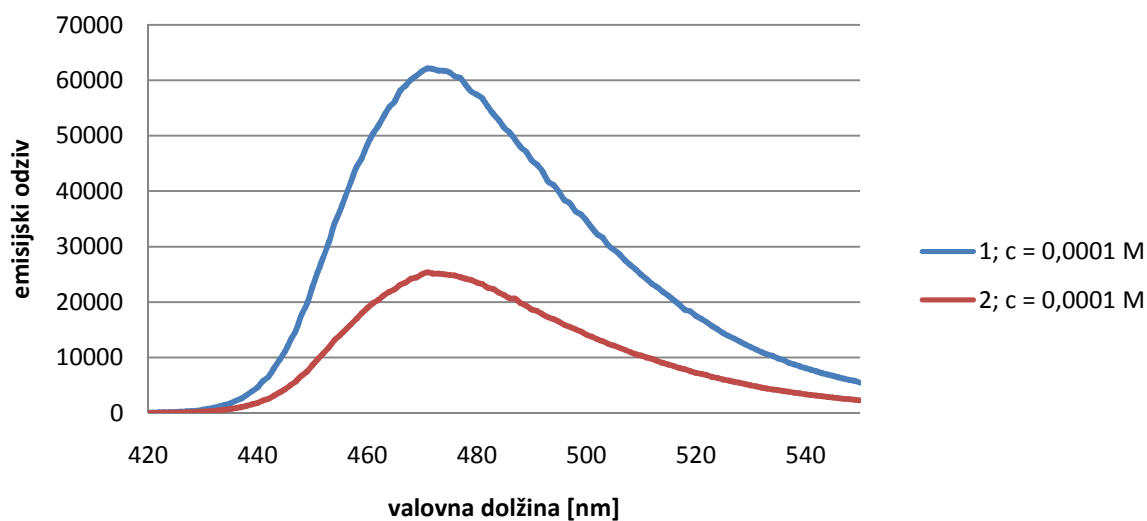
Slika 19. Grafični prikaz razmerja ekscitacijskega odziva nitroksid/skundarni amin v % pri $\lambda = 425 \text{ nm}$ (λ_{max}).

4.3.3 MERITVE EMISIJSKIH SPEKTROV

Spojnam **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** smo izmerili emisijske spektre na instrumentu Tecan infinite M1000. Spojine smo ekscitirali pri valovni dolžini 380 nm in merili emisijo v območju od 420 do 550 nm. Za snemanje emisijskih spektrov smo uporabili 2, 3, 4, 5 in 6 mM raztopine spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** v DMSO. Temperatura snemanja je bila 26,6 °C (299,6 K).

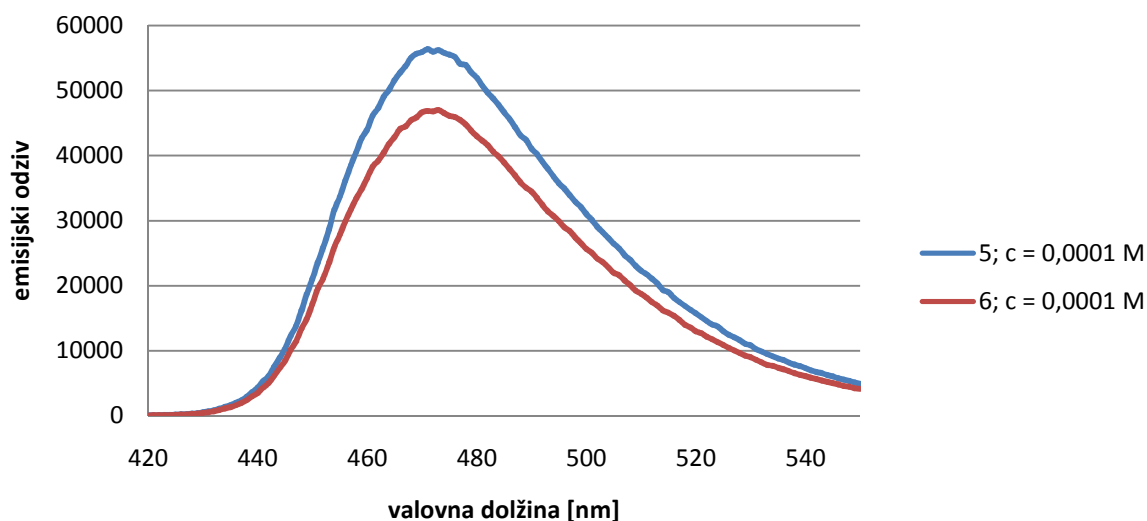
Na slikah 20-24 so prikazani emisijski spektri 4 mM raztopin spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** v DMSO, in sicer v parih sekundarni amin-nitroksid z enakim aminokislinskim distančnikom v molekuli (glej tudi tabelo 3).

Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 1 in 2 v DMSO



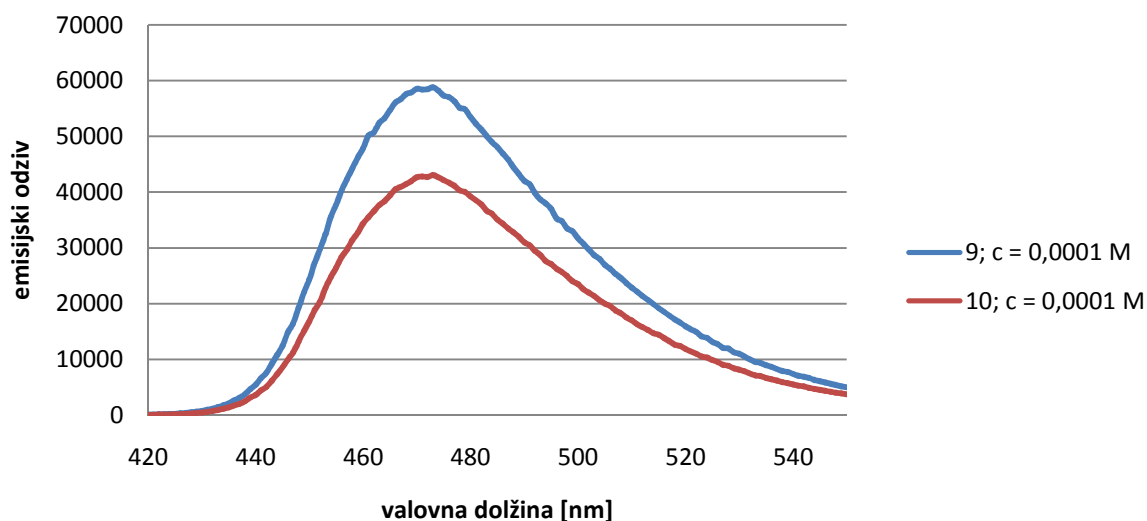
Slika 20. Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 1 in 2 v DMSO (med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule ni aminokislinskega distančnika).

Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 5 in 6 v DMSO



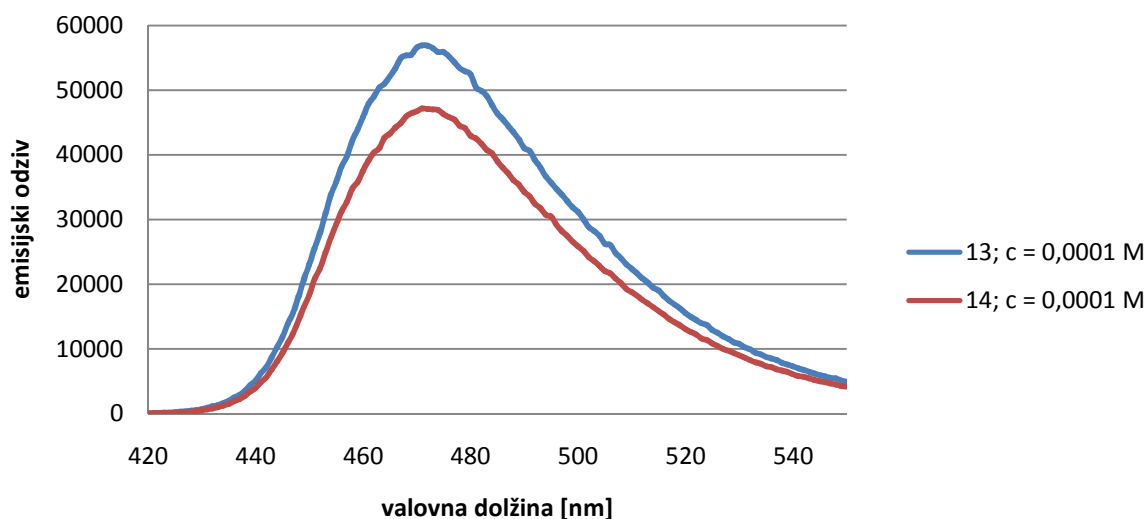
Slika 21. Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojina 5 in 6 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je glicin).

Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 9 in 10 v DMSO



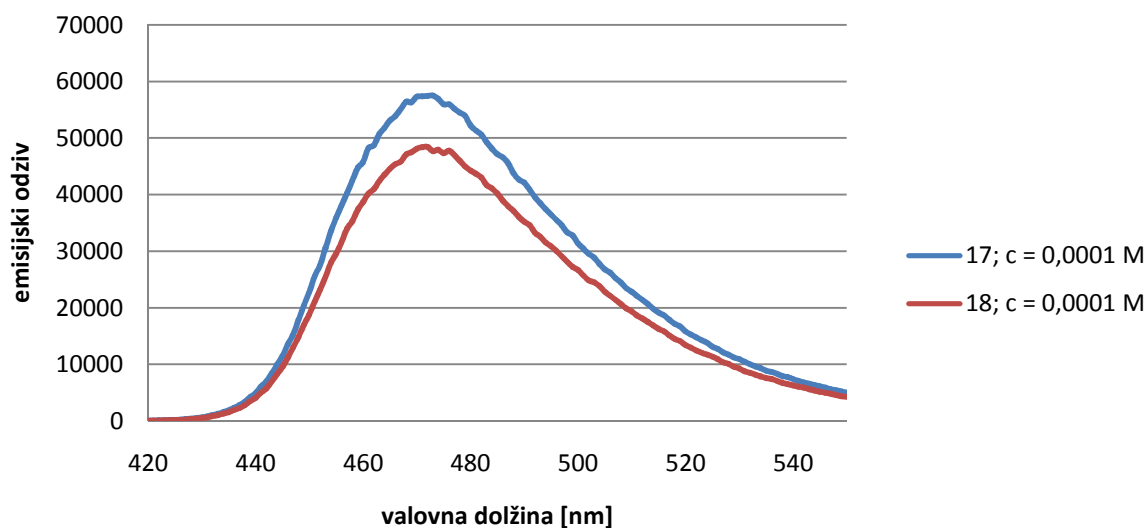
Slika 22. Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 9 in 10 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je β -alanin).

Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 13 in 14 v DMSO



Slika 23. Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 13 in 14 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je GABA).

Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 17 in 18 v DMSO



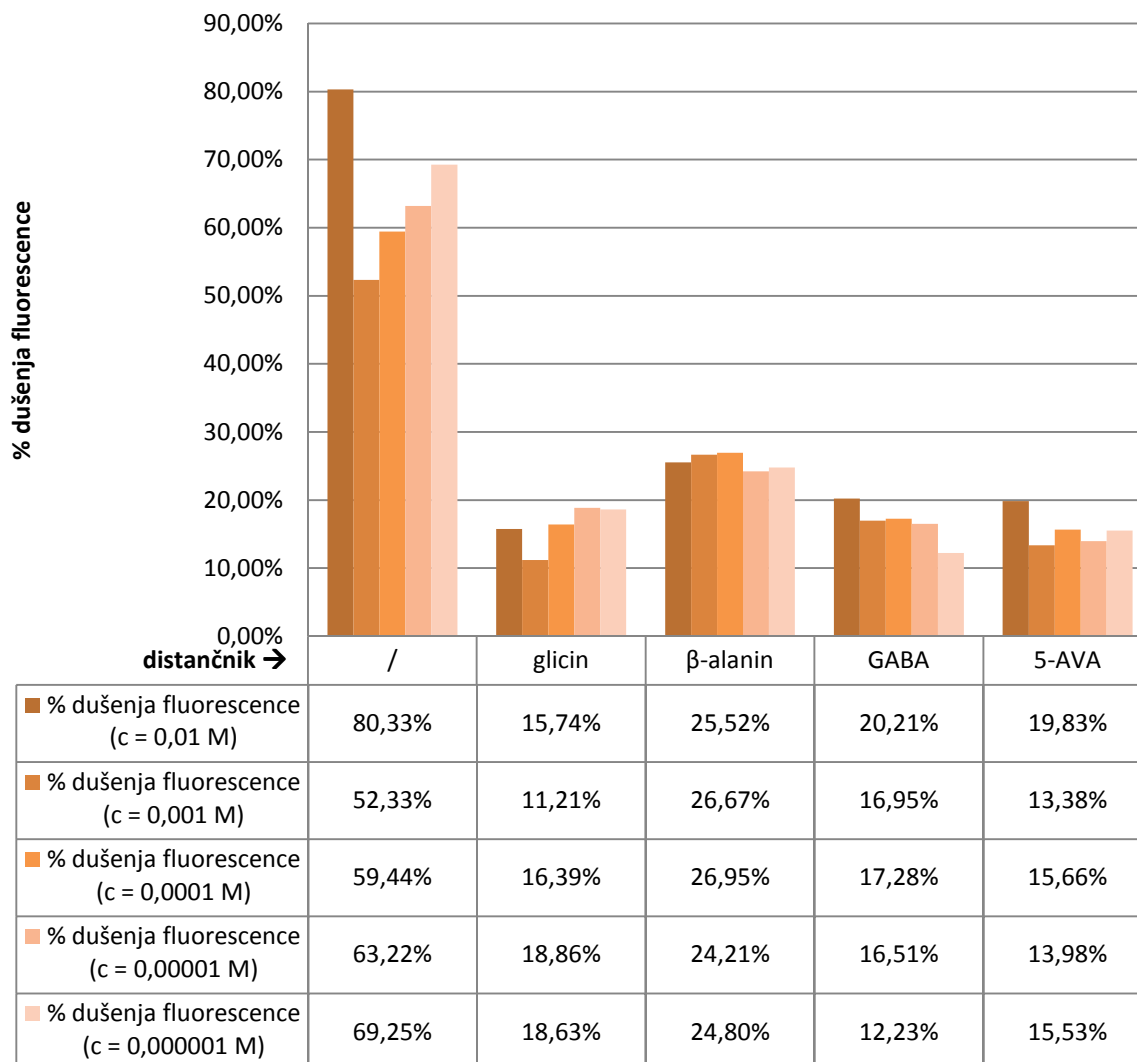
Slika 24. Emisijski spekter 10^{-4} M raztopin spojin 17 in 18 v DMSO (aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in piperidinskim delom molekule je 5-AVA).

Maksimalni emisijski odziv za spojine 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18 je bil pri 472 nm. Pri tej valovni dolžini smo izračunali razmerje odziva med nitroksidom in sekundarnim aminom za vsak par spojin z enakim aminokislinskim distančnikom posebej. Ker spojine, ki vsebujejo nitroksid v strukturi, dušijo fluorescenco fluorofora (kumarinski del molekule), nam izračunano razmerje predstavlja delež oz. % dušenja fluorescence v odvisnosti od aminokislinskega distančnika.

$$\% \text{ dušenja fluorescence} = \left(\frac{\text{odziv nitroksida}}{\text{odziv sek. amina}} \right) \times 100\%$$

Na sliki 25 je prikaz % dušenja fluorescence v odvisnosti od aminokislinskega distančnika za spojine 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 in 18, in sicer v parih nitroksid-sekundarni amin z enakim aminokislinskim distančnikom. Ker gre za raztopine različnih koncentracij, je razvidna tudi koncentracijska odvisnost % dušenja fluorescence za omenjene spojine.

% dušenja fluorescence (prikaz vpliva aminokislinskega distančnika in koncentracije)

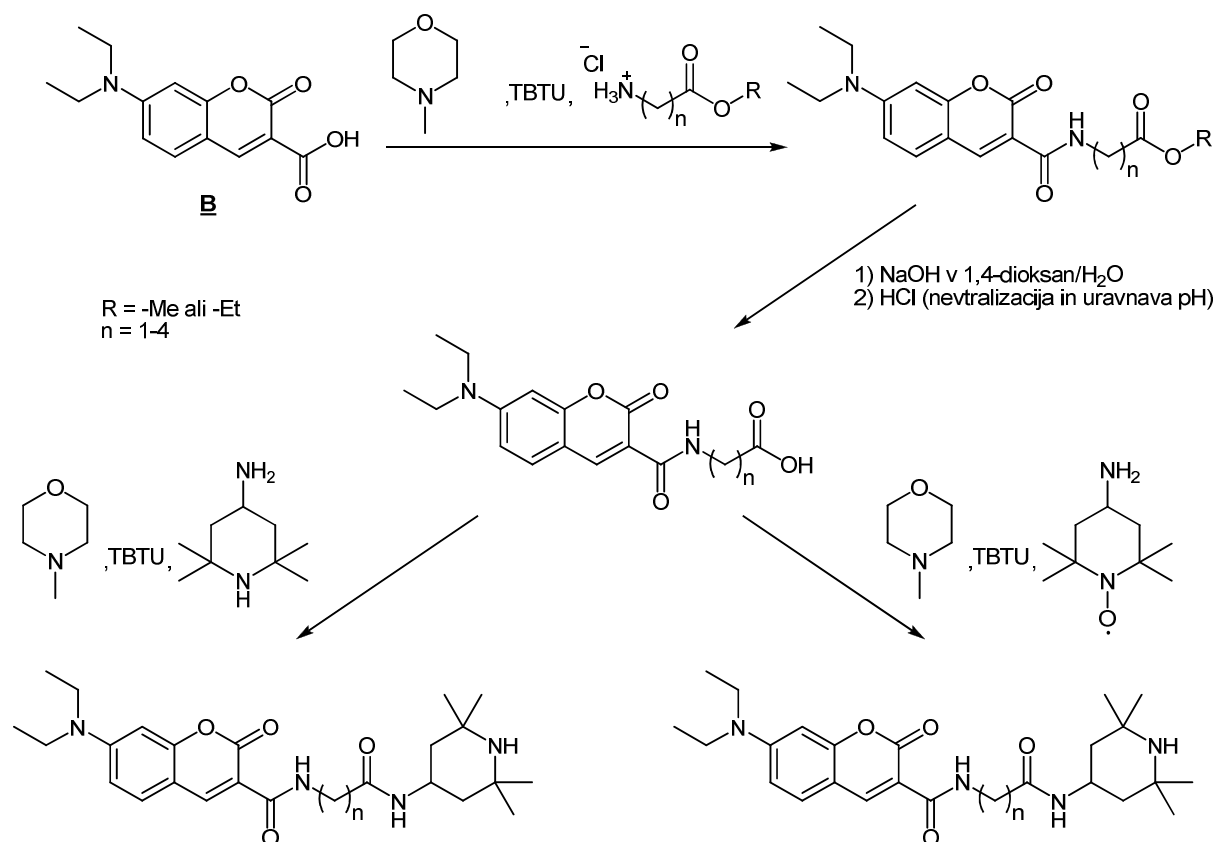


Slika 25. Grafični in numerični prikaz % dušenja fluorescence v odvisnosti od aminokislinskega distančnika za pare nitroksid-sekundarni amin z enakim aminokislinskim distančnikom pri različnih koncentracijah raztopin ($c = 10^{-2}$, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} in 10^{-6} M); oddaljenost piperidinskega dela molekule od kumarinskega fluorofora narašča od leve proti desni; koncentracija raztopin pada od leve proti desni (grafični prikaz) oz. od zgoraj navzdol (tabela).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Sinteza

Sinteza končnih spojin **5**, **9**, **13** in **17** ter **6**, **10**, **14** in **18** ni optimalna, saj namen tega diplomskega dela ni bila optimizacija sinteze oz. iskanje čim bolj učinkovite poti sinteze omenjenih spojin, ampak zgolj priprava teh spojin za karakterizacijo in testiranje. Originalna ideja sinteze je bila: tvorba amidne vezi med izhodno spojino **B** in na -COOH skupini z estrom zaščiteno aminokislino, nato hidroliza estra z NaOH in na koncu tvorba amidne vezi med odščiteno amiokislinsko -COOH skupino in -NH₂ skupino bodisi nitroksidnega fragmenta bodisi sekundarnega amina piperidinskega tipa (strukturni analog nitroksida). Prva stopnja sinteze končne spojine - pripenjanje zaščitene aminokislina na izhodno spojino **B** - je potekala v okviru pričakovanj. Prav tako smo te spojine dokaj enostavno izolirali z ekstrakcijo ter čistili s prekristalizacijo iz EtOAc ali s preparativno kolonsko kromatografijo visoke ločljivosti (Isolera). Neuspešna je bila žal naslednja stopnja v sintezi - bazična hidroliza estra na aminokislini z NaOH in s tem selektivna odščita na izhodno spojino **B** že pripete aminokislina. Pot originalno načrtovane sintezne poti je prikazana na sliki 26.

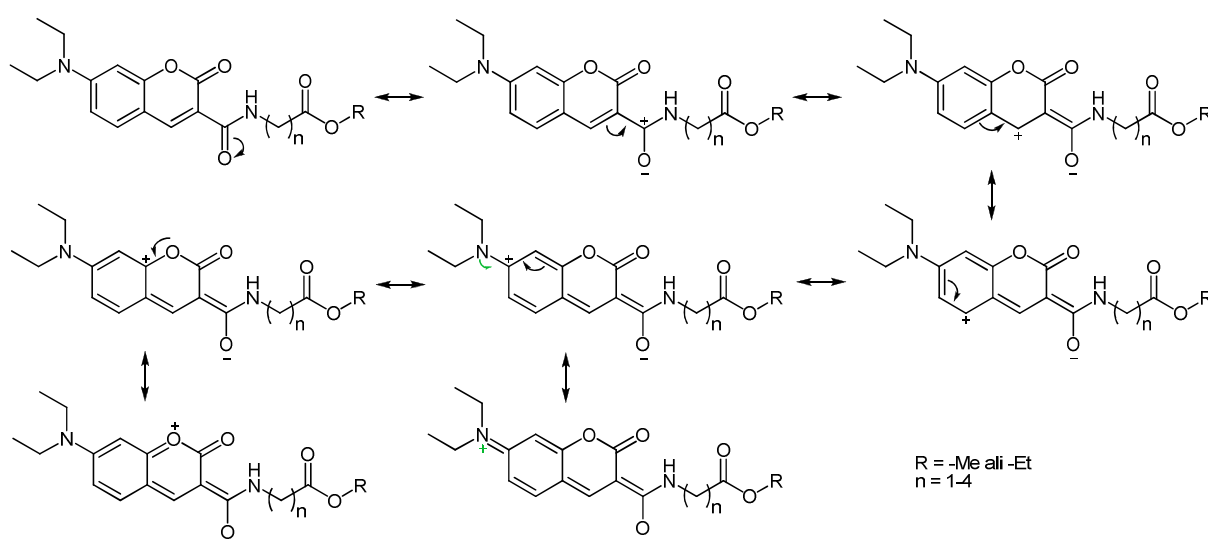


Slika 26. Originalno načrtovana sintezna pot priprave spojin **5**, **9**, **13** in **17** ter **6**, **10**, **14** in **18**.

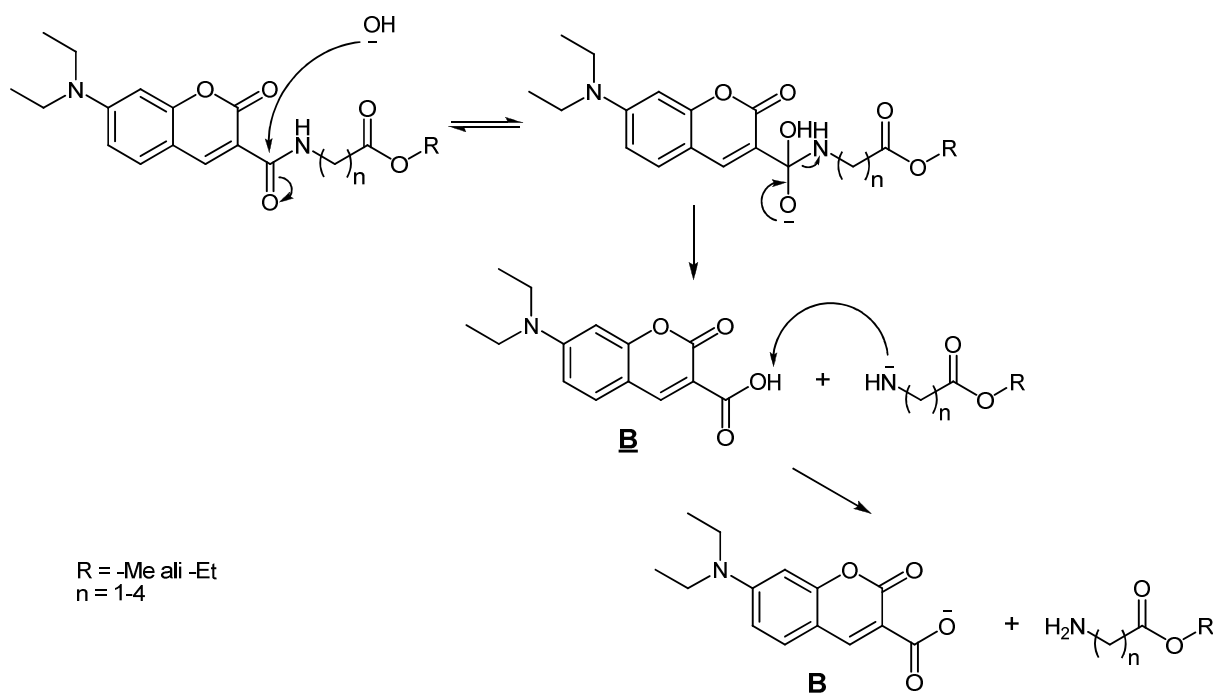
Pri zgoraj omenjenem načinu sinteze končnih spojin smo se zanašali na “dejstvo” (ki seveda vedno ne drži), da je estrska vez (estrška zaščita aminokislina na $-\text{COOH}$ skupini), kadar imamo opravka z metilnimi ali etilnimi estri, bolj občutljiva na bazično hidrolizo z NaOH kot pa amidna vez, ki je nastala pri reakciji pripenjanja zaščitene aminokislina na izhodno spojino **B**. V tej stopnji sinteze smo naleteli na presenečenje, saj se je amidna vez pri bazični hidrolizi z NaOH hidrolizirala istočasno kot estrska vez. Bazično hidrolizo z NaOH smo izvajali v mediju 1,4-dioksan/ H_2O . Postopoma smo po kapljicah dodajali 1 ali 2 M vodno raztopino NaOH v raztopino spojine pripravljene v prejšnji stopnji sinteze (pripenjanje na $-\text{COOH}$ skupini z estrom zaščitene aminokislina na izhodno spojino **B**) v 1,4-dioksanu. Ko smo potek reakcije spremljali s tankoplastno kromatografijo, smo po dodatku določenega števila eq NaOH zaznali spremembo. Po izolaciji in čiščenju dobljenega produkta smo z analizami ugotovili nastanek spojine **B**, ki pa je bila naša izhodna spojina. Poizkušali smo bolj natančno določiti št. eq dodatka NaOH, pri katerem bi hidrolizirala le estrska vez, amidna pa ne, vendar so bili vsi poizkusi neuspešni. Poizkušali smo spreminjati različne pogoje hidrolize in prišli do naslednjih zaključkov:

- pri manjšem št. eq NaOH-ja, kot je bilo št. eq, pri katerem smo s tankoplastno kromatografijo zaznali končno točko hidrolize, in daljšem času trajanja reakcije (npr. dan ali dva namesto nekaj ur), ni prišlo do hidrolize ne estrske ne amide vezi
- izvajanje reakcije pri sobnih pogojih ali pri refluxu ni imelo vpliva ne na selektivnost poteka reakcije ne na hitrost poteka reakcije
- spreminjanje koncentracije dodane raztopine NaOH (npr. uporaba 1M raztopine namesto 2M raztopine) ni imelo vpliva na potek reakcije
- edini vpliv na reakcijo je imelo št. dodanih eq NaOH

Vzrok za občutljivost amidne vezi na bazično hidrolizo (bazična hidroliza amidne vezi je prikazana na sliki 27) je verjetno resonančna stabilizacija kationa na karbonilni skupini v amidni vezi prek celotnega kumarinskega skeleta. Resonančno stabilizacijo prikazuje slika 26.



Slika 26. Resonančna stabilizacija kationa na karbonilni skupini v amidni vezi.

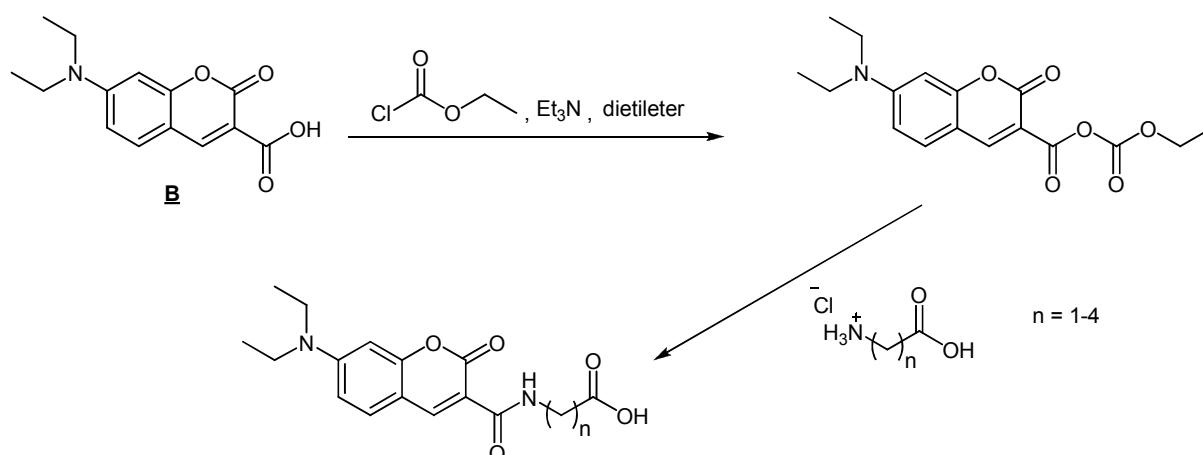


Slika 27. Bazična hidroliza amidne vezi ob kumarinskem fluoroforu.

Ker se je prvotno predpostavljena možna pot sinteze končnih spojin **5**, **9**, **13** in **17** ter **6**, **10**, **14** in **18** ustavila že pri pripravi predstopenj teh spojin (**4**, **8**, **12** in **16**), smo iskali druge načine sinteze.

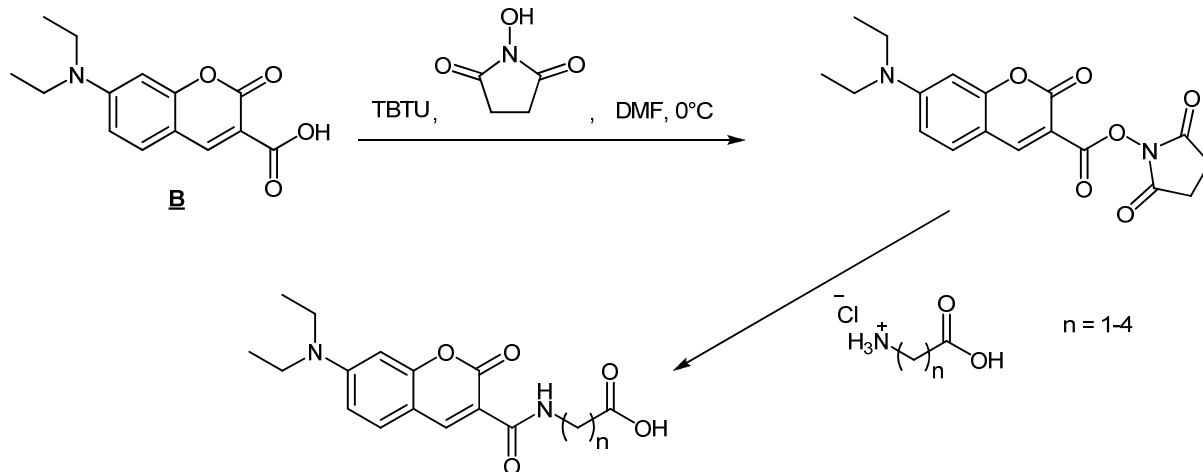
Poizkusili smo s pripenjanjem nezaščitenih aminokislin (GABA in 5-AVA) na izhodno spojino **B** in zaznali nastanek produkta s tankoplastno kromatografijo (strukture nismo določevali), vendar je bil izkoristek prenizek, da bi bilo mogoče oz. smiselno delati naprej po tej poti. Kasneje, ko smo uspeli pripraviti spojine **4**, **8**, **12** in **16** na način, ki je opisan v poglavju 2.1 in 4.1.3, se je izkazalo, da je bil Rf spojnin, ki smo jih pripravili z vezavo nezaščitenih aminokislin na izhodno spojino **B**, precej višji kot pa Rf spojin **12** in **16**, moral pa bi biti enak, glede na to, da smo uporabili GABA in 5-AVA (TLC smo seveda razvijali v enaki MF). Verjetno je pripenjanje aminokislina poteklo večkrat, kar pomeni, da se je najprej na izhodno spojino **B** pripela npr. GABA/5-AVA, nato pa se je na že vezano aminokislino še enkrat pripela nova aminokislina itd. Pri pripenjanju nezaščitenih aminokislina na izhodno spojino **B**, smo po dodatku reagenta za tvorbo amidne vezi TBTU počakali vsaj kakšno uro, da je nastal kompleks med TBTU in izhodno spojino **B**, nato pa smo dodali nezaščiteni aminokislino v prebitku.

Do končnih spojin **5**, **9**, **13** in **17** ter **6**, **10**, **14** in **18** smo skušali priti tudi preko tvorbe mešanega anhidrida z uporabo etil kloroformata in trietilamina v dietiletru (slika 28). [10] Najprej smo tvorili mešan anhidrid na izhodni spojini **B** (ta stopnja je potekla uspešno), nato pa smo tako pripravljene spojine dodali aminokislino GABA, da bi dobili spojino **12**. Strategija se ni izkazala za uspešno, saj ni nastalo dovolj produkta, da bi se ga splačalo izolirati in analizirati.



Slika 28. Aktivacija $-\text{COOH}$ skupine izhodne spojine **B** s tvorbo mešanega anhidrida in nato reakcija z aminokislino.

Naslednji način priprave spojin **4**, **8**, **12** in **16**, iz katerih bi nato lahko pripravili končne spojine **5**, **9**, **13** in **17** ter **6**, **10**, **14** in **18**, je bil preko aktivacije $-\text{COOH}$ skupine na spojini **B** z *N*-hidroksisukcinimidom (slika 29). Po aktivaciji smo skušali na aktivirano $-\text{COOH}$ skupino vezati aminokislino (poizkusili smo z uporabo GABA). [11] Nastalo je le malo produkta, poleg tega pa smo na TLC-ju poleg lise, za katero smo domnevali, da gre za liso našega želenega produkta (produkta nismo izolirali in naredili NMR analize), dobili še eno močno liso, ki je bila po R_f -u tako blizu želenega produkta, da bi bilo čiščenje verjetno zelo težavno.

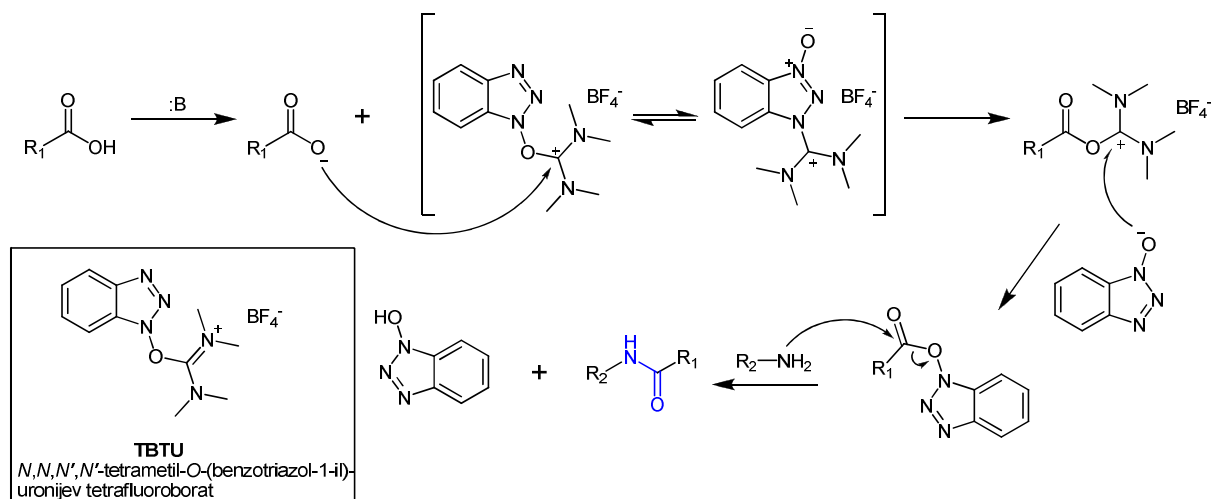


Slika 29. Aktivacija $-\text{COOH}$ skupine izhodne spojine **B** z *N*-hidroksisukcinimidom in nato reakcija z aminokislino.

Naslednji možen pristop sinteze predstopenj končnih spojin (**4**, **8**, **12** in **16**), ki se je izkazal za uspešnega, je bil kislina hidroliza estrov **3**, **7**, **11** in **15** s HCl. Postopek je bil takšen, da smo spojine **3**, **7**, **11** in **15** najprej raztopili v 1,4-dioksanu, nato pa dodajali 2 M, 4 M ali konc. vodno raztopino HCl ter reakcijo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Ker je reakcija kisle hidrolize estra ravnotežna, je vedno prisotno še nekaj estra, kar se vidi tudi na TLC-ju. Ko se lisa estra na TLC-ju ni več spreminjala oz. ko je bila lisa zelo šibka, smo nevtralizirali raztopino z dodatkom NaOH (2 M, 4 M ali celo bolj koncentrirane raztopine), nato pa dodali

še pufer s pH~3 (citratni pufer). Po dodatku pufru smo zmes ekstrahirali s CH₂Cl₂, organsko fazo sušili z Na₂SO₄, odparili topila pri znižanem tlaku in produkt dokončno posušili na vakuumski črpalki ali v eksikatorju. Produkt smo nato čistili s prekristalizacijo ali s kolonsko kromatografijo. Na potek hidrolize s HCl ni vplivalo to, koliko časa smo pustili reakcijo teči, prav tako ni bilo nobene razlike, če smo reakcijo izvajali pri sobnih pogojih ali če smo zmes segrevali - reakcija je potekla enako hitro. Edini vpliv na potek kisle hidrolize s HCl je imelo število dodanih ekvivalentov HCl, pri čemer ni imelo nobenega vpliva, če smo uporabili 2 M, 4 M ali konc. HCl. Pri hidrolizi spojin **3**, **7**, **11** in **15** s HCl so se pokazale razlike v številu eq HCl, ki jih je bilo potrebno dodati, da je reakcija potekla. Za hidrolizo spojine **3** do spojine **4** je bilo potrebno dodati le 25 eq HCl, za hidrolizo spojin **7**, **11** in **15** do **8**, **12** in **16** pa kar 775-900 eq. Spojina **3** je torej v tem pogledu izstopala. Če pogledamo njeno strukturo vidimo, da sta pri tej spojini amidna vez in estrska vez bliže skupaj, kot pa pri spojinah **7**, **11** in **15**. Tudi R_f spojine **3** je precej nižji kot pri spojinah **7**, **11** in **15**, saj je spojina **3** med omenjenimi spojinami najbolj polarna, kar smo opazili tudi med ekstrakcijo - spojina **3** se je nekoliko slabše raztapljal v CH₂Cl₂ kot spojine **7**, **11** in **15**. Tudi spojine **4**, **5** in **6**, ki prav tako vsebujejo glicinski fragment vezan na kumarinski skelet, izstopajo v številnih pogledih v primerjavi z njihovimi analogi z daljšim aminokislinskim fragmentom na kumarinskem skeletu. Odstopanje se kaže v večji polarnosti (in s tem manjši topnosti v CH₂Cl₂, EtOH, MeOH in EtOAc) oz. v nižjem R_f-u. Pri končnih spojinah **5** in **6**, ki vsebujeta glicinski fragment, smo opazili manjše dušenje fluorescence nitroksidnega analoga in odstopanje v absorpcijskem spektru, poleg tega pa smo pri spojini **6** opazili šibkejši EPR signal v EtOH in slabše vgrajevanje v micelle. Po ekstrakciji s kislno hidrolizo dobljenih spojin **4**, **8**, **12** in **16**, opazimo, da je prišlo do delnega razpada do spojine **B** tudi med odparevanjem topila (pri znižanem tlaku). Spojina **B** namreč prva kristalizira med odparevanjem topila pri znižanem tlaku, kar opazimo kot oranžen rob v bučki, pod katerim nato kristalizira rumeno obarvana spojina (**4**, **8**, **12** ali **16**), poleg tega pa se nekaj spojine **B** nahaja tudi med rumeno obarvanimi spojinami, kar vidimo v obliki oranžnih lis, madežev ali pikic. Spojino **B**, ki je v tem primeru torej neželen razpadni produkt, je problematično odstraniti tudi med čiščenjem. Zaradi problemov na stopnji čiščenja spojin, bi bilo smiselno aminokislinske -COOH skupine zaščititi z benzilno zaščito, ki bi jo lahko odstranili s katalitskim hidrogeniranjem. Možna sintezna pot bi lahko bila tudi naslednja. Aminokislina bi zaščitili na -NH₂ skupini, nato pa bi na aminokislinsko -COOH skupino z uporabo reagenta za tvorbo amidne vezi vezali bodisi nitroksidni fragment bodisi sekundarni amin, ki je njegov strukturni analog; zatem bi odščitili aminokislinsko -NH₂ skupino in jo pripeli na spojino **B**. Ko imamo enkrat pripravljene spojine **4**, **8**, **12** in **16**, je nadaljnje delo enostavno. Na te spojine brez težav z uporabo reagenta za tvorbo amidne vezi vežemo nitroksidni fragment ali sekundarni amin (strukturni analog nitroksida, ki ni oksidiran) in tako pripravimo končne spojine **5**, **9**, **13**, **17** ter **6**, **10**, **14**, **18**. Prav tako brez težav poteče pripenjanje nitroksidnega fragmenta ali sekundarnega amina na izhodno spojino **B**, s čimer pridemo do spojin **1** in **2**.

Pri vseh sintezah, pri katerih smo tvorili amidne vezi, smo uporabili TBTU kot reagent za tvorbo amidne vezi (struktura je prikazana na sliki 30). Gre za sklopitveni reagent (ang. *coupling reagent*), s katerim aktiviramo -COOH skupino, da le-ta nato lažje reagira z -NH₂ skupino in nastane amidna vez (mehanizem tvorbe amidne vezi je prikazan na sliki 30).



Slika 30. Struktura TBTU-ja in mehanizem tvorbe amidne vezi preko aktivacije -COOH skupine.

Izkoristki samih sintez so bili precej visoki. Kadar je bilo to možno, smo sintetizirane produkte pred čiščenjem osušili, stehali in ocenili izkoristek sinteze. To ni bilo možno, kadar sta izolacija in čiščenje potekala v enem koraku, in sicer s prekrizalizacijo – tu smo izgubili precej produkta v topilu (ali zmesi topil). Precej produkta smo zgubili tudi pri čiščenju s kolonsko »flash« kromatografijo. Nekaj produkta je vedno ostalo adsorbiranega na silikagelu, največje izgube pa smo imeli zaradi nečistoč, ki so bile v večjem številu frakcij prisotne skupaj z zelenim produktom. Pri teh frakcijah ločitev med zelenim produktom in nečistočami ni bila možna ne s prekrizalizacijo ne s ponovno uporabo kolonske »flash« kromatografije. Takšne frakcije smo zavrgli in produkt v njih seveda ni vštet v izračun končnega izkoristka. Glavni razlog za nekoliko nižje končne izkoristke (zlasti pri spojinah **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, tudi pri spojinah **3**, **4**, **7**, **10** in **17**) je torej izguba spojin med izolacijo in čiščenjem. Izhodna spojina **B** ima prav tako nekoliko nižji končni izkoristek. V tem primeru je nižji tudi izkoristek same sinteze, ki znaša ~ 50%. Nekaj spojine **B** smo izgubili tudi med čiščenjem, saj smo želeli pripraviti čisto izhodno spojino za nadaljne sinteze in s tem zmanjšati nastanek stranskih produktov pri nadaljnjih sintezah.

5.2 Izolacija in čiščenje

Spojine **3**, **7**, **11** in **15**, ki so estri (na izhodno spojino **B** je vezana aminokislina, ki ima zaestreno -COOH skupino), izoliramo in čistimo na naslednji način. Ko s tankoplastno kromatografijo zaznamo, da je reakcija potekla, obarvano reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in večkrat spiramo s prečiščeno vodo. Tekom spiranja postaja vsaka vodna frakcija pri spiranju bolj blago obarvana oz. je na koncu pogosto brezbarvna. Izjemoma lahko spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃, glede na to, da je izhodna spojina **B** kislina, vendar s tem tvegamo razpad amidne vezi, ki je občutljiva na prisotnost baze, kot je bilo že omenjeno. Bolj

varno je torej spiranje z vodo. Tekom spiranja se v liju ločniku med organsko in vodno fazo pogosto pojavi stabilna emulzija, ki pa po nekaj spiranjih izgine. Stabilno emulzijo odlivamo k odpadni vodni fazi, saj vsebuje zelo malo oz. praktično nič izolirane spojine. Po končanem spiranju organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in odparimo topila pri znižanem tlaku. Spojine **3**, **7**, **11** in **15** lahko čistimo s prekristalizacijo iz EtOAc, in sicer tako da jih prelijemo z EtOAc, ki ga nato odparevamo toliko časa, da se pojavijo prvi kristali že v vrelem topilu. Ko opazimo kristale, lahko dodamo še nekaj EtOAc in zmes ohladimo na ledeni kopeli, da produkt kristalizira. Kristale filtriramo s presesavanjem in sušimo na vakuumski črpalki oz. v eksikatorju. Na takšen način ne dobimo povsem čistih spojin, vendar so dovolj čiste za NMR analizo. Če želimo omenjene spojine prečistiti bolj, jih moramo čistiti s kolonsko »flash« kromatografijo. Uporabimo kolono s KP-SIL silikagelom in gradient mobilnih faz $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=49:1 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$. Zadnja mobilna faza – $\text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ – je pomembna bolj za spiranje spojin s kolone kot pa za ločevanje. Pri bolj lipofilnih estrih, kot sta spojini **11** in **15**, te zadnje najbolj polarne mobilne faze pravzaprav ne potrebujemo, saj omenjeni spojini pripotujeta iz kolone že z $\text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=49:1$. Pri čiščenju spojine **3**, ki je najbolj polarna, pa moramo uporabiti $\text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ tudi za ločevanje oz. da dosežemo potovanje spojine **3** po koloni. Pri spojini **7** uporabimo $\text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ le v majhnem % v kombinaciji s CH_2Cl_2 (=MF₁), tako da je končna MF v približno $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=20:1$ ali $30:1$. Vseeno je boljše imeti na zalogi dovolj polarno mobilno fazo, saj na Isoleri lahko nastavljamo gradient mešanja mobilnih faz, potovanje spojin pa spremljamo z UV-VIS detektorjem, tako da lahko po potrebi nastavljamo polarnost mobilnih faz glede na hitrost potovanja spojin po koloni oz. glede na zahtevnost ločevanja oz. čiščenja. Potovanje spojin **3**, **7**, **11** in **15** lahko opazujemo tudi vizualno, saj so rumeno obarvane in lahko vidimo kako hitro rumeno obarvana spojina potuje po koloni. Omenjeni estri so dobro topni v CH_2Cl_2 , tako da jih brez problemov raztopimo v manjšem volumnu (nekaj mL) CH_2Cl_2 in jih naneseemo na predkolono – priprava vzorcev za čiščenje torej ni problematična. Čiščenje teh spojin na Isoleri v splošnem ni problematično in dokaj lahko dobimo ~ 30-60% čiste spojine iz vzorca, ki smo ga nanegli na kolono.

Spojine **4**, **8**, **12** in **16**, ki jih dobimo s kislom hidrolizo spojin **3**, **7**, **11** in **15**, izoliramo tako, da jih po končani hidrolizi, nevtralizaciji in uravnavi pH ekstrahiramo s CH_2Cl_2 . Reakcijsko zmes tolikokrat spiramo s CH_2Cl_2 , da le-ta postane brezbarvna in tako izgubi rumeno obarvanje (spojine **4**, **8**, **12** in **16** so vse rumeno obarvane). Med ekstrakcijo po potrebi dodamo še nekaj mL citratnega pufra s pH~3. Upoštevati moramo namreč, da le neionizirana oblika spojin **4**, **8**, **12** in **16** prehaja v CH_2Cl_2 . Med omenjenimi spojinami je spojina **4** najbolj hidrofilna, vendar se jo da ekstrahirati s CH_2Cl_2 , res pa je, da za ekstrakcijo te spojine porabimo nekoliko več topila. Organsko fazo nato sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topila uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek lahko čistimo na dva načina – s prekristalizacijo ali s kolonsko »flash« kromatografijo. Upoštevati moramo, da sta običajni nečistoči izhodni ester (spojina **3**, **7**, **11** ali **15**) in izhodna spojina **B**, ki nastane zaradi razpada pri nevtralizaciji kisle raztopine z NaOH (hidrolizira labilna amidna vez ob kumarinskem skeletu). Pri čiščenju je nekaj razlik, ki izhajajo predvsem iz razlik v polarnosti spojin **4**, **8**, **12** in **16**. Spojino **4** prekristaliziramo iz EtOAc, in sicer tako da jo prelijemo z EtOAc, ki ga nato odparevamo

toliko časa, da se pojavijo prvi kristali že v vrelem topilu. Zatem prenehamo s segrevanjem in zmes ohladimo na ledeni kopeli, da produkt v čim večji meri kristalizira (pred hlajenjem zmesi lahko dodamo še nekaj EtOAc, da več nečistoč ostane raztopljenih tudi po hlajenju zmesi). Kristale filtriramo s presesavanjem, speremo z mrzlim EtOAc in jih sušimo na vakuumski črpalki oz. v eksikatorju. Na takšen način ne dobimo povsem čiste spojine **4**, vendar je le-ta lahko dovolj čista za NMR analizo v primeru, da so nečistoče dovolj lipofilne in se jih večina raztopi v EtOAc (spojini **B** in **3**, ki sta glavni nečistoči, sta obe bolj lipofilni od spojine **4**). Če želimo spojino **4** prečistiti v tolikšni meri, da je dovolj čista za elementno analizo (več kot 99,6 %), jo moramo čistiti s kolonsko »flash« kromatografijo (npr. na Isoleri). Uporabimo kolono s KP-SIL silikagelom in gradient mobilnih faz $MF_1 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2:MeOH=4:1$. Zadnja mobilna faza – $MF_2 = CH_2Cl_2:MeOH=4:1$ – je pomembna tako za spiranje spojine **4** s kolone, kot tudi za samo ločevanje spojine **4** od nečistoč, saj je spojina **4** precej hidrofilna – po hidrofilnosti ta spojina izstopa, saj ima na izhodno spojino **B** vezan glicin. Naj omenim tudi, da posledično pri čiščenju spojine **4** na koloni porabimo velike volumne $MF_2 = CH_2Cl_2:MeOH=4:1$, če želimo da večino spojine speremo iz kolone. Spojino **8** čistimo tako, da jo prekristaliziramo iz CH_2Cl_2 (lahko tudi iz EtOAc). Prelijemo jo s CH_2Cl_2 in nekajkrat segrejemo do vrelišča (spojina **8** je slabo topna v CH_2Cl_2 , glavni nečistoči – spojina **B** in spojina **7** – pa sta bolj topni v CH_2Cl_2), nato pa zmes ohladimo na ledeni kopeli. Lahko tudi odparimo del CH_2Cl_2 in opazujemo, kdaj začne spojina **8** kristalizirati ter nato zmes ohladimo. Kristale spojine **8** nato filtriramo s presesavanjem, speremo z mrzlo mešanico CH_2Cl_2 in n-heksana v razmerju 1:1 in jih posušimo. Spojino **8** običajno ni potrebno čistiti s kolonsko »flash« kromatografijo, če pa bi to bilo potrebno, bi bila primerna uporaba mobilnih faz z gradientom $MF_1 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2:MeOH=9:1$. Spojini **12** in **16** čistimo na povsem enak način, in sicer s prekristalizacijo iz mešanice CH_2Cl_2 in n-heksana v razmerju 9:1 ter s kolonsko »flash« kromatografijo. Prekristalizacija poteka tako, da spojini **12** in **16** prelijemo z mešanico CH_2Cl_2 in n-heksana v razmerju 9:1 in nekajkrat segrejemo do vrelišča (spojini **12** in **16** sta slabše topni v mešanici $CH_2Cl_2:n\text{-heksan}=9:1$ kot glavni nečistoči – spojina **B** in izhodni ester (spojina **11** oz. **15**)), nato pa zmes ohladimo na ledeni kopeli. Lahko tudi odparevamo CH_2Cl_2 ter n-heksan in opazujemo, kdaj začne spojina **12** oz. **16** kristalizirati ter nato zmes ohladimo. Zatem odfiltriramo izpadli produkt in ga speremo z mrzlo mešanico CH_2Cl_2 in n-heksana v razmerju 1:1. Če želimo dobiti produkt, ki je dovolj čist za elementno analizo, moramo spojini **12** in **16** čistiti s pomočjo kolonske »flash« kromatografije (npr. na Isoleri). Uporabimo kolono s KP-SIL silikagelom in naslednji gradient mobilnih faz: $MF_1 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2:MeOH=9:1$. Pomembno je, da spojine **4**, **8**, **12** in **16** po odparevanju topila pri znižanem tlaku dobro posušimo z vakuumsko črpalko in v eksikatorju. Tekom hidrolize spojin **3**, **7**, **11** in **15** smo namreč uporabili 1,4-dioksan, ki ga ne odstranimo povsem, če spojin **4**, **8**, **12** in **16** ne sušimo dalj časa pri znižanem tlaku in v eksikatorju.

Spojine **1**, **5**, **9**, **13** in **17** izoliramo na podoben način. Ko s TLC zaznamo konec reakcije, odparimo topilo pri znižanem tlaku, nato pa izvedemo prekristalizacijo oz. pri spojini **1** lahko tudi ekstrakcijo. Spojino **1** lahko izoliramo tako, da po končani reakciji reakcijsko zmes spiramo s prečiščeno vodo ali nasičeno vodno raztopino $NaHCO_3$ toliko časa, da ostane vodna faza praktično brezbarvna oz. barva vodne faze neha bledeti tekom zadnjih dveh spiranj.

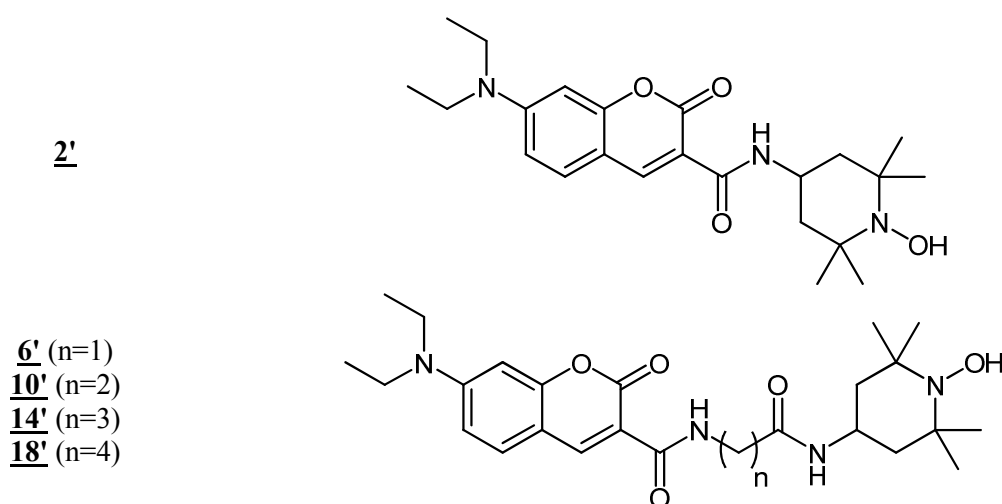
Organsko fazo nato sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo s presesavanjem, odparimo topila pri znižanem tlaku, nato pa produkt posušimo na vakuumski črpalki ali v eksikatorju. Drugi način izolacije (in obenem čiščenja) spojine **1** je, da reakcijski zmesi odparimo topilo pri znižanem tlaku, preostanek pa prelijemo z EtOAc, ki ga nato odparevamo toliko časa, da se pojavijo prvi kristali že v vrelem topilu. Zatem prenehamo s segrevanjem in zmes ohladimo na ledeni kopeli, da izpadejo kristali (pred hlajenjem zmesi lahko dodamo še nekaj EtOAc, da več nečistoč ostane raztopljenih tudi po hlajenju zmesi). Kristale filtriramo s presesavanjem, speremo z mrzlim EtOAc in jih sušimo na vakuumski črpalki oz. v eksikatorju. Če dodamo le toliko EtOAc, da se ves produkt, ki ga čistimo, tudi ob segrevanju ne raztopi, zmes le nekajkrat segrejemo do vrelišča in nato ohladimo (raztopijo se le nečistoče, ki jih je manj). Kristale filtriramo s presesavanjem, speremo z mrzlim EtOAc in sušimo na vakuumski črpalki oz. v eksikatorju. Na podoben način čistimo spojino **5**, le da v tem primeru preostanek po odparevanju topila iz reakcijske zmesi prelijemo z MeOH (MeOH uporabimo, ker je izhodna spojina v reakciji priprave spojine **5** – spojina **4** – precej hidrofilna), nato pa MeOH odparevamo. Ko opazimo prve kristale, prenehamo s segrevanjem in v zmes dodamo EtOAc. Zatem zmes ohladimo na ledeni kopeli pri $-10\text{ }^\circ\text{C}$ (led/ H_2O / NaCl) – spojina **5** kristalizira v obliki rumenih kristalov. Ko imamo kristale postopamo enako kot pri spojini **1**. Spojino **9** izoliramo na povsem enak način kot spojino **1**, in sicer z uporabo EtOAc. Iz reakcijske zmesi odparimo topilo pri znižanem tlaku, preostanek pa prelijemo z EtOAc, ki ga nato odparevamo toliko časa, da opazimo prve kristale že v vrelem topilu. Zatem zmes ohladimo, filtriramo izpadle kristale in jih speremo z mrzlim EtOAc. Spojini **13** in **17** izoliramo na enak način kot spojino **9**. Naj omenim, da spojine **5**, **9**, **13** in **17**, ni možno izolirati z ekstrakcijo s prečiščeno H_2O (lahko pa na takšen način izoliramo spojino **1**). Če dolijemo vodo k reakcijski zmesi spojin **5**, **9**, **13** in **17**, dobimo rumeno suspenzijo, pri čemer se organska in vodna faza nočeta ločiti. Iz stališča izkoristkov je dobro tudi vedeti, da pri izolaciji spojin **1**, **5**, **9**, **13** in **17** z uporabo EtOAc po ohladitvi zmesi na ledeni kopeli nekaj produkta kristalizira tako, da kristale lahko filtriramo s presesavanjem, nekaj pa ga ostane prilepljenega na stenah bučke. Spojine **1**, **5**, **9**, **13** in **17** namreč niso dobro topne v EtOAc, zato se pogosto tudi v vročem EtOAc ne raztopijo povsem. Del produkta, ki po ohladitvi ostane prilepljen na steni bučke, je zato potrebno postrgati s spatulo ali žličko s stene bučke in ga nato dodati k produktu, ki smo ga filtrirali s presesavanjem. Vse skupaj nato speremo še z mrzlim EtOAc. Čistost spojin **1**, **5**, **9**, **13** in **17** je po izolaciji in čiščenju s prekristalizacijo dovolj dobra za potrditev strukture (NMR analiza), ne pa za določanje čistote z elementno analizo. Za pripravo elementno čistih spojin, moramo uporabiti kolonsko »flash« kromatografijo (Isolera One). Pri čiščenju teh spojin moramo uporabiti kolone z bazičnim KP-NH silikagelom, saj imajo te spojine v strukturi sekundarno aminske skupine ($-\text{NH}-$), ki je precej bazična. Na takšen način zagotovimo ustrezno potovanje po koloni. Spojine **1**, **5**, **9**, **13** in **17** so na bazičnem KP-NH silikagelu v neionizirani obliki. Če bi uporabili navadni KP-SIL silikagel, bi te spojine tvorile sol s kislimi silanolnimi $-\text{OH}$ skupinami in bi ostale vezane na koloni. Verjetno jih ne bi morali sprati s kolone, saj preveč polarne MF ne smemo uporabiti, sicer tvegamo, da se v večji meri raztopi tudi silikagel, kar pa bi povzročilo zamašitev Isolere (čiščenje v takem primeru je zamudno in zahtevno). Gradient mobilnih faz, ki jih uporabimo za čiščenje spojin **1**, **5**, **9**, **13** in **17**, je naslednji: $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{n-heksan}=7:3 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_3 =$

$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ za spojino **1**; $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{n-heksan}=1:1 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=4:1$ za spojino **5**; $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{n-heksan}=8:2 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ za spojino **9**; in $\text{MF}_1 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{n-heksan}=8:2 \rightarrow \text{MF}_2 = \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MF}_3 = \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ za spojini **13** in **17**. Na koncu ločevanja ni nujno, da uporabimo 100% MF_3 v vseh primerih, saj ji lahko zmanjšamo polarnost z mešanjem z MF_2 (CH_2Cl_2) – pomembno je, da opazujemo potovanje oz. ločevanje spojin na koloni, kar je možno tako preko UV detektorja kot tudi vizualno, saj so vse spojine obarvane.

Spojine **2**, **6**, **10**, **14** in **18** izoliramo na enak način. Po končani reakciji (detektiramo s TLC) reakcijsko zmes spiramo s prečiščeno vodo tolikokrat, da ostane pri zadnjem spiranju organske faze vodna faza brezbarvna. Med organsko fazo in vodno fazo se pri začetnih spiranjih pojavi stabilna emulzija, ki jo zavržemo k odpadni vodni fazi, saj ne vsebuje skoraj nič spojine, ki jo želimo izolirati. Stabilna emulzija po nekaj spiranjih z vodo navadno izgine. Spiranje ne smemo nikoli izvajati s kislno vodno raztopino, saj nitroksidi v kislem vstopajo v reakcijo disproporcionacije (nastane hidroksilamin in oksoamonijev kation). Prav tako ni priporočljivo spiranje z bazično vodno raztopino zaradi že omenjene labilnosti amidne vezi ob kumarinskem skeletu. Organsko fazo nato sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in odparimo topila pri znižanem tlaku. Sledi čiščenje spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18**. Vse omenjene spojine lahko delno prečistimo s prekrizalizacijo. Spojino **2** lahko prekrizaliziramo iz EtOAc, in sicer tako, da jo prelijemo z EtOAc, ki ga nato postopno odparevamo. Ko izhlapi toliko EtOAc, da se pojavijo prvi kristali že v vrelem topilu, prenehamo s segrevanjem in zmes ohladimo na ledeni kopeli, da produkt kristalizira (pred hlajenjem zmesi lahko dodamo še nekaj EtOAc, da več nečistoč ostane raztopljenih tudi po hlajenju zmesi). Ni nujno, da uporabimo toliko EtOAc, da se v njem raztopi vsa spojina **2**, vendar ga moramo uporabiti dovolj, da tudi v hladnem EtOAc ostane raztopljenih čim več nečistoč. Kristale filtriramo s presesavanjem, speremo z mrzlim EtOAc in jih sušimo na vakuumski črpalki oz. v eksikatorju. Na enak način lahko očistimo tudi spojino **6**. Spojino **10** čistimo nekoliko drugače. Prav tako jo prelijemo z EtOAc, ki ga nato delno odparimo. Ko prenehamo s segrevanjem, ni dovolj, da zmes ohladimo na ledeni kopeli, saj v tem primeru spojina **10** ne kristalizira. Spojina **10** namreč slabše kristalizira iz mrzlega EtOAc kot spojini **2** in **6**, zato moramo k uporabljenemu EtOAc (po prenehanju segrevanja in odparevanja EtOAc) dodati nekaj n-heksana, da znižamo polarnost zmesi. Zatem zmes ohladimo na ledeni kopeli (ali še bolje na zmesi ledu, vode, NaCl in acetona), kristale pa filtriramo s presesavanjem in speremo z mrzlim EtOAc. Spojini **14** in **18** lahko prav tako prekrizaliziramo iz EtOAc kot spojini **2** in **6**, oz. uporabimo dodatek n-heksana kot pri spojini **10**. S prekrizalizacijo dobimo dovolj čiste spojine za IR, EPR in MS analizo, če pa želimo pripraviti elementno čiste spojine, moramo le-te čistiti s kolonsko »flash« kromatografijo (npr. na Isoleri). Koristen je tudi podatek, da so omenjene spojine stabilne do vrelišča EtOAc pri normalnem tlaku, ne da bi prišlo do razpada oz. do kakršnekoli druge neželene spremembe teh spojin (npr. do pretvorbe v hidroksilamin). Če imamo omenjene spojine namen čistiti s kolonsko »flash« kromatografijo, pravzaprav ni nujno, da jih prej prekrizaliziramo. Pri čiščenju s kolonsko »flash« kromatografijo dobimo enako ali celo bolj čiste spojine kot pri čiščenju s prekrizalizacijo. Drugače povedano, nečistoče, ki se jih da odstraniti s prekrizalizacijo, lahko odstranimo tudi s kolonsko »flash« kromatografijo. Pri čiščenju spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** uporabljamo kolone z bazičnim KP-NH silikagelom, saj s

tem zmanjšamo tveganje za disproporcionacijo nitroksidov v kislem. Za čiščenje spojine **2** uporabimo gradient mobilnih faz $MF_1 = CH_2Cl_2:n\text{-heksan}=1:1 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_3 = CH_2Cl_2:MeOH=9:1$, za čiščenje spojine **6** pa gradient $MF_1 = CH_2Cl_2:n\text{-heksan}=1:1 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_3 = CH_2Cl_2:MeOH=4:1$. Pri čiščenju spojine **6** moramo na koncu uporabiti bolj polarno MF, saj je sama spojina bolj polarna in jo lahko le na tak način spravimo iz kolone. Za čiščenje spojin **10**, **14** in **18** uporabimo gradient mobilnih faz $MF_1 = CH_2Cl_2:n\text{-heksan}=8:2 \rightarrow MF_2 = CH_2Cl_2 \rightarrow MF_3 = CH_2Cl_2:MeOH=9:1$. Pri čiščenju vseh omenjenih spojin na koloni moramo nastaviti počasen gradient od manj polarne MF do bolj polarne MF. Zadnja MF navadno služi bolj za spiranje kolone, kot pa za ločevanje oz. čiščenje, poleg tega pa navadno nikoli ne uporabimo 100% MF_3 , ki je najbolj polarna, ampak večkrat kombinacijo MF_3 s CH_2Cl_2 . MF_3 torej dodajamo po potrebi glede na potovanje oz. ločevanje komponent, kar lahko spremljamo z UV detektorjem ali pa vizualno.

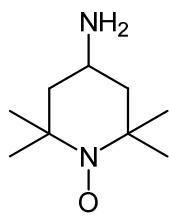
Pri čiščenju vseh omenjenih spojin se pogosto zgodi, da vsaj ene nečistoče ne moremo povsem odstraniti. Pri spojinah, ki so nitroksidi (**2**, **6**, **10**, **14** in **18**), je praktično vedno tako. Po preverjanju čistote frakcij, ki jih dobimo po čiščenju na koloni, ali po preverjanju čistote produkta, ki smo ga čistili s prekristalizacijo s tankoplastno kromatografijo, pogosto opazimo prisotnost ene ali več nečistoč tudi po čiščenju. Res pa je, da detekcija spojin na TLC ploščici poteka pri valovni dolžini 366 nm, saj vse omenjene spojine in organske nečistoče, ki se jih nismo znebili že pri izolaciji, fluorescirajo. To pomeni, da zaznamo že minimalne količine nečistoč v zelenem produktu, saj gre za zelo občutljivo detekcijo. Pri vseh nitroksidnih spojinah (**2**, **6**, **10**, **14** in **18**) na TLC-ju tudi po čiščenju vidimo liso, ki se nahaja pod liso zelenega produkta – vidimo nečistočo, ki fluorescira in ima nižji R_f kot zelen produkt. V tem primeru gre verjetno za hidrosilaminske analoge produktov **2**, **6**, **10**, **14** in **18** (slika 30), saj so le ti bolj polarni in imajo zato nižji R_f od nitroksidov. Poleg tega pa so hidrosilaminski analogi znane in pogoste nečistoče nitroksidnih spojin.



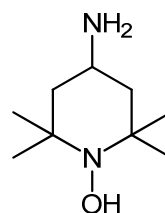
Slika 31. Strukture verjetnih nečistoč nitroksidov **2**, **6**, **10**, **14** in **18** – hidrosilaminski analogi **2'**, **6'**, **10'**, **14'** in **18'**.

Hidrosilamini **2'**, **6'**, **10'**, **14'** in **18'** bi lahko nastali po dveh različnih poteh. Prva pot je, da je bil že pri sintezi uporabljen reagent 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil nečist, kar

pomeni, da sta med tvorbo amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU nastajala dva tipa spojin. Pripenjal se je tako 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil, kot tudi nečistoča 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ol, ki je njegov hidroksilaminski analog (slika 32). Pri sintezah je nesmiselno izhajati iz nečistih spojin, saj imamo v nasprotnem primeru po končani sintezi opravka s produktom, ki poleg nečistot, ki nastanejo zaradi stranskih reakcij med spojinami, za katere smo vedeli, da jih imamo v reakcijski zmesi, vsebuje tudi nečistoče, ki izhajajo iz reagentov in/ali iz reakcij med temi nečistočami in želenimi spojinami v reakcijski zmesi.



4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil

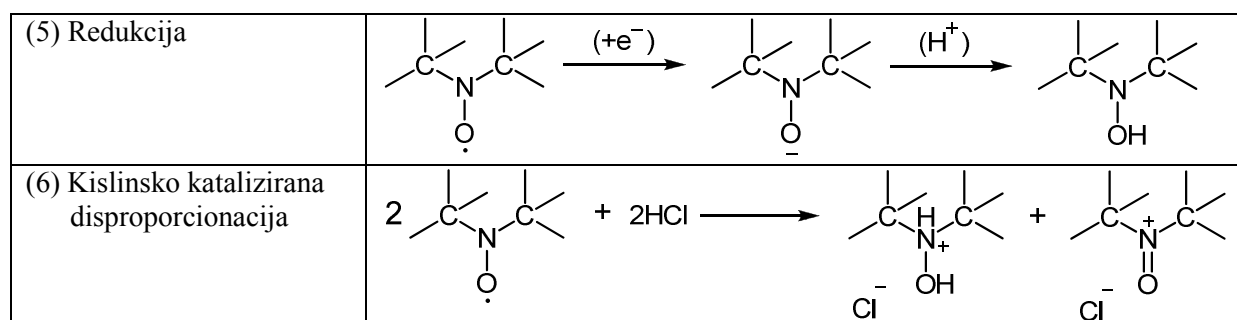


4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ol

Slika 32. Struktura uporabljenega reagenta pri sintezi nitroksidov 2, 6, 10, 14 in 18 in njegove verjetne nečistoče.

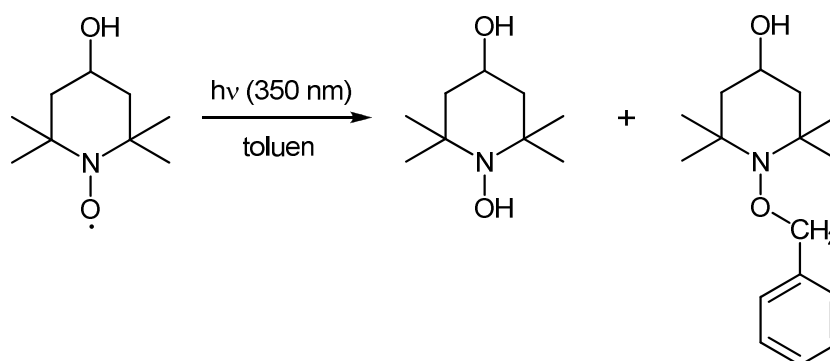
Druga možna pot nastanka hidroksilaminov 2', 6', 10', 14' in 18' je pretvorba nitroksidov 2, 6, 10, 14 in 18 v omenjene hidroksilaminske analoge. Do tega lahko pride ob prisotnosti kisline oz. kislih H^+ ionov ali pa s fotolizo. Reakcija s kislino je disproporcionacija v kislem, pri kateri nastane hidroksilamin in oksoamonijev kation. Reakcije, ki so v splošnem odgovorne za nestabilnost nitroksidov, so prikazane na sliki 33. [4]

(1) Disproporcionacija nitroksida s H na α C-atomu	
(2) Reakcija s C-radikalom	
(3) Cepitev C-N vezi s fotolizo	
(4) Oksidacija	



Slika 33. Reakcije, ki so odgovorne za nestabilnost nitroksidov. [4]

Reakcija disproporcionacije v nevtralnem (1) ni možna, saj v primeru nitroksidov **2**, **6**, **10**, **14** in **18** nimamo H-atomov na α C-atomu ob nitroksidnem dušiku. Reakciji (2) in (4) sta bolj pomembni pri sintezah nitroksidov, saj nitroksidni del molekule lahko tekmuje z nenitroksidnim delom molekule za reagente, ki jih uporabljamo pri sintezi, kar lahko vodi do nastanka neželenih produktov. Reakcija (3) je posebna vrsta fotolize sicer stabilnih nitroksidov. Do takšne fotolize lahko pride pri nitroksidih, ki v svoji obročni strukturi nimajo nenasičenih vezi oz. je njihov obroč sestavljen iz samih nasičenih vezi, kar velja tudi za nitroksidne spojine **2**, **6**, **10**, **14** in **18**. Na sliki 34 je prikazana takšna reakcija fotolize na primeru tempola (1-oksil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroksipiperidine), ki da tudi produkt, ki je hidroksilaminski strukturni analog te spojine.



Slika 34. Fotoliza tempola v toluenu. [4]

Reakcija tipa (3) bi torej lahko bila vzrok za nečistočo, ki je prisotna v nitroksidih **2**, **6**, **10**, **14** in **18**. Reakcija (5) se nanaša bolj na redukcijo v bioloških sistemih (npr. z askorbatom). Naj omenim le, da so možne redukcije in takšni pogoji redukcijskih reakcij, pri katerih ostane nitroksid intakten, zato lahko s takimi reagenti in ob ustreznih pogojih reduciramo druge dele molekule, ki jo sintetiziramo, brez da bi uničili nitroksid. Reakcija (6) je drugi možen vzrok za nastanek nečistoč v nitroksidih **2**, **6**, **10**, **14** in **18**. Zanimivo je to, da pri razvijanju spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** na navadnem TLC-ju (ima prisotne kisle silanolne $-OH$ skupine) v kisli mobilni fazi MF = $CH_2Cl_2:MeOH = 9:1 + 3\% CH_3COOH$ dobimo dve lisi tudi pri najbolj čistih spojinah, prav tako pa dobimo dve lisi, če te spojine naneseemo na KP-NH TLC (normalnofazni silikagel z $-NH-$ skupinami; kisle silanolne $-OH$ skupine so še vedno prisotne) in ga razvijemo v mobilni fazi MF = $CH_2Cl_2:MeOH = 9:1$. Iz tega je možno sklepati, da je vzrok za nečistočo reakcija (3), reakcija (6) ali pa je bila nečistoča že prisotna v reagentu

4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksilu (lahko, da je nastala tekom sinteze tega reagenta). [4]

Prisotnost hidroksilaminov **2'**, **6'**, **10'**, **14'** in **18'** kot nečistoč v nitroksidih **2**, **6**, **10**, **14** in **18** je minimalna, saj so lise nečistoč na TLC-ju zelo šibke, spojine **2**, **6**, **10**, **14** in **18** pa so tudi potrjene glede čistoče z elementno analizo (delež nečistoč je manj kot 0,4%). Zanimivo je, da kljub precej veliki razliki v R_f med nitroksidi in analognimi hidroksilamini, teh spojin ni bilo mogoče povsem ločiti med sabo s kolonsko »flash« kromatografijo na Isoleri, prav tako ne s preksristalizacijo.

Pri čiščenju spojine **4** nismo mogli odstraniti vseh nečistoč, kar je pokazala tudi elementna analiza. Čistiti smo jo poizkusili tako s prekrizalizacijo, kot tudi s kolonsko »flash« kromatografijo na Isoleri, a so bili vsi poizkusi zaman. Spojino **4** smo lahko očistili le deloma. Zanimivo je, da nečistoč, ki jih vidimo na TLC-ju (vse nečistoče fluorescirajo) in imajo višji R_f kot sama spojina **4**, ne moremo odstraniti na koloni, čeprav potujejo hitreje kot spojina **4**. Takšni nečistoči sta dve. Na začetku čiščenja na koloni sicer pripotujeta nekoliko hitreje skozi kolono kot spojina **4**, vendar takoj, ko spojina **4** tudi začne eluirati iz kolone, nečistoči z višjim R_f -om vseskozi potujeta skupaj s spojino **4** do konca čiščenja. Tudi pri prekrizalizaciji ti dve nečistoči kristalizirata skupaj s spojino **4**, ko zmes ohladimo. Prav tako je prisotna tudi nečistoča z nižjim R_f -om kot spojina **4**, ki tudi kristalizira skupaj s spojino **4** pri prekrizalizaciji, z metodo čiščenja na koloni pa se jo ne da odstraniti niti deloma (R_f -a te nečistoče in spojine **4** sta zelo blizu skupaj). Možna razlaga je, da obstajajo interakcije med nečistočami in spojino **4**, pri čemer je afiniteta teh nečistoč do spojine **4** večja, kot je afiniteta nečistoč do uporabljenih mobilnih faz med čiščenjem na koloni oz. topil med prekrizalizacijo. Na enak efekt smo naleteli tudi pri drugih sintetiziranih spojinah pri čiščenju, vendar s to razliko, da se je vsaj del zelenega produkta dal očistiti dovolj, da je bil elementno čist (bodisi s prekrizalizacijo bodisi s kolonsko »flash« kromatografijo na Isoleri). Prav tako kot pri spojini **4** tudi pri spojini **7** nismo mogli odstraniti vseh nečistoč, kar je pokazala tudi elementna analiza. Spojino smo čistili z uporabo kolonske »flash« kromatografije, pri čemer smo naleteli na podoben problem kot pri spojini **4**. Nobena od omenjenih spojin ni končna spojina. Obe spojini smo uporabili naprej pri sintezah in po čiščenju dobili produkte, ki so bili elementno čisti.

Zanimivo je, da imajo izhodna spojina **B** in spojine **8**, **12** in **16** v MF=CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 + 3% CH₃COOH praktično enak R_f , čeprav se po strukturi precej razlikujejo. Spojino **B** se da videti kot nečistočo v spojinah **8**, **12** in **16** (tudi v spojini **4**, ki pa ima sicer pri tej MF nižji R_f) že vizualno, saj je oranžno obarvana, ostale spojine pa so vse rumene. Po dodatku 3% CH₃COOH v MF= CH₂Cl₂:MeOH = 9:1 dosežemo, da se lisa spojine **B** na TLC-ju nekoliko zoži, zato pod UV lučko pri 366 nm vidimo zoženo liso znotraj večje lise – vidimo liso spojine **B** kot zoženo liso znotraj večje lise spojine **8**, **12** ali **16**.

Pri izolaciji in čiščenju spojin **9**, **10**, **13**, in **14** smo po odparevanju topila pri znižanem tlaku in sušenju produktov na vakuumski črpalki dobili stabilne pene in ne kristalov. Pri spojini **17** smo dobili zmes stabilne pene in kristalov. Dodatne prekrizalizacije, s katero bi omenjene spojine izolirali v obliki kristalov, nismo izvajali. Razlog je bil v tem, da so bile te spojine že

čiste in jih s prekrystalizacijo ne bi dodatno očistili, ampak bi le izgubili del teh zelenih produktov. Spojine **9**, **10**, **13**, **14** in **17** so končne spojine, ki smo jih potrebovali za testiranje. Stabilne pene so bile primerne za rokovanje (brez problemov smo jih lahko tehtali), zato jih tudi iz tega stališča ni bilo potrebno prekrystalizirati do kristalne oblike. Spojinam **9**, **10**, **13**, in **14** smo pri merjenju tališč izmerili temperaturo steklastega prehoda, spojin **17** pa smo izmerili tako temperaturo steklastega prehoda kot tudi tališče, saj smo imeli na voljo zmes stabilne pene in kristalov (stabilno peno in kristale je bilo možno pod mikroskopom vizualno enostavno ločiti med sabo).

5.3 NMR analize

NMR spektri so bili posneti v različnih topilih zaradi razlik v topnosti posameznih spojin. Nekatere spojine so bile posnete v dveh topilih z namenom, da bi videli signal, ki se je pri prejšnjem snemanju skrival v rezidualnem signalu za topilo ali v signalu za vodo. Za spojino **17**, ki od vseh spojin, za katere smo izmerili $^1\text{H-NMR}$ signal, vsebuje največ protonov, smo posneli tudi COSY, pri katerem vidimo, kateri protoni se sklapljajo med sabo. Posneli pa smo tudi HMQC, s pomočjo katerega vidimo, kateri protoni se sklapljajo s katerimi C-atomi. S temi podatki in z uporabo predikcije $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ spektrov s programom Chemoffice, je bilo možno ugotoviti, kateri signali v $^1\text{H-NMR}$ spektru pripadajo katerim protonom in preko HMQC spektra, kateri signali v $^{13}\text{C-NMR}$ spektru pripadajo katerim C-atomom. Ostale spojine, ki dajejo $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ signal, so manj kompleksne od spojine **17**, vendar po strukturi podobne, zato se je dalo na podlagi NMR spektrov spojine **17** ugotoviti, kateri signali ostalih spojin pripadajo katerim H- in C-atomom.

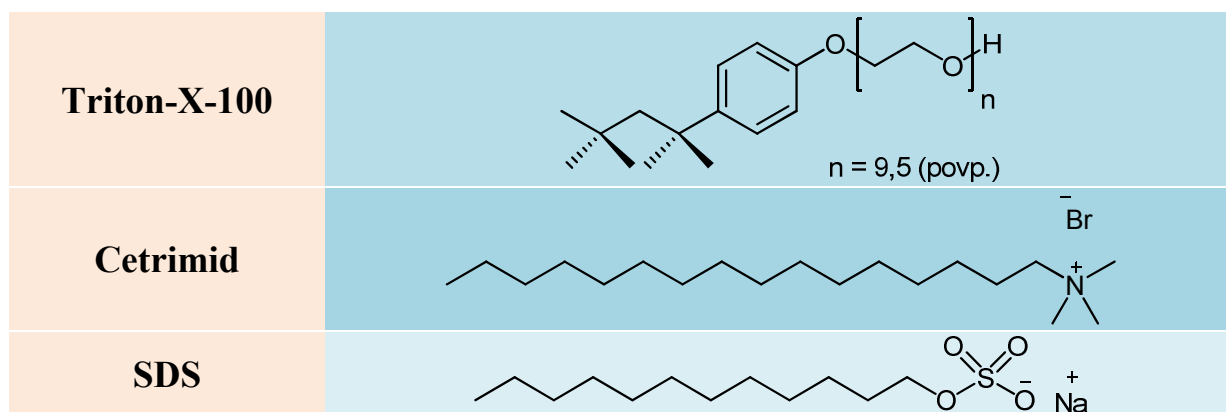
Pri spojin **8** v $^1\text{H-NMR}$ spektru ne vidimo signala ene od $-\text{CH}_2-$ skupin, ki pripada aminokislinskemu fragmentu (β -alanin), saj se le-ta pokriva z rezidualnim signalom DMSO-ja. Pri tej spojin vidimo tudi dubleta pri 6,60 ppm in 6,79 ppm. Ta dva signala bi morala biti vidna kot dublet dubleta, vendar se tega verjetno zaradi slabe resolucije ne vidi. Če bi spekter posneli pri višji frekvenci, bi videli oba signala kot dublet dubleta. Pri spojinah **12**, **13** in **16** ne vidimo $^1\text{H-NMR}$ signala $-\text{CH}_2-$ skupine, ki se nahaja ob amidni vezi, saj se pokriva s signalom za vodo. Pri $^1\text{H-NMR}$ spektru spojin **5** in **9** ne vidimo signalov za amidne protone, saj se v odvisnosti od izbranega devteriranega topila izmenjajo z devterijem (pri obeh spojinah smo kot topilo za snemanje $^1\text{H-NMR}$ spektra uporabili devteriran metanol).

Vse predpostavke o pokrivanju signalov določenih protonov spojin z rezidualnim signalom topila ali s signalom vode, so bile narejene na podlagi predikcije $^1\text{H-NMR}$ spektrov spojin s programom Chemoffice. Te predpostavke smo potrdili s snemanjem dvodimenzionalnih NMR spektrov (COSY in HSQC) spojine **17**, ki je od vseh sintetiziranih spojin, ki dajo NMR signal, najbolj kompleksna (v NMR spektrih spojine **17** vidimo več signalov kot v NMR spektrih drugih sintetiziranih spojin). Vse sintetizirane spojine so strukturno analogne, zato je možno korelirati NMR signale spojine **17** s signali ostalih sintetiziranih spojin.

Paramagnetnim spojinam **2**, **6**, **10**, **14** in **18** nismo posneli NMR spektrov, saj paramagnetni center v teh spojinah (nitroksid) širi črte v NMR spektru. Tem spojinam bi lahko posneli NMR spektre le, če bi jih predhodno reducirali do hidroksilaminov.

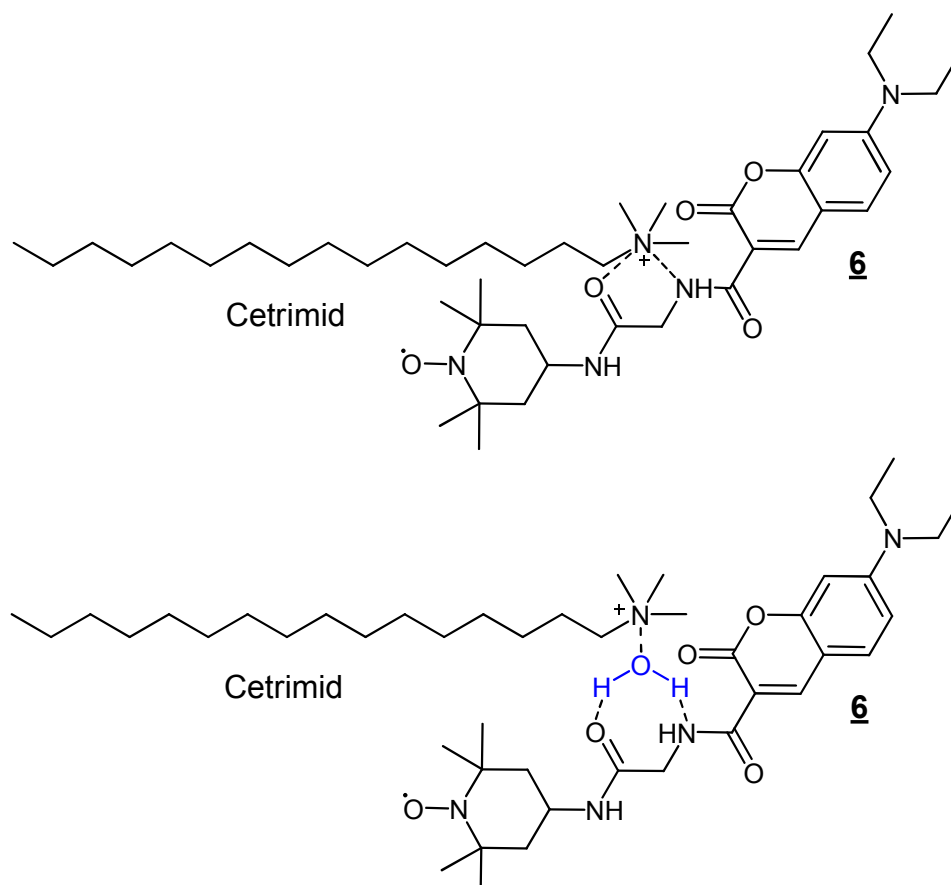
5.4 Analiza EPR spektrov

Nitroksidom (spojinam **2**, **6**, **10**, **14** in **18**) smo izmerili EPR spektre v EtOH in po pripravi micelov s tritonom-X-100, cetrimidom in SDS-om (strukture uporabljenih površinsko aktivnih snovi so prikazane na sliki 35). Pri EPR spektrih, ki smo jih posneli v EtOH, je viden značilen signal nitroksida, ki pa je pri spojini **2** nekoliko šibkejši. Pred meritvijo smo pripravili enake koncentracije spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** v EtOH, vendar so se pri spojini **2** pojavili problemi s topnostjo – kljub uporabi ultrazvočne kadičke, se vsa zatehtana spojina **2** ni hotela raztopiti (iz intenzitete EPR spektra sicer lahko določimo topnost spojine v izbranem topilu). Posledično je tudi signal pri spojini **2** nekoliko šibkejši kot pri spojinah **6**, **10**, **14** in **18**. V hiperfinem razcepu med posnetimi spektri praktično ni razlik, saj vse spojine vsebujejo enak tip nitroksida. Pri snemanju EPR spektrov spojin **2**, **6**, **10**, **14** in **18** po vgraditvi v micelle, smo ugotovili, da se spojine najbolje vgrajujejo v micelle iz SDS-a, najslabše pa v micelle iz tritona-x-100. To je razvidno iz EPR spektrov raztopin micelov. Ko smo uporabili triton-x-100 za tvorbo micelov, pri spojini **2** sploh nismo dobili EPR signala, pri spojini **6** pa smo dobili le šibek signal. Spojine **10**, **14** in **18** so se vgradile v micelle iz tritona-x-100, intenziteta EPR signala pa je bila podobna kot pri uporabi cetrimida, a šibkejša kot pri uporabi SDS-a. Ko smo za tvorbo micelov uporabili cetrimid, se spojina **2** prav tako kot pri uporabi tritona-x-100 ni vgradila v micelle, spojina **6** pa se je le malce slabše vgradila v micelle iz cetrimida kot spojine **10**, **14** in **18** – to je razvidno iz intenzitete EPR signalov raztopin micelov z dodanimi spojinami. Pri uporabi SDS za tvorbo micelov, smo celo pri spojini **2** dobili šibek EPR signal, ostale spojine – **6**, **10**, **14** in **18** – pa so se vse dobro vgradile v micelle. EPR signal je bil pri uporabi SDS-a pri spojinah **6**, **10**, **14** in **18** po obliki praktično enak, a večje intenzitete kot pri micelih iz tritona-x-100 ali cetrimida.



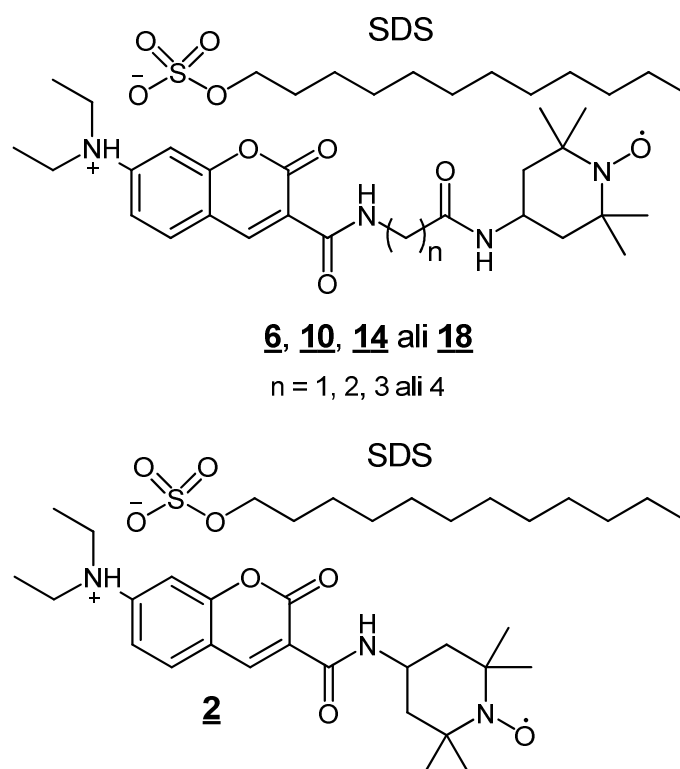
Slika 35. Strukture uporabljenih PAS (površinsko aktivna snov) za tvorbo micelov.

Triton-x-100 je neionska PAS, zato lahko tvori interakcije z vgrajenimi spojinami le preko tvorbe H-vezi in hidrofobnih interakcij. Cetrimid je kationska PAS s permanentnim nabojem (kvarterna amonijeve sol). Spojina **6** se v micelle iz cetrimida vgradi v nekoliko večji meri kot v micelle iz tritona-x-100. Možne so interakcije med kvarterno amonijevo soljo cetrimida in dvema amidnima vezema na spojini **6**, ki sta precej blizu skupaj. Možna je namreč interakcija preko H-vezi, in sicer tako, da se najprej tvorijo H-vezi med kvarterno amonijevo soljo cetrimida in molekulami vode, nato pa se tvorijo še H-vezi med temi vodnimi molekulami in obema amidnima vezema na spojini **6** (slika 36).



Slika 36. Možna interakcija med kvarterno amonijevo soljo cetrimida in dvema amidnima vezema na spojini **6** (vodne molekule, ki obdajajo kvarterno amonijevo sol in tvorijo naprej H-vezi z omenjenima amidnima vezema, so izpuščene pri zgornji sliki, pri spodnji pa je prikazana le ena vodna molekula zaradi bolj jasne slike).

Pri spojinah **10**, **14** in **18**, pri katerih sta amidni vezi bolj narazen, praktično ni razlik med vgrajevanjem v micelle iz tritona-x-100 in cetrimida. Testirane spojine se najboljše vgrajujejo v micelle iz SDS-a, ki je anionska PAS. Kislina anionska sulfatna skupina na SDS-u lahko tvori sol z dietilaminsko skupino na kumarinskem skeletu, če se le-ta protonira. Nastane ionska vez, ki dodatno stabilizira pozicioniranje testiranih spojin v micelle iz SDS-a (slika 37). Seveda so prav tako prisotne tudi H-vezi in hidrofobne interakcije med testiranimi spojinami in SDS-om.



Slika 37. Prikaz interakcije med protonirano dietilaminsko skupino na kumarinskem skeletu in anionom na sulfatni skupini SDS-a pri spojinah 2, 6, 10, 14 in 18.

Iz majhne intenzitete EPR signala raztopine micelov, v katere smo skušali vgraditi spojino 2, vidimo, da se spojina 2 v vse micle vgrajuje najslabše. Vzrok je verjetno v manjšem številu interakcij, ki jih ta spojina lahko tvori z uporabljenimi PAS-i. Verjetno tvori predvsem manj H-vezi, saj nima prisotnih dveh amidnih vezi. Drug možen vzrok je slaba vodotopnost spojine 2. Micle smo namreč pripravljali tako, da smo spojine 2, 6, 10, 14 in 18 prenesli v plastične epruvete, jih raztopili v EtOH, nato le-tega odparili (omenjene spojine so ostale adsorbirane na stenah epruвет) in dodali raztopino PAS v PBS pufru. Spojine 2, 6, 10, 14 in 18 so se lahko vgradile v micle le, če so se raztopile v PBS pufru. Možno je torej, da je spojina 2 od vseh testiranih spojin najmanj vodotopna, kar bi razložilo slabše vgrajevanje spojine 2 v micle in s tem manjšo intenziteto EPR signala raztopin micelov.

5.5 Oksidacija spojine 5 z vodikovim peroksidom in snemanje EPR spektra

Spojino 5 smo oksidirali do njenega nitroksidnega analoga (spojine 6) z uporabo oksidanta H_2O_2 , katalizatorja Na-volframata dihidrata ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) in $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, ki poveča raztapljanje Na-volframata v vodi. Reakcija se najpogosteje izvaja v vodi, vendar smo v našem primeru uporabili kombinacijo MeOH in vode zaradi kompromisa med raztapljanjem

spojine **5**, spojine **6**, Na-volframata in Na₂-EDTA. Spojina **5** je bila izbrana za reakcijo oksidacije s H₂O₂, ker je od vseh končnih spojin, ki so sekundarni amini – spojini **1**, **5**, **9**, **13** in **17** – najbolj hidrofilna oz. vodotopna. V osrednjem delu molekule vsebuje dve amidni vezi, med katerima je le ena -CH₂- skupina – ta del molekule je precej hidrofilen (polaren). Nekoliko manj je ta molekula hidrofilna in polarna v predelu, kjer se nahaja sekundarni amin (tetrametilpiperidinski analog), najbolj hidrofoben del molekule pa je kumarinski del. Zaradi teh lastnosti, se spojina **5** dobro spira z vodo (npr. iz umazane bučke, kar smo opazili med čiščenjem steklovine v laboratoriju), obenem pa kumarinski del molekule hidrofoben. Da bi nekoliko zmanjšali hidrofobni efekt reakcijskega medija, smo k vodi dodali MeOH, ki pa obenem omogoča boljše raztapljanje nitroksidnega analoga spojine **5** – spojine **6** –, ki nastane tekom reakcije. Spojina **6** zaradi nastanka nitroksida na delu molekule, kjer je bil pri molekuli **5** sekundarni amin (tetrametilpiperidinski analog), izgubi na polarnosti in hidrofilnosti v tem delu molekule, zato je dodatek MeOH smiseln. Po pripravi raztopin A, B in C (kot je opisano v poglavju 4.2.3) in snemanju EPR spektrov teh raztopin smo ugotovili, da tekom reakcije s H₂O₂ res nastane nitroksid, saj smo dobili EPR signal pri raztopini B, ki je vsebovala vse potrebne komponente za potek reakcije – spojino **5**, H₂O₂, Na-volframat in Na₂-EDTA. Uporabili smo velik prebitek katalizatorja Na-volframata (posledično tudi Na₂-EDTA, ki je potreben, da se Na-volframat raztopi) in H₂O₂, da je reakcija hitro potekla (v nekaj minutah). Možna bi bila titracija spojine **5** s H₂O₂ in s tem postopno dodajanje H₂O₂ k raztopini spojine **5**, Na-volframata in Na₂-EDTA, pri čemer bi lahko nastanek nitroksida detektirali bodisi z meritvijo EPR spektra bodisi z meritvijo fluorescence (intenziteta fluorescence bi upadala pri nastajanju nitroksida). Raztopina C, ki je vsebovala vse potrebne komponente za reakcijo razen H₂O₂, ni dala EPR signala. To pomeni, da se spojina **5** v času od priprave raztopine C do meritve EPR spektra (~ 1 ura) ni oksidirala do nitroksida z zračnim kisikom oz. s kisikom, ki je bil raztopljen v reakcijskem mediju, kljub dodanemu katalizatorju (Na-volframat). Raztopina A je služila za primerjavo kot raztopina, ki ne bi smela dati EPR signala, saj je vsebovala le spojino **5**, MeOH in vodo. Naj poudarim, da smo uporabili elementno čisto spojino **5**.

5.6 Meritve ekscitacijskih in emisijskih spektrov

Ekscitacijski spektri

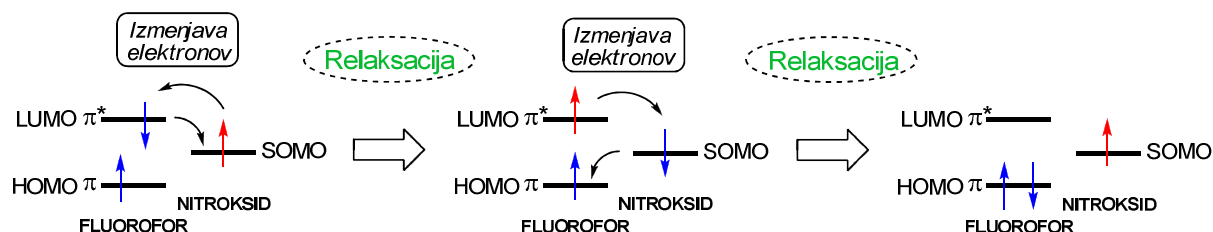
Z analizo posnetih ekscitacijskih spektrov spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** smo ugotovili, da imajo te spojine maksimum ekscitacije pri valovni dolžini 425 nm. Gre za povprečno vrednost, vendar so odstopanja pri posameznih spektrih minimalna – največ za 2 nm navzgor oz. 1 nm navzdol. Primerjali smo ekscitacijske spektre teh spojin po parih sekundarni amin-nitroksid, pri čemer sta bila sekundarni amin in nitroksid pri posamezni primerjavi strukturna analoga, saj sta imela med kumarinskim delom molekule in piperidinskim delom molekule enak aminokislinski distančnik. Tako smo paroma primerjali spektre spojin **1** in **2**, **5** in **6**, **9** in **10**, **13** in **14** ter **17** in **18**. V vseh primerih je imel

ekscitacijski spekter nitroksida manjšo intenziteto kot ekscitacijski spekter njegovega strukturnega analoga – sekundarnega amina. Do tega pojava pride zaradi prisotnosti nitroksida v strukturi spojin **2**, **6**, **10**, **14**, in **18**, ki deluje kot dušilec fluorescence kromofora (kumarinski del molekule) v ekscitiranem stanju – posledica, ki jo opazimo, je zmanjšana fluorescenca kromofora. [1] Nitroksidi povzročajo t.i. kolizijsko ali dinamično dušenje fluorescence, pri čemer mora priti do trka med nitroksidom in fluoroforom. V primeru kolizijskega (dinamičnega) dušenja fluorescence mora dušilec fluorescence (ang. *quencher*; v našem primeru je to nitroksid) difundirati do fluorofora tekom življenjske dobe ekscitiranega (vzbujenega) stanja fluorofora. Ko pride do kontakta med dušilcem fluorescence (nitroksidom) in fluoroforom, se fluorofor vrne v osnovno stanje (ang. *ground state*), pri čemer ne pride do emisije fotona. V splošnem do dušenja pride brez trajne spremembe molekul, torej brez fotokemijske reakcije. Obstaja tudi statično dušenje fluorescence, pri čemer nastane kompleks med fluoroforom in dušilcem fluorescence. Ta kompleks ne fluorescira. Tako pri dinamičnem (kolizijskem) kot tudi pri statičnem dušenju fluorescence, morata biti fluorofor in dušilec fluorescence v kontaktu. [5]

Pri spojinah, ki v strukturi vsebujejo tako fluorofor (v našem primeru je to kumarinski fluorofor) kot tudi dušilec fluorescence (nitroksid), imamo opravka z intramolekulskim in intermolekulskim dušenjem fluorescence. Intramolekulsko dušenje fluorescence je učinkovitejše, saj dušilec fluorescence (nitroksid) duši fluorescenco fluorofora že pri nižji koncentraciji, kot če oba (fluorofor in nitroksid) ne bi bila združena v eni molekuli. Drugače povedano, če bi hoteli učinkovito zadušiti fluorescenco raztopine fluorofora, bi morali dodati več eq nitroksida, da bi prišlo do enakega efekta, kot če oba združimo v eno molekulo (v tem primeru je št. eq nitroksida in fluorofora seveda enako). Pri dvojnih fluorescenčno-spinskih sondah pride tako do intermolekulskega dušenja fluorescence, kot tudi intramolekulskega dušenja fluorescence, vendar je prispevek intramolekulskega dušenja k celokupnemu dušenju večji in bolj pomemben. [8]

Pri dvojnih fluorescenčno-spinskih sondah tipa *fluorofor-distančnik-nitroksid* je fluorofor v ekscitiranem stanju (po obsevanju s svetlobo določene valovne dolžine, s čimer dosežemo ekscitacijo fluorofora) donor elektrona, nitroksid pa je akceptor elektrona. Možni so trije mehanizmi intramolekulskega dušenja fluorescence, in sicer: (1) prenos energije preko Försterjevega dipol–dipola in/ali Dexterjev izmenjevalni mehanizem; (2) z elektronsko izmenjavo induciran intersistemski prehod in interna konverzija spina ter (3) elektronski transfer (ET; prenos elektornov) med kromoforom v ekscitiranem stanju in nitroksidom. Mehanizem (1) je najmanj verjeten oz. je bil že ovržen v predhodnih preiskavah. Mehanizem (2) je najbolj verjeten, saj se mehanizem (3) nanaša predvsem na sisteme, pri katerim imamo v mediju prisoten blag reducent (glicerol, etanol, etilenglikol,...) – v teh sistemih pride do nastanka hidrosilamina, ki nastane kot posledica fotokemijske reakcije po mehanizmu (3). Raztopine spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** so bile pripravljene v DMSO, ki nima redukcijskih lastnosti. Mehanizem (2) intramolekulskega dušenja fluorescence pri spojinah tipa *fluorofor-distančnik-nitroksid* je naslednji: {1} najprej pride do ekscitacije fluorofora kot posledica obsevanja s svetlobo, pri čemer se 1 π -elektron prestavi iz π -vezne (HOMO)

orbitale v π^* -razvezno (LUMO) orbitalo z višjo energijo (energijo za prehod prispeva foton); {2} sledi izmenjava elektrona nitroksida v SOMO z elektronom fluorofora v ekscitiranem stanju v π^* -razvezni orbitali (pri tem pride do relaksacije sistema) – ta dva elektrona imata obraten spin; {3} nato se elektron nitroksida v SOMO prestavi v π -vezno orbitalo fluorofora, elektron iz π -razvezne orbitale fluorofora pa gre v SOMO nitroksida (pri tem pride do relaksacije sistema). Mehanizem je prikazan na sliki 38. [9]



HOMO.....najvišja (z elektronom) zasedena molekulska orbitala
 LUMO.....najnižja (z elektronom) nezasedena molekulska orbitala
 SOMO.....z enim elektronom zasedena molekulska orbitala
 πvezna π -orbitala
 π^*razvezna π^* -orbitala

Slika 38. Prikaz najbolj verjetnega mehanizma intramolekulskega dušenja fluorescence. [9]

Pri primerjavi ekscitacijskih spektrov smo opazili, da je razmerje med ekscitacijskim odzivom nitroksida in sekundarnega amina za posamezne spojine z različnim aminokislinskim distančnikom drugačno. Zato smo izračunali razmerje ekscitacijskega odziva nitroksid/sekundarni amin za omenjene pare spojin z enakim aminokislinskim distančnikom in ga izrazili v %, da bi dobili kvantitativno mero tega opažanja. Razmerje je najmanjše pri paru spojin brez aminokislinskega distančnika, nato sledi par z aminokislinskim distančnikom β -alaninom, nato par z GABA, zatem par s 5-AVA in na koncu par z glicinom kot aminokislinskim distančnikom (slika 19). Izračunano razmerje je torej največje pri paru z aminokislinskim distančnikom glicinom, kar je presenetljivo. Pričakovali bi namreč, da bi si razmerja sledila po velikosti skladno z rastjo dolžine aminokislinskega distančnika – par brez distančnika, par z glicinom, par z β -alaninom, par z GABA in par s 5-AVA – saj smo predvidevali, da bo intramolekulsko dušenje fluorescence s strani nitroksida padalo z večanjem razdalje med kumarinskim fluoroforom in nitroksidnim delom molekule.

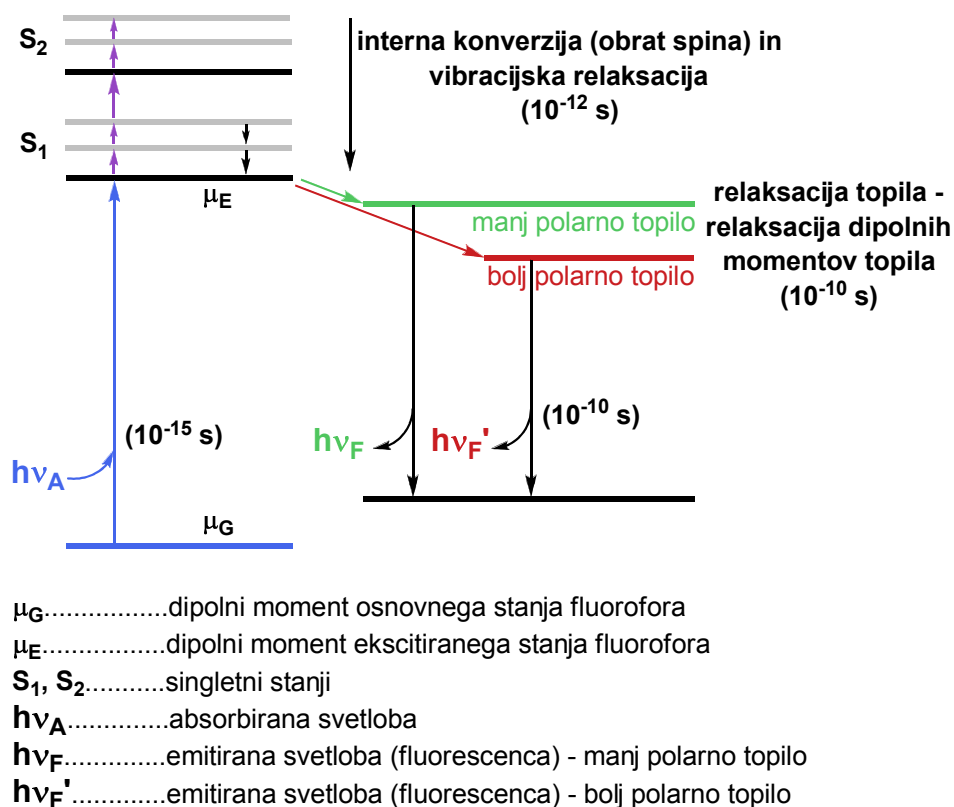
Emisijski spektri

Posneli smo emisijske spektre spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** pri različnih koncentracijah (2, 3, 4, 5 in 6 mM), da bi opazovali dušenje fluorescence, pa tudi, da bi opazovali, pri kateri koncentraciji je fluorescenca največja. Pri previsokih koncentracijah namreč pride do avtodušenja (ang. *self-quenching*) zaradi kombinacije ekscitiranega tripleta in sosednjega kromofora v osnovnem stanju, ki ujameta energijo (ang. »*trap-site formation*«), in prenosa energije med fluorofori. Pri prevelikih koncentracijah je zaradi interakcij med molekulami, ki vsebujejo fluorofore, fluorescenca manjša. [7] Glede na to, da spojine, ki smo

jih uporabili za meritve fluorescence, tudi absorbirajo svetlobo, je možno, da pri višjih koncentracijah te spojine zmanjšajo intenziteto ekscitacijske svetlobe zaradi absorpcije le-te in/ali preprečujejo fluorescenčnim fotonom, da bi prodrli iz raztopine, prav tako zaradi efekta absorpcije svetlobe. V obeh primerih bi zaznali manjšo fluorescenco vzorca oz. večje dušenje fluorescence, zato lahko govorimo o obliki avtodušenja zaradi efekta absorpcije. [7] Tako kot pri ekscitacijskih spektrih, smo tudi pri analizi emisijskih spektrov paroma primerjali spektre spojin **1** in **2**, **5** in **6**, **9** in **10**, **13** in **14** ter **17** in **18**. Na primeru 2, 3, 4, 5 in 6 mM raztopin teh spojin smo ugotavljali dušenje fluorescence nitroksidov (**2**, **6**, **10**, **14** in **18**) v primerjavi z analognimi nenitroksidnimi spojinami (analognimi sekundarnimi amini **1**, **5**, **9**, **13**, **17**). Na slikah 20-24 so prikazani primeri spektrov za 4 mM koncentracije omenjenih spojin, in sicer za vsak par sekundarni amin-nitroksid z enakim aminokislinskim distančnikom ter za par brez distančnika posebej. Osnovna predpostavka je bila, da bližje kot se nitroksid v molekuli nahaja kumarinskemu fluoroforu (krajši je aminokislinski distančnik oz. distančnika sploh ni, kot je to v primeru spojine **2**), bolj intenzivno je intramolekularno dušenje fluorescence s strani nitroksidnega dela molekule. Pričakovali smo torej, da bo nitroksid **2** najbolj dušil fluorescenco, nitroksid **18** pa najmanj. Za pare sekundarni amin-nitroksid smo izračunali % dušenja fluorescence, ki nam da kvantitativno mero dušenja fluorescence nitroksidnega dela molekule. Ta % dušenja fluorescence smo primerjali pri parih sekundarni amin-nitroksid z različno dolgim aminokislinskim distančnikom med nitroksidnim delom molekule in kumarinskim fluoroforom ter pri paru brez aminokislinskega distančnika. Največje dušenje fluorescence smo zaznali pri spojini **2** (ne vsebuje aminokislinskega distančnika v strukturi – nitroksidni del molekule in kumarinski fluorofor sta najbližje skupaj), kar smo tudi predvidevali. Manj intenzivno je bilo dušenje fluorescence pri spojini **10** (aminokislinski distančnik je β -alanin), še manjše je bilo dušenje pri spojini **14** (aminokislinski distančnik je GABA) in še manjše pri spojini **18** (aminokislinski distančnik je 5-AVA). Presenetljivo je bilo dušenje fluorescence najmanjše pri spojini **6**, ki ima aminokislino glicin (glicin je najkrajša aminokislina, ki je bila uporabljena za distančnik) kot distančnik med nitroksidnim delom molekule in kumarinskim fluoroforom. Spojina **6** torej tudi tu po svojih lastnostih izstopa med ostalimi. Raztopine spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18**, katerim smo merili ekscitacijske in emisijske spektre, smo pripravili v topilu DMSO. To topilo smo uporabili kot kompromis z namenom, da bi raztopili vse omenjene spojine. To nam ni povsem uspelo. Spojini **1** in **2** sta se pri pripravi 2 mM raztopin v DMSO slabo raztapljali. Kljub uporabi ultrazvočne kadičke in segrevanja z vročim zrakom nismo uspeli povsem raztopiti teh dveh spojin v DMSO. Ker smo 3 mM raztopino pripravljali iz 2 mM raztopine z redčenjem, smo pripravili homogeno 2 mM suspenzijo spojin **1** in **2**, katere del smo nato hitro prenesli v prazno ependorfko in jo razredčili do 3 mM raztopine. Pri tej koncentraciji sta se spojini **1** in **2** povsem raztopili v DMSO. Iz grafa na sliki 25 vidimo, da % dušenja fluorescence izstopa pri spojini **2** pri 2 mM koncentraciji. Dušenje fluorescence je tukaj še posebej intenzivno, vendar gre verjetno tudi za sipanje svetlobe na delcih, saj imamo tukaj pravzaprav opravka s suspenzijo in ne z raztopino. Zaradi sipanja pride manj svetlobe (fluorescence) do detektorja, kar se kaže kot dodatno povečano dušenje fluorescence. Naj omenim tudi, da se je spojina **2** pri pripravi 2 mM raztopine oz. suspenzije še slabše topila v DMSO kot spojina **1**, kar pomeni, da je bilo v primeru spojine **2** tekom meritve fluorescence

prisotno več delcev kot pri spojini **1**, to pa je torej možna razlaga večjega »dušenja« fluorescence spojine **2** v primeru rezultatov meritev dušenja pri 2 mM »raztopini«. [7] Bolj smiselna bi bila priprava 3 mM raztopine in nato redčenje le-te do 4, 5 in 6 mM raztopine.

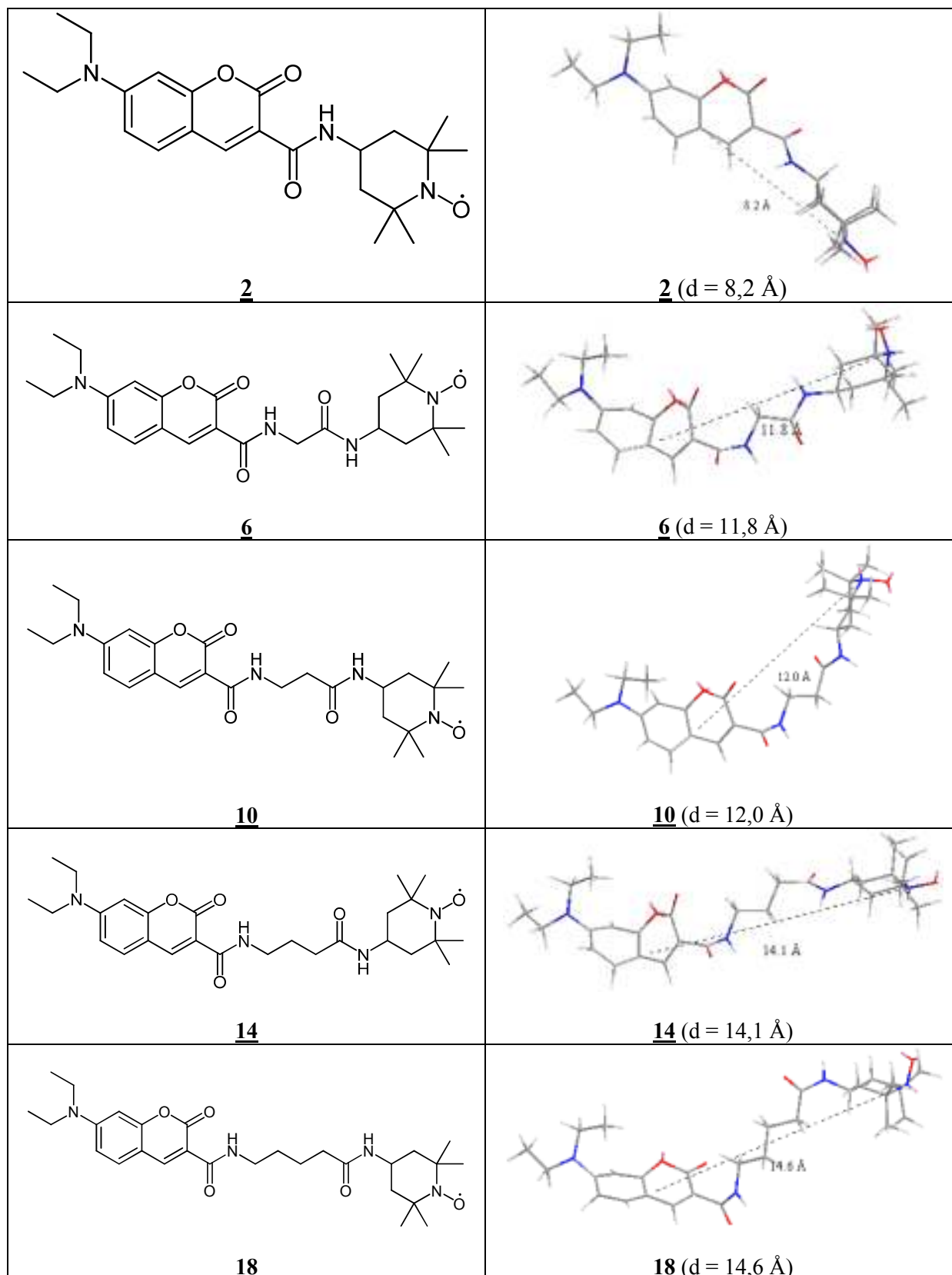
Pri meritvah emisije in opazovanju dušenja fluorescence nitroksidov **2**, **6**, **10**, **14** in **18** je najbolj zanimivo to, da je dušenje fluorescence najmanjše ravno pri spojini **6**, ki v svoji strukturi vsebuje najkrajši aminokislinski distančnik med kumarinskim fluoroforom in nitroksidom (če izvzamemo spojino **2**, ki distančnika sploh nima in pri kateri je dušenje fluorescence po pričakovanju največje). Možna razlaga je naslednja. Dipolni moment fluorofora v ekscitiranem stanju je običajno večji kot pri neekscitiranem stanju (osnovno stanje; ang. *ground state*). Po ekscitaciji fluorofora se dipolni momenti topila (v našem primeru je to DMSO) reorientirajo ali relaksirajo okrog dipolnega momenta ekscitiranega fluorofora, kar zmanjša energijo ekscitiranega stanja (posledično je fluorescenca manj intenzivna). Če povečamo polarnost uporabljenega topila, je ta efekt še večji, kar rezultira v emisiji pri nižjih energijah ali pri večjih valovnih dolžinah. Na ta efekt so bolj občutljivi fluorofovi, ki so bolj polarni. Testirane spojine (**1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18**) vsebujejo kumarinski fluorofor, ki vsebuje elektrondonorsko dietilaminsko skupino, kar da fluoroforu delen polarni karakter. Zato je zgoraj omenjeni efekt možen v primeru testiranih spojin. [6] Slika 39 prikazuje vpliv polarnosti topila na fluorescenco fluorofora.



Slika 39. Jablonski-jev diagram prenosa energije: vpliv polarnosti topila na fluorescenco. [6]

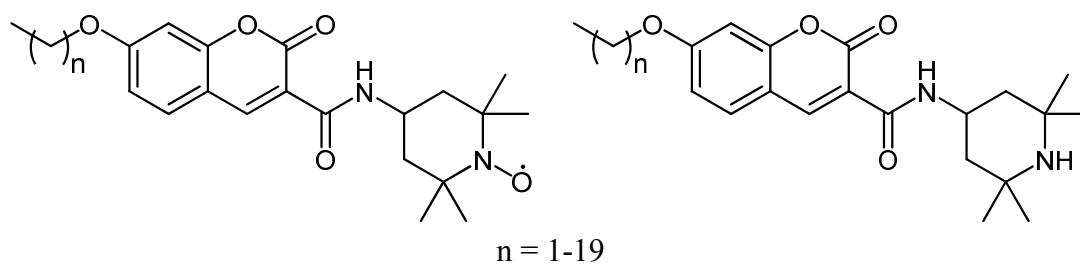
Če pogledamo strukturo spojine **6** (in **5**), vidimo, da se ob kumarinskem fluoroforu nahajata dve polarni amidni vezi precej blizu skupaj – omenjeni amidni vezi sta pri spojini **6** (in **5**) bolj

blizu skupaj, kot sta skupaj amidni vezi pri spojinah **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18**. Ker smo raztopine testiranih spojin pripravljali v topilu DMSO, ki je precej polarno, je možno, da se okrog dveh amidnih vezi blizu kumarinskega fluorofora pri spojinah **5** in **6** zadržuje večje število orientiranih (urejenih) molekul DMSO-ja oz. debelejši plašč molekul DMSO-ja. To pomeni, da se mora pri spojinah **5** in **6** več dipolnih momentov molekul DMSO reorientirati okrog dipolnega momenta ekscitiranega fluorofora, kar zmanjša energijo ekscitiranega stanja (posledično je fluorescenca manj intenzivna). To bi bil lahko vzrok manjšemu % dušenju fluorescence pri spojini **6**. Če pogledamo intenziteto emisijskega signala pri spojini **5**, vidimo, da je intenziteta emisijskega signala pri valovni dolžini maksimalne intenzitete emisije (472 nm) nižja kot pri ostalih spojinah, ki so sekundarni amini (spojinah **1**, **9**, **13**, in **17**), kar podpira hipotezo o debelejšem plašču molekul DMSO-ja okrog te spojine. Nasprotno pa je intenziteta emisijskega signala pri spojini **6** pri valovni dolžini maksimalne intenzitete emisije (472 nm) višja kot pri ostalih spojinah, ki so nitroksidi (spojinah **2**, **10**, **14**, in **18**). Nitroksid **6** je bolj nepolarna molekula kot njegov analogen sekundarni amin – spojina **5**. Nitroksidni fragment v spojini **6** je namreč bolj nepolaren kot pa je njegov strukturni analog v spojini **5**, ki je sekundarni amin (le-ta je precej polaren). Verjetno je pri spojini **6** plašč molekul DMSO zato tanjši kot pri spojini **5**, kar pomeni manjšo izgubo energije na račun reorientacije dipolnih momentov topila okrog dipolnega momenta ekscitiranega fluorofora pri spojini **6** kot pri spojini **5**. To vidimo kot manjši % dušenja fluorescence pri spojini **6**. Iz meritev emisijskih spektrov spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** je očitno, da ima distančnik med fluoroforom in nitroksidom precejšen vpliv na dušenje fluorescence. Najbolj učinkovito duši fluorescenco spojina **2**, ki nima distančnika med fluoroforom in nitroksidnim delom molekule. Obstaja optimalna razdalja med fluoroforom in dušilcem fluorescence, če sta oba del iste molekule, zato je smiselno izhajati iz razdalje med kumarinskim fluoroforom in nitroksidnim delom molekule pri spojini **2**, saj le-ta kot že omenjeno najbolj duši fluorescenco fluorofora. [9] Pri spojinah **2**, **6**, **10**, **14** in **18** smo s programom Chemoffice izmerili razdaljo med nitroksidnim dušikom in C-atomom v kumarinskem fluoroforu, ki leži na para mestu glede na dietilaminsko skupino. Omenjeno razdaljo smo izmerili po minimizaciji energije z uporabo modela polja sil MM2 (s to funkcijo v programu dosežemo enega izmed lokalnih minimumov sterične energije); vrednosti so prikazane na sliki 40.



Slika 40. Prikaz razdalje med nitroksidnim dušikom in C-atomom v kumarinskem fluoroforu, ki leži na para mestu glede na dietilaminsko skupino. Levo so prikazane spojine **2**, **6**, **10**, **14**, in **18**, tako kot smo jih narisali v program ChemOffice. Desno so prikazane iste spojine po minimizaciji sterične energije z uporabo polja sil MM2.

Spojine **6**, **10**, **14**, in **18** (in njihovi analogni sekundarni amini **5**, **9**, **13** in **17**) imajo v predelu aminokislinskega distančnika, ki povezuje kumarinski fluorofor z nitroksidnim delom molekule, dve (spojini **5** in **6**), tri (spojini **9** in **10**), štiri (spojini **13** in **14**) oz. pet (spojini **17** in **18**) vrtljivih enojnih N-C in/ali C-C vezi, upoštevajoč da imajo amidne vezi delen karakter dvojnih vezi, kar ovira njihovo rotacijo. Posledično se lahko nitroksidni del molekule pri spojinah **6**, **10**, **14**, in **18** bolj približa kumarinskemu fluoroforu kot pri spojini **2**, ki najbolj duši fluorescenco. Kako se bo molekula zvila v raztopini, je odvisno predvsem od lastnosti topila – predvsem od polarnosti topila. Če pogledamo strukturo nitroksidov **6**, **10**, **14**, in **18**, opazimo, da so različni deli teh molekul različno polarni. Kumarinski fluorofor je splošno gledano nepolaren, vendar vsebuje dietilaminsko skupino, ki pa je polarna. V predelu aminokislinskega distančnika (pri spojinah **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18**) imamo dve polarni amidni vezi. Vmes med amidnima vezema so $-CH_2-$ skupine, ki so nepolarne. Ta del molekule je bolj nepolaren zlasti, če je teh $-CH_2-$ skupin več (npr. pri spojinah **13**, **14**, **17** in **18**), polarnost amidnih vezi pa v predelu aminokislinskega distančnika pride bolj do izraza, če sta amidni vezi blizu skupaj, kot je to najbolj izrazito pri spojinah **5** in **6**. Nitroksidni del molekule pri spojinah **2**, **6**, **10**, **14**, in **18** je nepolaren, medtem ko je ta del molekule (prisotnost sekundarne aminske skupine) pri spojinah **1**, **5**, **9**, **13**, in **17** bolj polaren. Če omenjene spojine raztapljamo v nepolarnih topilih, se bodo molekule skušale zviti tako (kolikor je to pač možno), da bo topilu izpostavljen čim bolj nepolaren del molekule, če pa te spojine raztapljamo v bolj polarnih topilih, pa se bodo molekule skušale zviti tako, da bo topilu čim bolj izpostavljen njihov bolj polarni del. To bi lahko vplivalo na dušenje fluorescence predvsem pri spojinah **10**, **14**, in **18**. Če bi te spojine raztopili v nepolarnem topilu, bi se molekule verjetno zvale tako, da bi se nepolaren nitroksidni del molekule verjetno približal nepolarnemu kumarinskemu fluoroforu, kar bi lahko povečalo dušenje fluorescence (to hipotezo bi bilo smiselno preizkusiti). Poleg tega imajo bolj nepolarna topila manjši dipolni moment, kar bi zmanjšalo izgubo energije na račun reorientacije dipolnih momentov topila in s tem molekul topila glede na dipolni moment ekscitiranega fluorofora. Ta efekt bi lahko preverili tudi tako, da bi spremenili polarnost testiranih spojin – pripravili bi npr. analoge spojin **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18**, vendar bi v sintezi le-teh tvorili estrske vezi namesto amidnih pri povezovanju kumarinskega fluorofora, distančnika in nitroksidnega dela molekule. S pripravo takšnih spojin bi lahko preverili tudi, ali je za “individualen” karakter (odstopanje v % dušenja fluorescence, manjša topnost v nepolarnih topilih,...) spojin **5** in **6** odgovoren par polarnih amidnih vezi, ki sta blizu skupaj v predelu aminokislinskega distančnika. Zanimivo bi bilo tudi preveriti vgrajevanje sintetiziranih končnih spojin v membrane liposomov in eritrocitov, pri čemer bi preverili dušenje fluorescence in morebitne razlike v EPR spektrih v primerjavi z raztopinami. Iz posnetih emisijskih spektrov je očitno, da je dušenje fluorescence najbolj učinkovito, če nitroksidni dušilec vezemo neposredno na fluorofor, vendar pa to ne pomeni, da so take spojine najbolj uporabne za delo na celicah. Verjetno bi bilo potrebno uporabiti analog uporabljenega kumarinskega fluorofora (spojina **B**), ki bi imel namesto dietilaminske skupine $-OH$ skupino, na katero bi lahko vezali alkilna sidra in s tem povečali sidranje dvojnih fluorescenčno-spinskih sond in pasti v membrano (slika 41).



Slika 41. Predlagana struktura dvojnih fluorescenčno-spinskih sond (levo) in pasti (desno) za uporabo na celicah, katerih fluorescenca bi se significantno razlikovala zaradi bližine fluorofora in nitroksidnega dušilca fluorescence.

6. SKLEP

Razdalja med nitroksidnim fragmentom (dušilec fluorescence) in fluoroforom igra pomembno vlogo v dušenju fluorescence. Smiselna struktura dvojne fluorescenčno-spinske sonde je takšna, da sta fluorofor in nitroksidni fragment locirana čim bližje skupaj v molekuli. Za testiranje spojin *in vitro* je potrebno upoštevati polarnost dvojnih fluorescenčno-spinskih sond, saj ima to velik vpliv na topnost v uporabljenem mediju. Preveč polaren značaj dvojne fluorescenčno-spinske sonde zahteva uporabo bolj polarnega topila za raztapljanje, kar pa neugodno vpliva na dušenje fluorescence (le-to je ob uporabi bolj polarnih topil manj intenzivno). Pripravljene končne spojine **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18** bi bilo smiselno raziskovati naprej – preverili bi lahko njihovo vgrajevanje v liposome, eritrocite, stabilnost dvojnih fluorescenčno-spinskih sond (tvorba hidroksilamina), reakcije dvojnih fluorescenčno-spinskih pasti z ROS in kako se to odraža pri meritvah fluorescence, smiselna bi bila tudi titracija dvojnih fluorescenčno-spinskih pasti z vodikovim peroksidom in meritev EPR in/ali fluorescence (nanaša se na spojine **1**, **5**, **9**, **13**, in **17**) ipd. V primeru, da bi se te spojine izkazale za uporabne, bi bilo potrebno optimizirati njihovo sintezo. Najbolj neugodna je kislina hidroliza estrov **3**, **7**, **11** in **15**, saj je potrebno uporabiti velike volumne koncentrirane HCl, da hidroliza poteče. Vredno bi bilo poizkusiti s kakšno drugo močnejšo kislino (npr. *p*-toluensulfonsko kislino vezano na smole), vendar bi morali paziti, da ne bi razpadel laktonski obroč v kumarinu. Smiselna bi bila tudi priprava spojin, ki bi bile analogne spojinam **1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **13**, **14**, **17** in **18**, le da bi v predelu distančnika med kumarinskim delom in nitroksidnim fragmentom oz. njegovim nenitroksidnim analogom (sekundarnim aminom) vsebovale bolj nepolarne estrske vezi in ne amidne (res pa je, da bi bile takšne spojine zaradi prisotnosti estrske vezi v njihovi strukturi manj stabilne na hidrolizo). Takšnim spojinam bi nato izmerili emisijske spektre in ugotovili, ali bi prišlo do enakega odstopanja kot pri spojinah **5** oz. **6**, kjer smo presenetljivo izmerili najmanjši % dušenja fluorescence. Spojina **1**, ki intenzivno fluorescira v trdnem stanju (ker je rumene barve, je fluorescenca močnejša kot pri izhodni spojinah **B**, ki je oranžne barve in zato več emitirane svetlobe tudi absorbira), poleg tega pa je njena priprava enostavna, je uporabna tudi kot barvni označevalec, saj bi z njo lahko označili različne materiale, pri čemer bi uporabili zelo malo te spojine. Tako označen material bi lahko nato spremljali preko emitirane svetlobe ali z EPR.

7. LITERATURA

1. G. I. Likhtenshtein. Nitroxide Spin Probes for Studies of Molecular Dynamics and Microstructure. V *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2008; 205-237
2. G. I. Likhtenshtein. Nitroxide Redox Probes and Traps, Nitron Spin Traps. V *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2008; 239-268
3. G. I. Likhtenshtein. Spin Labeling in Biochemistry and Biophysics. V *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2008; 331-369
4. B. J. Gaffney. The Chemistry of Spin Labels. V *Spin Labeling. Theory and Applications*; Edited by Lawrence J. Berliner; Academic Press Inc., New York, San Francisco, London, 1976; 183-238.
5. J. R. Lakowicz. Quenching of Fluorescence. V *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*; Springer Science+Business Media, LLC, Singapore, 2006; 278-330
6. J. R. Lakowicz. Solvent and Environmental Effects. V *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*; Springer Science+Business Media, LLC, Singapore, 2006; 205-235
7. M. Hof; V. Fidler; R. Hutterer. Basics of Fluorescence Spectroscopy in Biosciences. V *Fluorescence Spectroscopy in Biology. Advanced Methods and their Applications to Membranes, Proteins, DNA and Cells*; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005; 3-29
8. S. Jockusch; G. Dedola; G. Lem; N. J. Turro. Electron Spin Polarization by Intramolecular Triplet Quenching of a Nitroxyl Radical Labeled Thioxanthonedioxide. *J. Phys. Chem. B.* **1999**, *103*, 9126-9129.
9. G. I. Likhtenshtein. Factors affecting light energy conversion in dual fluorophore–nitroxide molecules in solution and a protein. *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80 No. 10*, 2125–2139.
10. J. H. Powell; E. M. Johnson II; P. M. Gannett. Improvement of a Critical Intermediate Step in the Synthesis of a Nitroxide-Based Spin-Labeled Deoxythymidine Analog. *Molecules.* **2000**, *5*, 1244-1250.

11. Shin Mizukami; Shuji Watanabe; Yuichiro Hori; Kazuya Kikuchi. Covalent Protein Labeling Based on Non-catalytic β -Lactamase by Using FRET Substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016-5017.
12. Yongmin Ma; Wei Luo; P. J. Quinn; Zudong Liu; R. C. Hider. Design, Synthesis, Physicochemical Properties, and Evaluation of Novel Iron Chelators with Fluorescent Sensors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (25), 6349–6362.
13. F. J. Dekker; M. Ghizzoni; N. van der Meer; R. Wisastra; H. J. Haisma. Inhibition of the PCAF histone acetyl transferase and cell proliferation by isothiazolones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, *17* (2), 460-466.
14. C. Schmuck; T. Rehm; L. Geiger; M. Schäfer. Synthesis and self-association properties of flexible guanidiniocarbonylpyrrole-carboxylate zwitterions in DMSO: intra- versus intermolecular ion pairing. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (16), 6162-6170.
15. He Guangjie; Guo Dong; He Cheng; Zhang Xiaolin; Zhao Xiuwen; Duan Chunying. A Color-Tunable Europium Complex Emitting Three Primary Colors and White Light. *Angewandte Chemie, International Edition*. **2009**, *48* (33), 6132-6135.
16. Chen Kuan-Hung; Liao Jen-Hai; Chan Hsin-Yu; Fang Jim-Min. A fluorescence sensor for detection of geranyl pyrophosphate by the chemo-ensemble method. *Journal of Organic Chemistry*. **2009**, *74* (2), 895-898.
17. Jung Hyo Sung; Kwon Pil Seung; Lee Jeong Won; Kim Jae Il; Hong Chang Seop; Kim Jong Wan; Yan Shihai; Lee Jin Yong; Lee Jung Hwa; Joo Taiha; Kim Jong Seung. Coumarin-Derived Cu^{2+} -Selective Fluorescence Sensor: Synthesis, Mechanisms, and Applications in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, *131* (5), 2008-2012.
18. G. Wells; M. Suggitt; M. Coffils; A. H. Baig Mirza; P. W. Howard; P. M. Loadman; J. A. Hartley; T. C. Jenkins; D. E. Thurston. Fluorescent 7-diethylaminocoumarin pyrrolbenzodiazepine conjugates: Synthesis, DNA interaction, cytotoxicity and differential cellular localization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, *18* (6), 2147-2151.
19. V. Ranjit N. Munasinghe; J. E. T. Corrie; G. Kelly; S. R. Martin. Fluorescent Ligands for the Hemagglutinin of Influenza A: Synthesis and Ligand Binding Assays. *Bioconjugate Chemistry*. **2007**, *18* (1), 231-237.
20. I. Aujard; C. Benbrahim; M. Gouget; O. Ruel; J. B. Baudin; P. Neveu; L. Jullien. o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: syntheses and

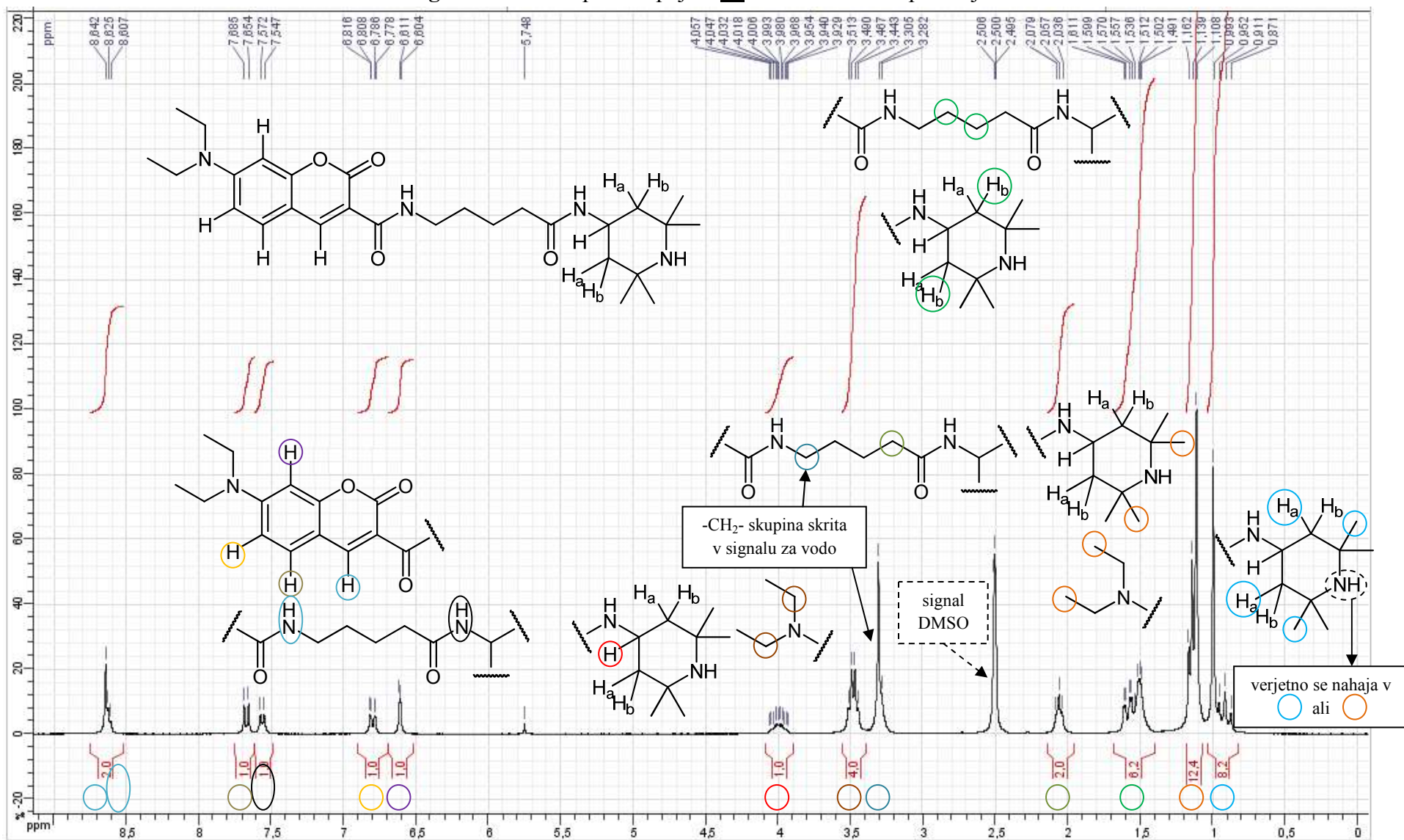
- uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chemistry*. **2006**, *12* (26), 6865-6879.
21. T. Berthelot; J. C. Talbot; G. Lain; G. Deleris; L. Latxague. Synthesis of Nε -(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Nε -(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence. *Journal of Peptide Science*. **2005**, *11* (3), 153-160.
22. Song Aimin; Wang Xiaobing; Lam Kit S. A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with ortho-hydroxyaryl aldehydes or ketones. *Tetrahedron Letters*. **2003**, *44* (9), 1755-1758.
23. X. H. Luan; N. M. F. S. A. Cerqueira; A. M. A. G. Oliveira; M. M. M. Raposo; L. M. Rodrigues; P. Coelho; A. M. F. Oliveira-Campos. Synthesis of fluorescent 3-benzoxazol-2-yl-coumarins. *Advances in Colour Science and Technology*. **2002**, *5* (1), 18-23.
24. E. Brunet; P. Garcia-Losada; J. C. Rodriguez-Ubis; O. Rodriguez-Ubis; O. Juanes. Synthesis of new fluorophores derived from monoazacrown ethers and coumarin nucleus. *Canadian Journal of Chemistry*. **2002**, *80* (2), 169-174.
25. Tamiaki Hitoshi; Ogawa Keishiro; Enomoto Keisuke; Taki Kazutaka; Hotta Atsushi; Toma Kazunori. Supramolecular gelation of alcohol and water by synthetic amphiphilic gallic acid derivatives. *Tetrahedron*. **2010**, *66* (9), 1661-1666.
26. F. Gigante; M. Kaiser; R. Brun; I. H. Gilbert. SAR studies on azasterols as potential anti-trypanosomal and anti-leishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, *17* (16), 5950-5961.
27. Li Jiabo; Sha Yaowu. A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules*. **2008**, *13* (5), 1111-1119.
28. Dutta Sujit; Kim Suk-Kyung; D. B. Patel; Kim Tae-Jeong; Chang Yongmin. Some new DTPA-N,N"-bis(amides) functionalized by alkyl carboxylates: Synthesis, complexation and stability properties. *Polyhedron*. **2007**, *26* (14), 3799-3809.
29. L. Gros; S. O. Lorente; C. Jimenez Jimenez; V. Yardley; L. Rattray; H. Wharton; S. Little; S. L. Croft; L. M. Ruiz-Perez; D. Gonzalez-Pacanowska; I. H. Gilbert. Evaluation of Azasterols as Anti-Parasitics. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**, *49* (20), 6094-6103.

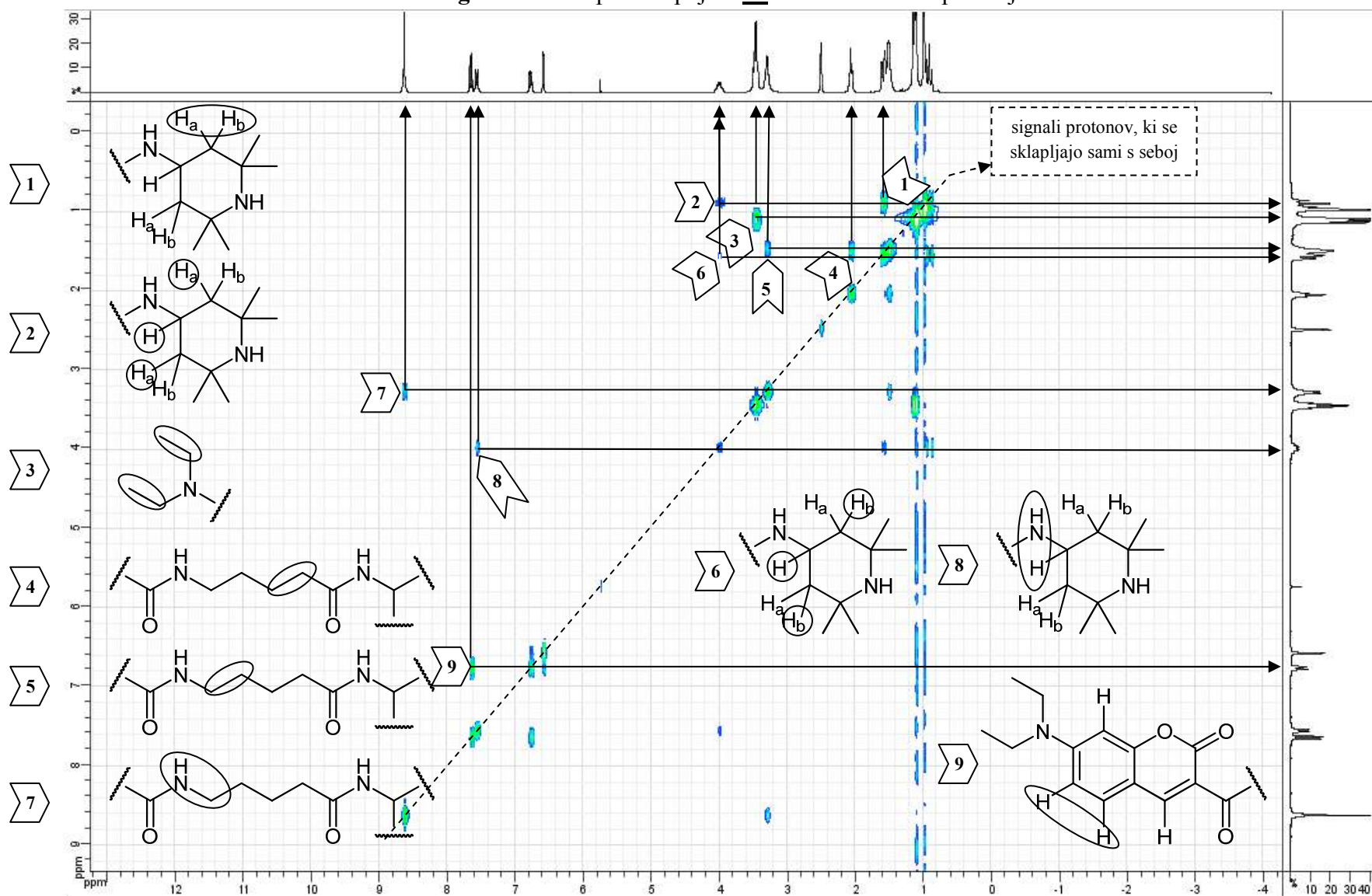
30. H. Fakova; M. Pour; J. Kunes; P. Senel. Carbonylative lactonization via carbonyl oxygen attack: a short and selective total synthesis of uncinine and its analogues. *Tetrahedron Letters*. **2005**, 46 (47), 8137-8140
31. S. Dutta; Kim Suk-Kyung; D. B. Patel; Kim Tae-Jeong; Chang Yongmin. Some new DTPA-N,N"-bis(amides) functionalized by alkyl carboxylates: Synthesis, complexation and stability properties. *Polyhedron*. **2007**, 26 (14), 3799-3809.
32. A. Nilsen; R. Braslau. Nitroxide Decomposition: Implications toward Nitroxide Design for Applications in Living Free-Radical Polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. **2006**, 44, 697-717
33. C. Bueno; L. Mikelsons; L. Maretti; J. C. Scaiano; A. Aspée. Photophysical Properties of the Prefluorescent Nitroxide Probes QT and C₃₄₃T. *Photochemistry and Photobiology*. **2008**, 84, 1535-1542.
34. C. Aliaga; M. C. Rezende; C. Tirapegui. A new dual probe for hydrogen abstraction. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 6025-6028.
35. C. Aliaga; J. M. Juárez-Ruiz; J. C. Scaiano; A. Aspée. Hydrogen-Transfer Reactions from Phenols to TEMPO Prefluorescent Probes in Micellar Systems. *Organic Letters*. **2008**, 10 (11), 2147-2150.
36. C. Coenjarts; O. García; L. Llauger; J. Palfreyman; A. L. Vinette; J. C. Scaiano. Mapping Photogenerated Radicals in Thin Polymer Films: fluorescence Imaging Using a Prefluorescent Radical Probe. *Journal of the American Chemical Society*. **2003**, 125, 620-621
37. S. Robert; C. Bertolla; B. Masereel; J. M. Dogné; L. Pochet. Novel -Carboxamide-coumarins as Potent and Selective FXIIa Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 51 (11), 3077-3080.
38. B. S. Creaven; D. A. Egan; K. Kavanagh; M. McCann; A. Noble; B. Thati; M. Walsh. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylatosilver(I) complexes. *Inorganica Chimica Acta*. **2006**, 359, 3976-3984.
39. A. Hafner; M. Hrast; S. Pečar; J. Mravljak. Microwave-assisted synthesis of amphiphilic probes. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 564-566.
40. J. Mravljak; S. Pečar. A new glucosamine-containing amphiphilic spin probe. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 567-569.

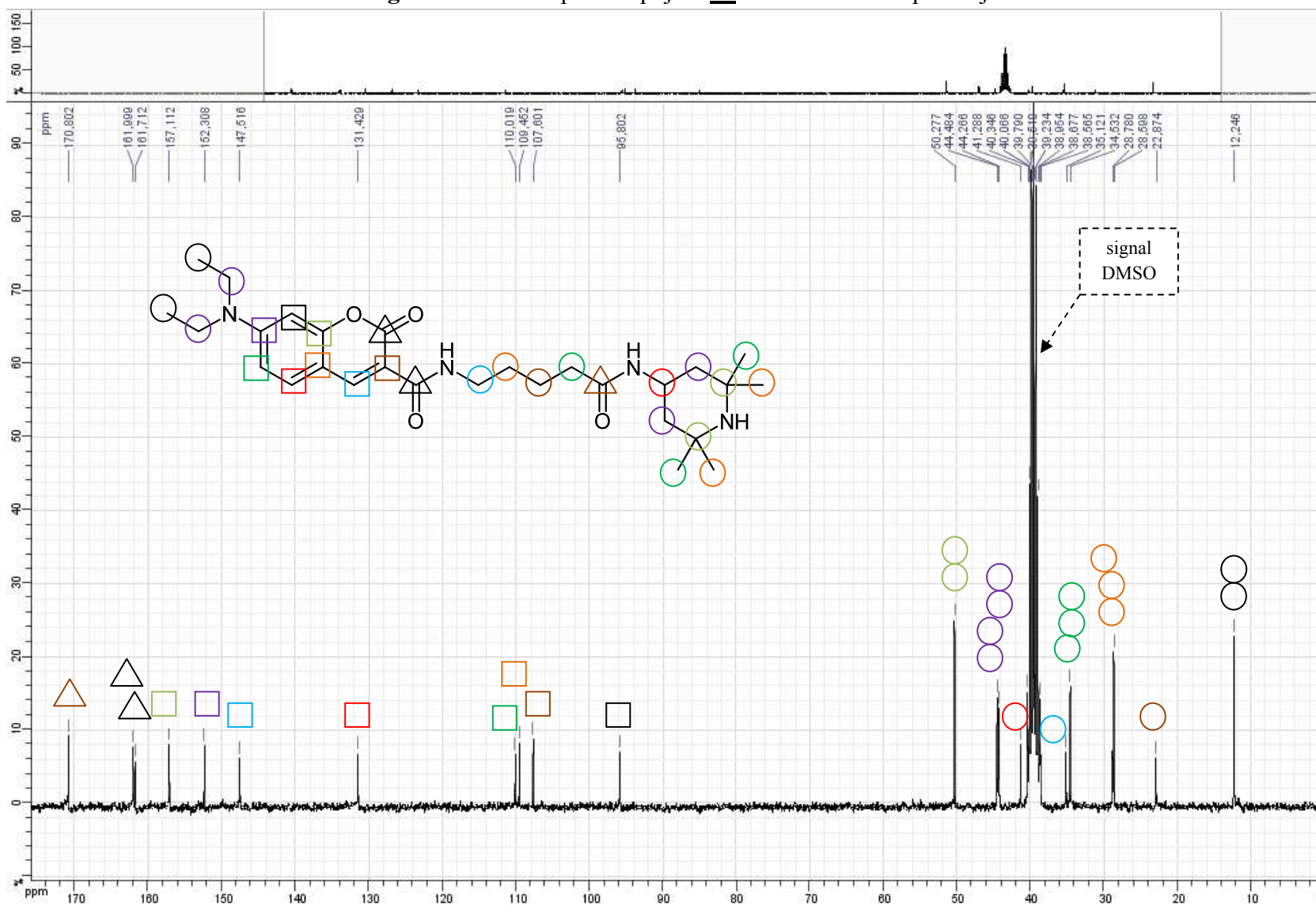
41. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. (*J. R. Lakowicz*; © 2006, 1999, 1983 Springer Science+Business Media, LLC)
42. ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE: A Practitioner's Toolkit (Edited by *M. Brustolon, E. Giamello*; Copyright © 2009 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved)
43. Free Nitroxyl Radicals (*E.G. Rozantsev*, Translated from Russian by *B. J. Hazzard*, Edited by *H. Ulrich*; Plenum Press, New York-London, 1970)
44. SPIN LABELING: Theory and Applications (Edited by *L. J. Berliner*; Molecular Biology Series, Vol 1; ACADEMIC PRESS, New York, San Francisco, London, 1976)
45. Fluorescence Spectroscopy in Biology: Advanced Methods and their Applications to Membranes, Proteins, DNA, and Cells (volume edited by *M. Hof, R. Hutterer, V. Fidler*; series edited by *O. S. Wolfbeis*; Springer Series on Fluorescence: Methods and Applications, Volume 3; © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005)

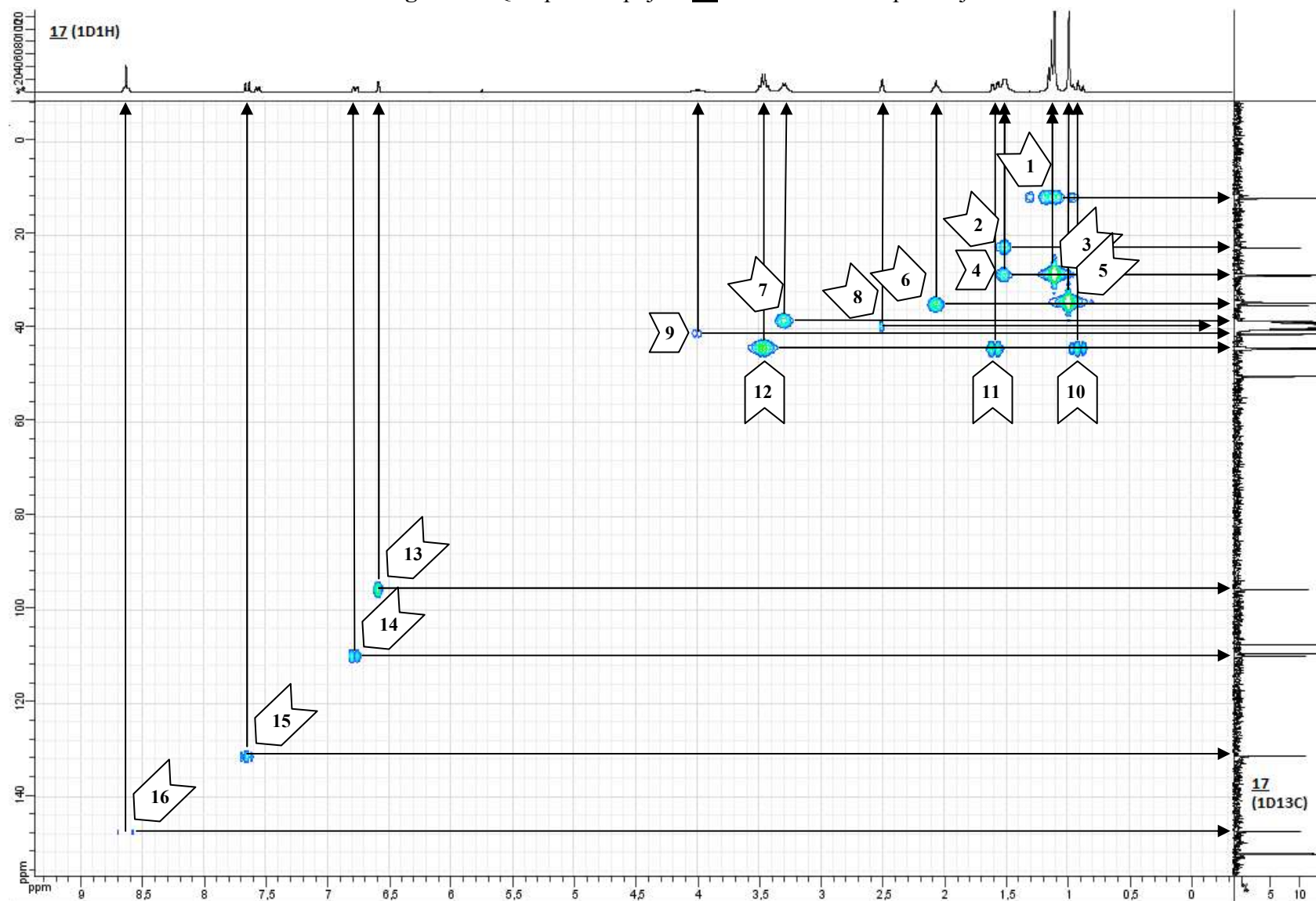
8. PRILOGE

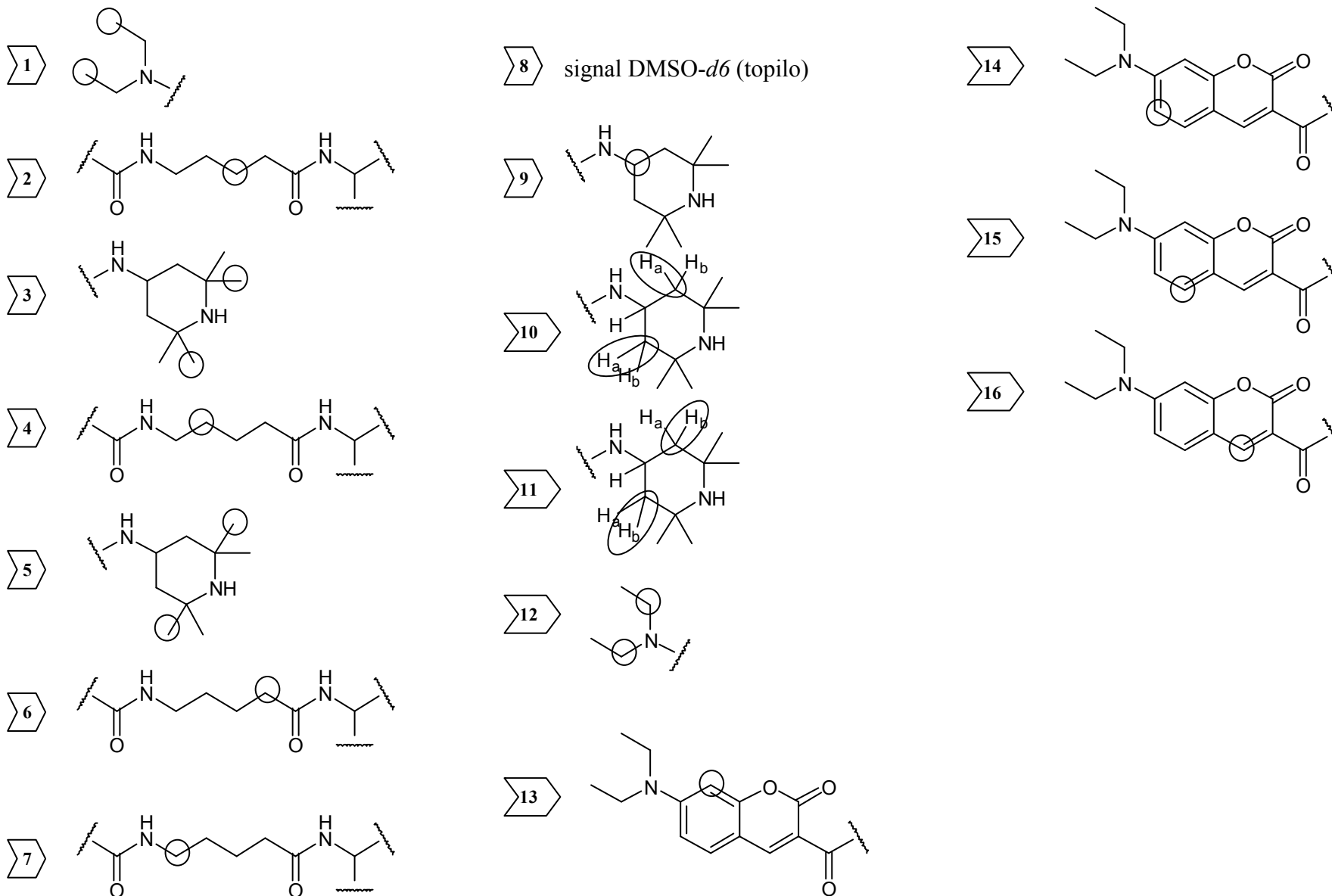
- **Priloga 1:** ^1H -NMR spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija
- **Priloga 2:** COSY spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija
- **Priloga 3:** ^{13}C -NMR spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija
- **Priloga 4:** HSQC spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija
- **Priloga 5:** Sintetizirane spojine – strukturne formule in osnovni podatki iz programa ChemBioDraw Ultra

Priloga 1: $^1\text{H-NMR}$ spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija

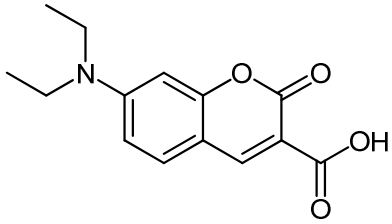
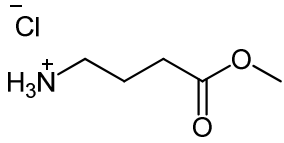
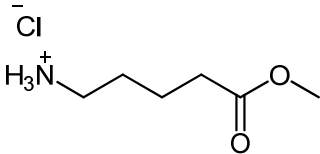
Priloga 2: COSY spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija

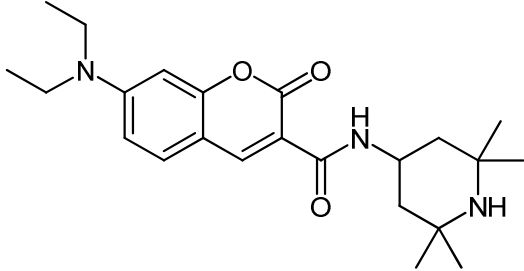
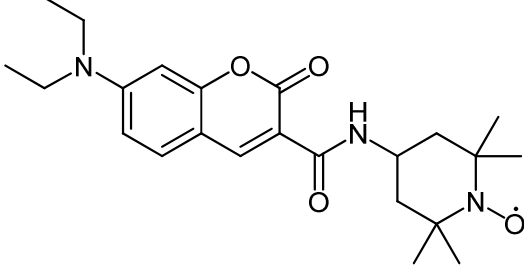
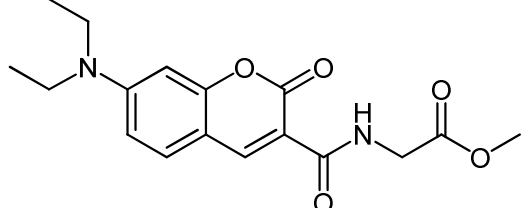
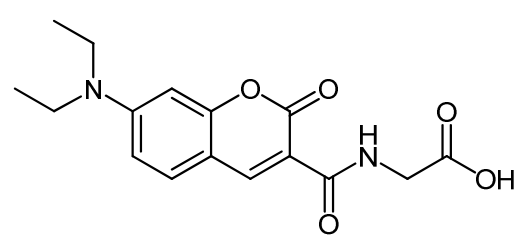
Priloga 3: ^{13}C -NMR spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija

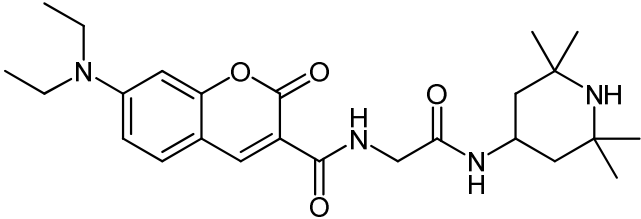
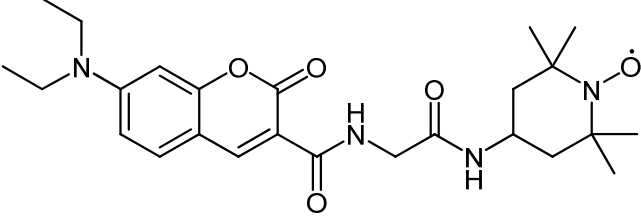
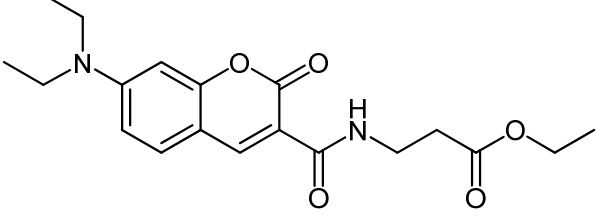
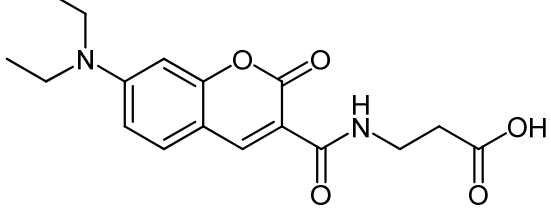
Priloga 4: HSQC spekter spojine **17** v DMSO in interpretacija

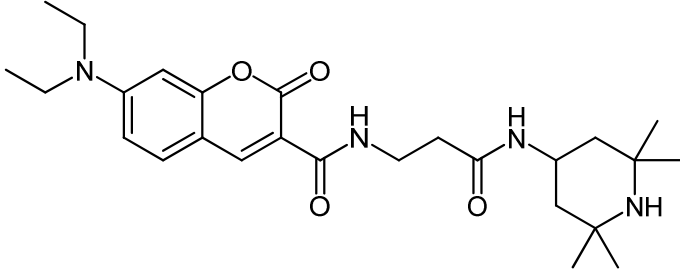
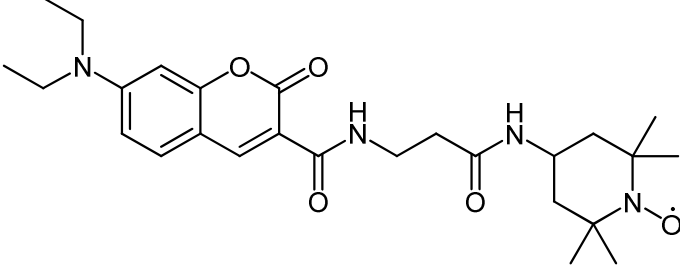
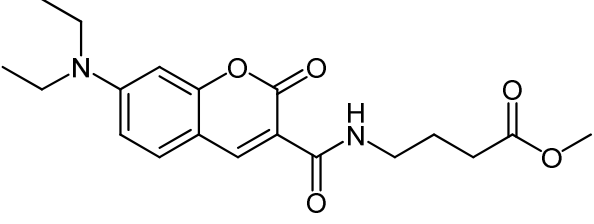
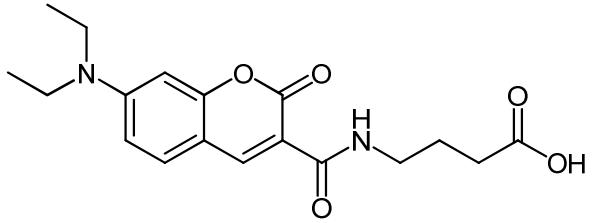
Interpretacija HSQC spektra spojine **17** v DMSO

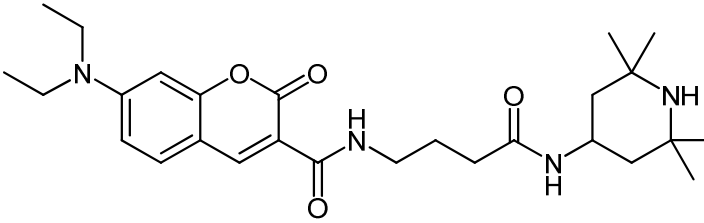
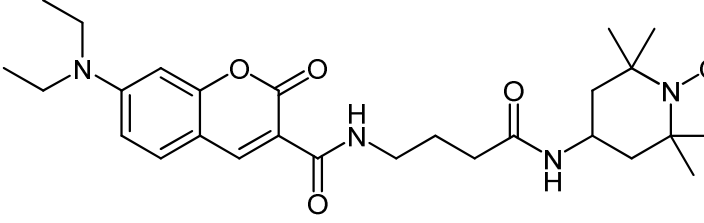
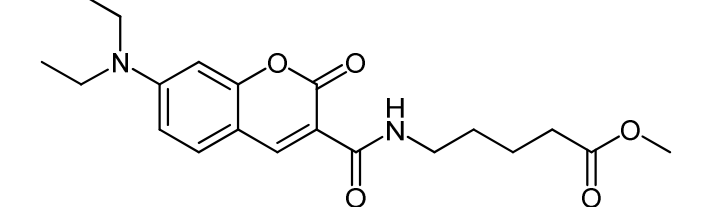
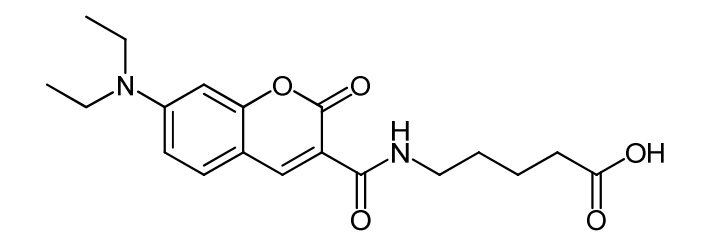
Priloga 5: Sintetizirane spojine – strukturne formule in osnovni podatki iz programa ChemBioDraw Ultra

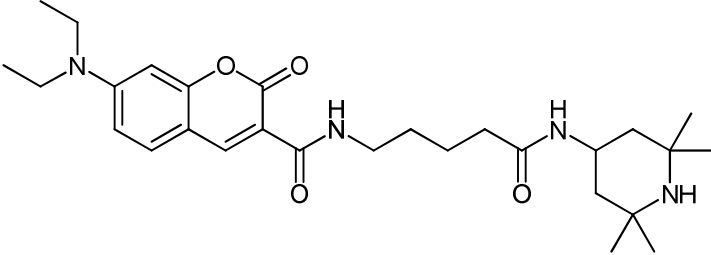
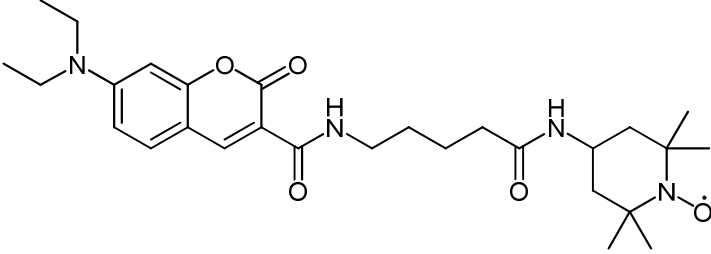
Oznaka spojine	Strukturna formula	Podatki iz programa ChemBioDraw Ultra
<u>B</u>		Ime: 7-(dietilamino)-2-okso-2H-kromen-3-karbonska kislina Molekulska formula: C ₁₄ H ₁₅ NO ₄ Natančna masa: 261,10 g/mol Molska masa: 261,27 g/mol m/z: 261,10 (100,0%), 262,10 (15,7%), 263,11 (1,1%) Elementna analiza: C, 64.36 %; H, 5.79 %; N, 5.36%; O, 24.49 %
<u>C</u>		Ime: 4-metoksi-4-oksobutan-1-amonijev klorid Molekulska formula: C ₅ H ₁₂ ClNO ₂ Natančna masa: 153,06 g/mol Molska masa: 153,61 g/mol m/z: 153,06 (100,0%), 155,05 (32,0%), 154,06 (5,6%), 156,06 (1,8%) Elementna analiza: C, 39.10 %; H, 7.87 %; Cl, 23.08 %; N, 9.12 %; O, 20.83 %
<u>D</u>		Ime: 5-metoksi-5-oksopentan-1-amonijev klorid Molekulska formula: C ₆ H ₁₄ ClNO ₂ Natančna masa: 167,07 g/mol Molska masa: 167,63 g/mol m/z: 167,07 (100,0%), 169,07 (32,0%), 168,07 (6,9%), 170,07 (2,3%) Elementna analiza: C, 42.99 %; H, 8.42 %; Cl, 21.15 %; N, 8.36 %; O, 19.09 %

<u>1</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-2-okso-<i>N</i>-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid</p> <p>Molekulska formula: C₂₃H₃₃N₃O₃</p> <p>Natančna masa: 399,25 g/mol</p> <p>Molska masa: 399,53 g/mol</p> <p>m/z: 399,25 (100,0%), 400,26 (25,4%), 401,26 (3,7%), 400,25 (1,1%)</p> <p>Elementna analiza: C, 69.14 %; H, 8.33 %; N, 10.52 %; O, 12.01 %</p>
<u>2</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-<i>N</i>-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid</p> <p>Molekulska formula: C₂₃H₃₂N₃O₄</p> <p>Natančna masa: 414,24 g/mol</p> <p>Molska masa: 414,52 g/mol</p> <p>m/z: 414,24 (100,0%), 415,24 (26,1%), 416,25 (3,1%), 416,24 (1,1%)</p> <p>Elementna analiza: C, 66.64 %; H, 7.78 %; N, 10.14 %; O, 15.44 %</p>
<u>3</u>		<p>Ime: metil 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)acetat</p> <p>Molekulska formula: C₁₇H₂₀N₂O₅</p> <p>Natančna masa: 332,14 g/mol</p> <p>Molska masa: 332,35 g/mol</p> <p>m/z: 332,14 (100,0%), 333,14 (18,8%), 334,14 (2,8%)</p> <p>Elementna analiza: C, 61.44 %; H, 6.07 %; N, 8.43 %; O, 24.07 %</p>
<u>4</u>		<p>Ime: 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)ocetna kislina</p> <p>Molekulska formula: C₁₆H₁₈N₂O₅</p> <p>Natančna masa: 318,12 g/mol</p> <p>Molska masa: 318,32 g/mol</p> <p>m/z: 318,12 (100,0%), 319,12 (18,0%), 320,13 (2,5%)</p> <p>Elementna analiza: C, 60.37 %; H, 5.70 %; N, 8.80 %; O, 25.13 %</p>

5		<p>Ime: 7-(dietilamino)-2-okso-<i>N</i>-(2-okso-2-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)etil)-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid Molekulska formula: C₂₅H₃₆N₄O₄ Natančna masa: 456,27 g/mol Molska masa: 456,58 g/mol m/z: 456,27 (100,0%), 457,28 (27,6%), 458,28 (4,5%), 457,27 (1,5%) Elementna analiza: C, 65.76 %; H, 7.95 %; N, 12.27 %; O, 14.02 %</p>
6		<p>Ime: 7-(dietilamino)-<i>N</i>-(2-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-2-oksoetil)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid Molekulska formula: C₂₅H₃₅N₄O₅[•] Natančna masa: 471,26 g/mol Molska masa: 471,57 g/mol m/z: 471,26 (100,0%), 472,26 (28,7%), 473,27 (3,7%), 473,26 (1,4%) Elementna analiza: C, 63.67 %; H, 7.48 %; N, 11.88 %; O, 16.96 %</p>
7		<p>Ime: etil 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)propanoat Molekulska formula: C₁₉H₂₄N₂O₅ Natančna masa: 360,17 g/mol Molska masa: 360,40 g/mol m/z: 360,17 (100,0%), 361,17 (21,8%), 362,18 (2,1%), 362,17 (1,2%) Elementna analiza: C, 63.32 %; H, 6.71 %; N, 7.77 %; O, 22.20 %</p>
8		<p>Ime: 3-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)propanojska kislina Molekulska formula: C₁₇H₂₀N₂O₅ Natančna masa: 332,14 g/mol Molska masa: 332,35 g/mol m/z: 332,14 (100,0%), 333,14 (18,8%), 334,14 (2,8%) Elementna analiza: C, 61.44 %; H, 6.07 %; N, 8.43 %; O, 24.07 %</p>

<u>9</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-2-okso-<i>N</i>-(3-okso-3-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)propil)-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid</p> <p>Molekulska formula: C₂₆H₃₈N₄O₄</p> <p>Natančna masa: 470,29 g/mol</p> <p>Molska masa: 470,60 g/mol</p> <p>m/z: 470,29 (100,0%), 471,29 (29,8%), 472,30 (4,0%), 472,29 (1,2%)</p> <p>Elementna analiza: C, 66.36 %; H, 8.14 %; N, 11.91 %; O, 13.60 %</p>
<u>10</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-<i>N</i>-(3-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-3-oksopropil)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid</p> <p>Molekulska formula: C₂₆H₃₇N₄O₅</p> <p>Natančna masa: 485,28 g/mol</p> <p>Molska masa: 485,60 g/mol</p> <p>m/z: 485,28 (100,0%), 486,28 (28,7%), 487,28 (5,3%), 486,27 (1,5%)</p> <p>Elementna analiza: C, 64.31 %; H, 7.68 %; N, 11.54 %; O, 16.47 %</p>
<u>11</u>		<p>Ime: metil 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)butanoat</p> <p>Molekulska formula: C₁₉H₂₄N₂O₅</p> <p>Natančna masa: 360,17 g/mol</p> <p>Molska masa: 360,40 g/mol</p> <p>m/z: 360,17 (100,0%), 361,17 (21,8%), 362,18 (2,1%), 362,17 (1,2%)</p> <p>Elementna analiza: C, 63.32 %; H, 6.71 %; N, 7.77 %; O, 22.20 %</p>
<u>12</u>		<p>Ime: 4-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)butanojska kislina</p> <p>Molekulska formula: C₁₈H₂₂N₂O₅</p> <p>Natančna masa: 346,15 g/mol</p> <p>Molska masa: 346,38 g/mol</p> <p>m/z: 346,15 (100,0%), 347,16 (19,9%), 348,16 (2,9%)</p> <p>Elementna analiza: C, 62.42 %; H, 6.40 %; N, 8.09 %; O, 23.10 %</p>

<u>13</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-2-okso-<i>N</i>-(4-okso-4-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)butil)-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid Molekulska formula: C₂₇H₄₀N₄O₄ Natančna masa: 484,30 g/mol Molska masa: 484,63 g/mol m/z: 484,30 (100,0%), 485,31 (29,8%), 486,31 (5,5%), 485,30 (1,5%) Elementna analiza: C, 66.91 %; H, 8.32 %; N, 11.56 %; O, 13.21 %</p>
<u>14</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-<i>N</i>-(4-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-4-oksobutil)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid Molekulska formula: C₂₇H₃₉N₄O₅[•] Natančna masa: 499,29 g/mol Molska masa: 499,62 g/mol m/z: 499,29 (100,0%), 500,30 (29,8%), 501,30 (5,3%), 500,29 (1,5%) Elementna analiza: C, 64.91 %; H, 7.87 %; N, 11.21 %; O, 16.01 %</p>
<u>15</u>		<p>Ime: metil 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)pentanoat Molekulska formula: C₂₀H₂₆N₂O₅ Natančna masa: 374,18 g/mol Molska masa: 374,43 g/mol m/z: 374,18 (100,0%), 375,19 (22,1%), 376,19 (3,4%) Elementna analiza: C, 64.15 %; H, 7.00 %; N, 7.48 %; O, 21.36 %</p>
<u>16</u>		<p>Ime: 5-(7-(dietilamino)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamido)pentanojska kislina Molekulska formula: C₁₉H₂₄N₂O₅ Natančna masa: 360,17 g/mol Molska masa: 360,40 g/mol m/z: 360,17 (100,0%), 361,17 (21,8%), 362,18 (2,1%), 362,17 (1,2%) Elementna analiza: C, 63.32 %; H, 6.71 %; N, 7.77 %; O, 22.20 %</p>

<u>17</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-2-okso-<i>N</i>-(5-okso-5-((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)pentil)-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid</p> <p>Molekulska formula: C₂₈H₄₂N₄O₄</p> <p>Natančna masa: 498,32 g/mol</p> <p>Molska masa: 498,66 g/mol</p> <p>m/z: 498,32 (100,0%), 499,32 (31,9%), 500,33 (4,6%), 500,32 (1,3%)</p> <p>Elementna analiza: C, 67.44 %; H, 8.49 %; N, 11.24 %; O, 12.83 %</p>
<u>18</u>		<p>Ime: 7-(dietilamino)-<i>N</i>-(5-(1-oksil-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)amino)-5-oksopentil)-2-okso-2<i>H</i>-kromen-3-karboksamid</p> <p>Molekulska formula: C₂₈H₄₁N₄O₅</p> <p>Natančna masa: 513,31 g/mol</p> <p>Molska masa: 513,65 g/mol</p> <p>m/z: 513,31 (100,0%), 514,31 (30,9%), 515,31 (5,9%), 514,30 (1,5%)</p> <p>Elementna analiza: C, 65.47 %; H, 8.05 %; N, 10.91 %; O, 15.57 %</p>

Filename: Diplomska naloga (Tadej OJSTERŠEK)6
Directory: C:\Users\Tadej\Desktop\Diplomska Naloga - Janez poprava
Template: C:\Users\Tadej\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Norma
l.dotm
Title: Tadej Ojsteršek Sinteza dvojnih fluorescenčno-
spinskih označevalcev kumarinskega tipa
Subject:
Author: Tadej
Keywords:
Comments:
Creation Date: 30.3.2011 19:49:00
Change Number: 11
Last Saved On: 30.3.2011 20:17:00
Last Saved By: Tadej
Total Editing Time: 15 Minutes
Last Printed On: 30.3.2011 20:21:00
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 126
Number of Words: 33.638 (approx.)
Number of Characters: 191.739 (approx.)