

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA OKOREN

**SINTEZA 2-AMINOIMIDAZOLSKIH DERIVATOV NEVROTOKSINA
KLATRODINA**

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2011

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



PETRA OKOREN

**SINTEZA 2-AMINOIMIDAZOLSKIH DERIVATOV NEVROTOKSINA
KLATRODINA**

**SYNTHESIS OF 2-AMINOIMIDAZOLE DERIVATIVES OF THE
NEUROTOXIN CLATHRODIN**

Ljubljana, 2011

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za strokovno pomoč, nasvete in vzpodbudo pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim s Katedre za farmacevtsko kemijo za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela, še posebej somentorju asist. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. in ge. Damijani Zalar za vso izkazano podporo, čas in vložen trud. Posebno zahvalo pa namenjam družini in prijateljem, ki so mi tekom študija ves čas stali ob strani, me podpirali in verjeli vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag.farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag.farm.

VSEBINA

POVZETEK	iii
ABSTRACT	iv
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1. UVOD	1
1.1. ALKALOIDI	2
1.1.1. Delitev alkaloidov	2
1.1.1.1. Pravi alkaloidi.....	2
1.1.1.2. Protoalkaloidi	3
1.1.1.3. Psevdoalkaloidi.....	3
1.1.2. Vloga alkaloidov v naravi	4
1.1.3. Citotoksičnost alkaloidov	5
1.2. RAZRED MORSKIH ALKALOIDOV: BROMOPIROLI.....	7
1.3. 2-AMINOIMIDAZOLSKI ALKALOIDI MORSKIH SPUŽEV	9
1.4. KLATRODIN.....	9
1.4.1 Zaviralci natrijevih kanalov.....	10
1.5. METODE ZA TVORBO 2-AMINOIMIDAZOLA IN NJEGOVO DERIVATIZACIJO	11
1.5.1. Reakcije kondenzacije	11
1.5.2. Substitucije 2-aminoimidazola na mestu C-4 ali amino skupini	13
1.5.3. Neposreden vnos NH ₂ na mesto 2 v imidazolu	14
1.5.4. Sinteza substituiranega 2-aminoimidazola pripravljenega iz 2-aminopirimidina in α-bromoketonov	15
1.5.5. Heterociklične reakcije aromatske substitucije	16
1.5.6. Uporaba mikrovalov pri sintezi 2-amino-1 <i>H</i> -imidazola	17
2. NAČRT ZA DELO	19
2.1. REAKCIJSKE SCHEME.....	20
3. MATERIALI IN METODE	22
3.1. MATERIALI	22
3.2. METODE	22
3.2.1. Kromatografske metode	22
3.2.2. Spektroskopske metode	23
3.2.3. Določevanje tališč	24
4. EKSPERIMENTALNI DEL	25
4.1. SINTEZA 2-HIDROKSI-2-(4-NITROFENIL)-2,3-DIHIDRO-1 <i>H</i> -IMIDAZO[1,2-α]PIRIMIDIN-4-IJEVEGA BROMIDA (1).....	25
4.2. SINTEZA 4-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-2-AMINA (2)	26
4.3. SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL-2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (3)	27
4.4. SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 2-AMINO-4-(4-AMINOFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (4)	28

4.5. SINTEZA (S)- <i>TERC</i> -BUTIL 2-AMINO-4-(4-(1-(<i>TERC</i> - BUTOKSIKARBONIL)PIROLIDIN-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1- KARBOKSILATA (5)	30
4.6. SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-(4-(1 <i>H</i> -PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO- 1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (7).....	31
4.7. SINTEZA <i>TERC</i> -BUTIL 4-(4-(1 <i>H</i> -INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO- 1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (8).....	33
4.8. SINTEZA (R)- <i>TERC</i> -BUTIL 2-AMINO-4-(4-(1-(<i>TERC</i> - BUTOKSIKARBONIL)PIROLIDIN-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1- KARBOKSILATA (6)	34
4.9. SINTEZA 4-(4-(1 <i>H</i> -INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO-1 <i>H</i> - IMIDAZOL-1-IJEVEGA KLORIDA (9).....	36
4.10. SINTEZA 4-(4-(1 <i>H</i> -PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO-1 <i>H</i> - IMIDAZOL-1-IJEVEGA KLORIDA (10).....	37
4.11. SINTEZA 2-AMINO-4-(4-(PIROLIDIN-1-2- KARBOKSAMIDO)FENIL)-1 <i>H</i> - IMIDAZOL-1-IJEVEGA KLORIDA (11).....	39
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	41
5.1. SINTEZA 2-AMINOIMIDAZOLA	41
5.2. ZAŠČITA AMINSKE SKUPINE Z BOC SKUPINO	42
5.3. REDUKCIJA NITRO SKUPINE	44
5.4. TVORBA AMIDNE VEZI.....	45
5.5. ODBRANITEV DI- <i>TERC</i> -BUTILDIKARBONATA (BOC ZAŠČITE) Z ACIDOLIZO	46
6. SKLEP	49
7. LITERATURA	50

POVZETEK

Alkaloidi so skupina kompleksnih heterocikličnih dušikovih spojin, ki imajo močno fiziološko aktivnost, običajno toksično. Nahajajo se v živih organizmih oz. so produkt živih organizmov. So posebna skupina, ki je dejavna na različnih celičnih ravneh organizmov in tako sodelujejo v bioloških procesih rastlin, živali in mikroorganizmov. V razred bromopirolnih alkaloidov spada nevrotoksin klatrodin, izoliran iz morske spužve, *Agelas clathrodes*, ki živi v morjih v okolici Floride, Bahamov in Karibov. Poznan je po svojih antiserotonergičnih in antiholinergičnih učinkih, ugotovljeno pa je tudi njegovo delovanje na natrijeve kanale.

Sintetizirali smo njegove rigidne 2-aminoimidazolske derivate v obliki soli s klorovodikovo kislino: 4-(4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid, 4-(4-(1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid in 2-amino-4-(4-(pirolidin-1-2-karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-ijev klorid. Izbrana sintezna metoda za pripravo 4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-2-amina (**2**) je ustrezna, saj je reakcija potekla že v 15 minutah v mikrovalovnem reaktorju in z visokim izkoristkom. Najprimernejša metoda za zaščitoaminske skupine spojine **2** je uporaba di-*terc*-butildikarbonata (BOC₂O). Gre za enostavno reakcijo s pomočjo katalizatorja DMAP in segrevanja, pri kateri je nastal z BOC zaščiten derivat **3**, ki smo ga nato reducirali na nitro skupini do ustreznega amina **4** s pomočjo katalitskega hidrogeniranja z uporabo katalizatorja paladija na ogljiku (Pd/C). Novo nastali amin, *terc*-butil 2-amino-4-(4-aminofenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**4**), je služil kot izhodna spojina za sintezo (*S*)-*terc*-butil 2-amino-4-(4-(1-(*terc*-butoksikarbonil)pirolidin-2-karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilata, (*R*)-*terc*-butil 2-amino-4-(4-(1-(*terc*-butoksikarbonil)pirolidin-2-karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilata, *terc*-butil 4-(4-(1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilata in *terc*-butil 4-(4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilata, in sicer tako, da smo z uporabo različnih kislin izvedli tvorbo amida na aromatskem aminu spojine **4**. Spojine **5**, **6**, **7** in **8** imajo poleg osnovnega 2-aminoimidazolnega skeleta v svoji strukturi dodano v obliki *terc*-butilnega karbamata zaščiteni aminske skupine, amidno vez in različne aromatske obrobe (pirolidin, pirol ali indol). Na koncu smo jim z acidolizo le še odstranili BOC zaščito ter tako dobili končne spojine **9**, **10** in **11**. Spojine so kromatografsko in spektroskopsko čiste. Za sintetizirane analoge klatrodina pričakujemo, da se bodo vezali na iste tarče kot klatrodin.

ABSTRACT

Alkaloids are a group of complex heterocyclic nitrogen compounds, which have a strong physiological activity, usually toxic. They are located in living organisms or are a product of living organisms. They are a special group that is active at different cellular levels of organisms and so participates in the biological processes of plants, animals and microorganisms. In the class of bromopyrrole alkaloids belongs the neurotoxin clathrodin, isolated from the sea sponge *Agelas clathrodes*, living in the seas around Florida, the Bahamas and the Caribbean. It is known for its marked antiserotonergic and anticholinergic effects and acknowledged were also its effects on sodium channels.

We synthesized its rigid 2-aminoimidazole derivates in the form of salt with chlorocarbonic acid: 4-(4-(1*H*-indol-2-carboxamido)phenyl)-2-amino-1*H*-imidazole-1 chloride, 4-(4-(1*H*-pyrrol-2-carboxamido)phenyl)-2-amino-1*H*-imidazole-1 chloride and 2-amino-4-(4-(pyrrolidyl-2-carboxamido)phenyl)-1*H*-imidazole-1 chloride. The chosen synthesis method for the preparation of 4-(4-nitrophenyl)-1*H*-imidazole-2-amine (**2**) is suitable, since the reaction ended in 15 minutes in the microwave reactor and with high efficiency. The preferred method to protect the amino group of compound **2** is the use of di-*tert*-butyl dicarbonate (BOC₂O). It is a simple reaction with the help of DMAP-catalyst and heating, in which was created with the BOC-protected derivative **3**, which was then reduced to a nitro group to the corresponding amine **4** with the help of catalytic hydrogenation using a catalyst of palladium on carbon (Pd/C). The newly created amine, *tert*-butyl 2-amino-4-(4-aminophenyl)-1*H*-imidazole-1-carboxylate (**4**), served as the parent compound for the synthesis of (*S*)-*tert*-butyl 2-amino-4-(4-(1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxamido)phenyl)-1*H*-imidazole-1-carboxylate, (*R*)-*tert*-butyl 2-amino-4-(4-(1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine-2-carboxamido)phenyl)-1*H*-imidazole-1-carboxylate, *tert*-butyl 4-(4-(1*H*-pyrrole-2-carboxamido)phenyl)-2-amino-1*H*-imidazole-1-carboxylate and *tert*-butyl 4-(4-(1*H*-indol-2-carboxamido)phenyl)-2-amino-1*H*-imidazole-1-carboxylate, in such a way that we performed the formation of the amide on aromatic amine of the compound **4** using different acids. The compounds **5**, **6**, **7** and **8** have in addition to the basic 2-aminoimidazol skeleton in its structure added a protected amine group, amide bond and different aromatic rings (pyrrolidine, pyrrol

and indol) in the form of tert-butyl carbamate. In the end we performed acidolysis only to remove the BOC-protection and thus obtained the final compounds **9**, **10** and **11**. Compounds are chromatographic and spectroscopic clean. For the synthesized analogues of clathrocin we expect that they will bind with the same target as clathrocin.

SEZNAM OKRAJŠAV

BOC	Di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
BOC-D-PRO	<i>terc</i> -butoksikarbonil-D-prolin
BOC-L-PRO	<i>terc</i> -butoksikarbonil-L-prolin
CLA	klatrodin
DBS	dibromoskeptrin
d	dublet
DKM	diklorometan
DMAP	4-(<i>N, N</i> -dimetilamino)piridin
DMSO – d ₆	devteriran dimetil sulfoksid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - deoksiribonukleinska kislina
ESI	<i>electrospray ionization</i> – ionizacija z elektro-razprševanjem
Et ₃ N	trietilamin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> - visokoločljivostna tekočinska kromatografija
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti
IR	infrardeča spektroskopija
LSD	dietilamid lizergične kisline
m	multiplet
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
MW	mikrovalovi
NMM	N-metilmorfolin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
q	kvartet
R _f	retencijski faktor
s	singlet
ST _x	saksitoksin

TBTU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat
TFA	trifluoroacetna kislina
THF	tertahidrofuran
TLC	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
t	triplet

1. UVOD

Mnoge rastline so že stoletja ali celo tisočletja nazaj uporabljali za različne namene, kot so zdravljenje (sredstva za bruhanje, sredstva proti kašlju, pomirjevala, sredstva za zdravljenje kačjih ugrizov in proti vročini), obramba, kozmetika, pridobivanje hrane in toksinov (kot sredstva za zastrupitve). Odkrili so, da številne rastline vsebujejo alkaloidne, eno izmed najbolj raznolikih skupin sekundarnih presnovkov, ki jih najdemo v živih organizmih. Sprva so jih odkrili v rastlinah, kasneje pa tudi pri živalih in mikroorganizmih.^[1] Izraz alkaloid je leta 1819 prvi uporabil Carl F.W. Meissner in izhaja iz korena latinske besede alkali, (ki po drugi strani prihaja iz arabske *al qualja* - »pepel rastlin«).

Nemški kemik Friedrich Sertürner je bil leta 1804 prvi, ki je izoliral morfij iz opija, ki je eden od najbolj poznanih in raziskanih alkaloidov. Pomembno vlogo pri raziskovanju alkaloidov v kemiji sta imela tudi Pierre Joseph Pelletier in Joseph Bienaime Caventou, ki sta odkrila ksantin (leta 1817), strihnin (leta 1818), atropin (leta 1819), kinin (leta 1820), kofein (leta 1820), nikotin (leta 1828) in kokain (leta 1860). Prvo totalno sintezo alkaloida koniina (prvotno so ga izolirali iz rastline kukut) so izvedli leta 1886. Tako je bilo do leta 2008 prepoznanih več kot 12 000 alkaloidov.^[2]

Alkaloidi so skupina kompleksnih heterocikličnih dušikovih spojin, ki imajo močno farmakološko aktivnost, ta pa je običajno toksična. Dejavniki so na različnih celičnih ravneh organizmov in tako sodelujejo v bioloških procesih rastlin, živali in mikroorganizmov. Alkaloidi so slabo topni v vodi, topni pa so v etanolu, benzenu, etru in kloroformu. Večina alkaloidov ima izrazito grenak okus. Brez alkaloidov ne bi dosegli dosežkov v boju proti malariji, levkemiji, raku in celo pri Parkinsonovi bolezni. Kljub toksičnosti nekatere alkaloidne v zelo majhnih količinah zaradi svojih fizioloških in farmakoloških lastnosti uporabljajo kot zdravilne učinkovine v zdravilih. Številni alkaloidi sodijo tudi med droge (opij, kokain, hašiš, meskalin, LSD - dietilamid lizergične kisline) in delujejo na živčni sistem.^[2,3]

1.1. ALKALOIDI

1.1.1. Delitev alkaloidov

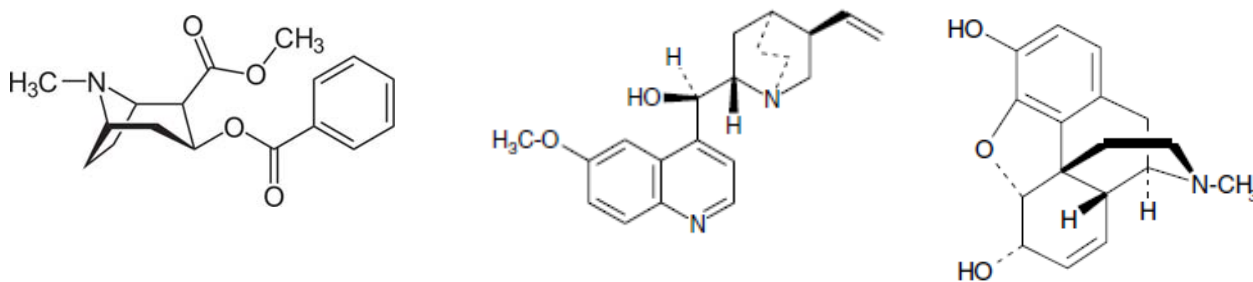
Winterstein and Tier sta predlagala, da lahko alkaloidne razvrstimo glede na njihove značilnosti:

1. glede na toksičnost (večja ali manjša toksičnost),
2. po alkalnih lastnosti spojin (nevtralne ali šibko alkalne molekule, kot je na primer ricin),
3. glede na pozicijo dušika kot glavno sestavino alkaloida,
4. glede na sintezo iz aminokislin ali njihovih neposrednih derivatov,
5. glede na razširjenost v naravi.

Alkaloidne lahko razvrstimo tudi na podlagi bioloških učinkov, kemijske strukture in biosinteznih poti. Obstajajo tri glavne vrste alkaloidov: pravi alkaloidi, protoalkaloidi in psevdoalkaloidi (preglednica I).^[3,4]

1.1.1.1. Pravi alkaloidi

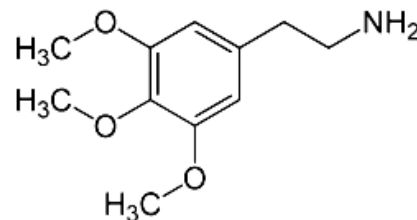
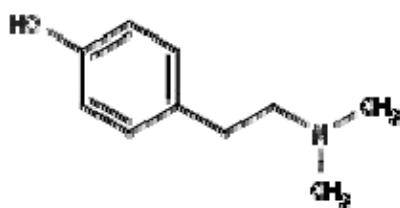
Pravi alkaloidi izvirajo iz aminokislin in vsebujejo heterociklični obroč z dušikom. Tudi v majhnih odmerkih so visoko reaktivne snovi z biološko aktivnostjo. Vsi pravi alkaloidi so grenkega okusa in se pojavljajo kot bela trdna snov, z izjemo nikotina, ki je rjava tekočina. Večina od njih je opredeljenih kot kristalne snovi, ki lahko s kislinami tvorijo soli. Pravi alkaloidi se lahko pojavijo v rastlinah v prosti obliki, v obliki soli in kot dušikovi oksidi. Primarni predhodniki pravih alkaloidov so aminokisliline; L-oritin, L-lizin, L-fenilalanin/L-tirozin, L-triptofan in L-histidin. Primeri pravih alkaloidov so kokain, kinin in morfin.



Slika 1: Strukturne formule kokaina, kinina in morfina.^[3]

1.1.1.2. Protoalkaloidi

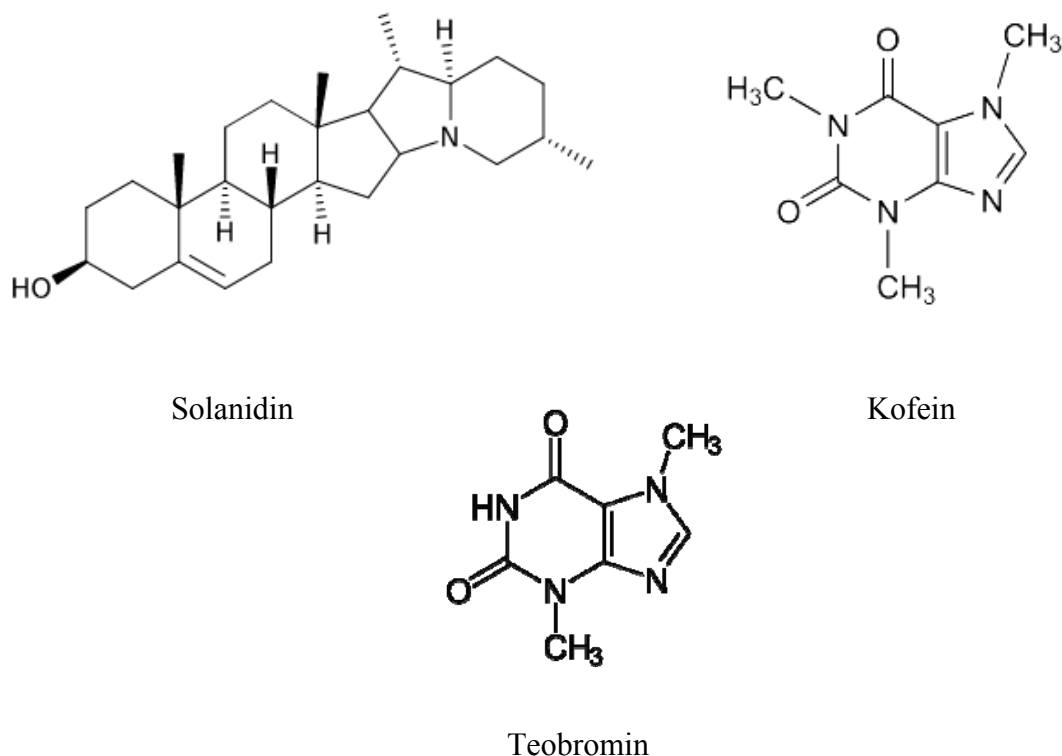
Protoalkaloidi so spojine, ki v živih organizmih nastajajo iz aminokislin, vendar dušik ni del heterocikla. Take vrste alkaloidov vsebujejo sestavine, ki nastajajo iz L-tirozina in L-triptofana. Protoalkaloidi imajo v strukturi obročne sisteme brez dušika in so strukturno enostavni alkaloidi. Predstavljajo manjši del alkaloidov. Primera sta hordenin in meskalin.^[3]



Slika 2: Strukturna formula hordenina^[17] in meskalina.^[18]

1.1.1.3. Psevdoalkaloidi

Psevdoalkaloidi ne izvirajo iz aminokislin, vendar nastajajo pri njihovih presnovnih poteh. Ti alkaloidi pa so lahko pridobljeni tudi iz predhodnih sestavin, ki niso aminokisljine (piruvična kislina, ferulična kislina, geranioli, saponini). Primeri psevdoalkaloidov so solanidin, kofein in teobromin.^[3]



Slika 3: Strukturne formule solanidina,^[19] kofeina^[20] in teobromina.^[21]

1.1.2. Vloga alkaloidov v naravi

Alkaloidi so snovi, ki so zelo dobro poznane po svojih bioloških učinkih že od samih začetkov svetovne civilizacije. Uporabljali so jih v šamanizmu kot tradicionalno zeliščno zdravilo za zdravljenje bolezni, ter v orožjih, uporabljeni kot toksini, ključni za lov ali vojno. Označimo jih lahko kot ene najbolj uporabnih in tudi najbolj nevarnih proizvodov iz narave, ki jih je mogoče izolirati in prečistiti.^[3,4]

Alkaloide proizvajajo različni organizmi, predvsem višje razvite rastline. Vsebnost alkaloidov v rastlini znaša nekaj odstotkov od celotne sestave rastline. Odvisno od vrste rastlin je najvišjo koncentracijo opaziti v listih, sadju, semenu, korenu ali lubju. Različna tkiva iste rastline lahko vsebujejo različne alkaloide. Ena od glavnih nalog rastlinskih alkaloidov je obramba pred rastlinojedci ali plenilci.

Alkaloide najdemo tudi v nekaterih vrstah gliv, živalih in morskih organizmih.^[2] Nekateri alkaloidi imajo protibakterijske, protiglivične in protivirusne lastnosti, nekateri pa so visoko toksični tudi za živali in ljudi.^[4]

1.1.3. Citotoksičnost alkaloidov

Mnogi alkaloidi so močno toksični za ljudi in živali. Večina smrtno nevarnih alkaloidov sodi v skupino nevrotoksinov, ostali alkaloidi pa imajo citotoksične lastnosti. Do citotoksičnih učinkov lahko pride, kadar so poškodovane celične membrane ali če spojine interagirajo s komponentami citoskeleta.

Med splošno aktivnimi alkaloidi razlikujemo med alkaloidi, ki so sposobni tvoriti kovalentne vezi z beljakovinami in nukleinskimi kislinami in tiste, ki modulirajo konformacijo proteinov in nukleinskih kislin. Kovalentne spremembe nastanejo, ko določene funkcionalne skupine interagirajo z beljakovinami oz. nukleinskimi kislinami:

- reakcija aldehydne skupine z amino in tiolno skupino,
- reakcija eksociklične metilenske skupine s tiolno skupino,
- reakcija epoksidov z beljakovinami in DNA.

Nekovalentne vezi pa nastanejo, ko določene skupine interagirajo s proteini preko:

- ionskih vezi (alkaloidi s fenolno hidroksilno skupino, ki lahko disociirajo na fenolatne ione),
- vodikovih vezi (alkaloidi s hidroksilno skupino, karbonil ali keto skupino),
- van der Waalsovih in hidrofobnih interakcij (lipofilne spojine).

Tudi DNA je lahko tarča alkaloidov. Planarni in lipofilni alkaloidi so spojine, ki se vrinejo med nukleotide v dvojni vijačnici DNA. To vpliva na replikacijo DNA, popravljanje DNA in na delovanje topoizomeraz, kar običajno privede do celične smrti z apoptozo. Nekateri alkaloidi, kot na primer pirolizidinski alkaloidi, tvorijo kovalentne adukte z bazami DNA.

Rezultat takšne interakcije so lahko mutacije in nastanek tumorjev. Citotoksične lastnosti običajno niso specifične za živali, ampak vplivajo tudi na bakterije, glive, rastline in celo viruse. ^[4]

Preglednica I: Glavne vrste alkaloidov in njihove kemijske skupine^[3]

Vrsta alkaloida	Predhodnik spojine	Kemijska skupina alkaloidov	Izhodne spojine	Primeri alkaloidov
Pravi alkaloidi	L-ornitin	Pirolidinski alkaloidi	Pirolidin	Higrin
		Tropanski alkaloidi	Tropan	Atropin
		Pirolizidinski alkaloidi	Pirolizidin	Meteloidin
	L-lizin	Piperidinski alkaloidi	Piperidin	Piperidin
		Kinolizidinski alkaloidi	Kinolizidin	Citizin
		Indolizidinski alkaloidi	Indolizidin	Kastanospermin
	L-tirozin	Feniletilaminski alkaloidi	Feniletilamin	Adrenalin
		Tetrahydroizokinolinski alkaloidi	Benziltetrahydroizokinolin	Morfin
	L-tirozin ali L-fenilanin	Fenetil izokinolinski alkaloidi	Alkaloidi narcisovk	Likorin
	L-triptofan	Indolni alkaloidi	Indolni alkaloidi	Serotonin
			β -Kربولinski alkaloidi	Harmin
			Terpenoidni indolni alkaloidi	Sekologanin
		Kinolinski alkaloidi	Kinolin	Kinin
		Pirolindolni alkaloidi	Indol	A-johimbin
		Ergot alkaloidi	/	Ergotamin
	L-histidin	Imidazolni alkaloidi	Imidazol	Histamin

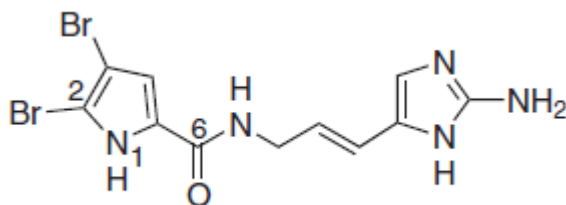
		Manzaminski alkaloidi	Ksestomanzamin	Ksestomanzamin A ali B
	L-arginin	Morski alkaloidi	β -karbolin	Tetrodotoksin
	Antranilna kislina	Kinazolinski alkaloidi	Kinazolin	Peganin
		Kinolinski alkaloidi	Kinolin	Perforin
		Akridonski alkaloidi	Akridin	Rutakridon
	Nikotinska kislina	Piridinski alkaloidi	Piridin/Pirolidin	Nikotin
Protoalkaloidi	L-tirozin	Feniletilaminski alkaloid	Feniletilamin	Hordenin
	L-triptofan	Terpenoidni indolni alkaloidi	Indol	Johimbin
	L-ornitin	Pirolizidinski alkaloidi	Pirolizidin	Stahidrin
Psevdo- alkaloidi	Acetat	Piperidinski alkaloidi	Piperidin	Konin
		Seskviterpenski alkaloid	Seskviterpen	Evonin
	Piruvična kislina	Efedrinski alkaloidi	Fenil C	Efedrin
	Ferulična kislina	Aromatski alkaloidi	Fenil	Kapsaicin
	Geranioli	Terpenoidni alkaloidi	Terpenoid	Akonitin
	Saponini	Steroidni alkaloidi	/	Tomatidin
	Adenin/Gvanin	Purinski alkaloidi	Purin	Kofein

1.2. RAZRED MORSKIH ALKALOIDOV: BROMOPIROLI

Morske spužve vsebujejo veliko spojin, ki so lahko zelo uporabne v medicini, farmacevtski industriji, kozmetični industriji in še kje. Te spojine so kemijsko raznolike in imajo vrsto bioloških aktivnosti, kot so protimikrobno delovanje in citotoksičnost terpenov (npr. za rakave celice), protiglivna aktivnost bromopirolnih alkaloidov, protivirusno delovanje derivatov aminokislin, encimsko inhibitorna aktivnost terpenoidov (acetilholinesteraza, proteinska

fosfataza I), hemaglutinacijska aktivnost lektinov ter aktivnost piridinskih alkaloidov na vegetativni živčni sistem.^[12]

Bromopirolni alkaloidi spadajo v družino morskih alkaloidov in predstavljajo zanimiv primer različnih sekundarnih presnovkov, ki jih proizvajajo morske spužve. Prvi predstavnik te skupine, ki so ga izolirali, je oroidin. Najprej iz morske spužve *Agelas oroides* leta 1971, kasneje pa so ga izolirali še iz več različnih morskih spužev. Oroidin je ključni predstavnik te družine alkaloidov, v katero spada veliko bromopirolnih alkaloidov, ki vsebujejo pirol-imidazolno strukturo in so derivati oroidinskega skeleta. Bromopirolni alkaloidi imajo pomembno vlogo z ekološkega vidika. Ugotovili so, da se Karibski greben morskih spužev rodu *Agelas* s pomočjo bromopirolnih alkaloidov lahko kemično brani pred plenilci. Bromopirolni alkaloidi pa niso pomembni le iz ekološkega vidika, ampak tudi zaradi številnih zanimivih farmakoloških učinkov.^[4,5]



Slika 4: Oroidin, ključni predstavnik bromopirolnih alkaloidov^[4]

Te alkaloide lahko razvrstimo v štiri skupine glede na njihovo kemijsko strukturo:

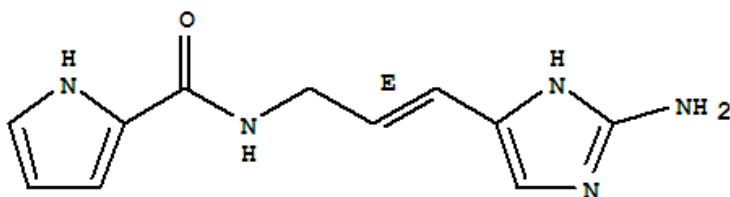
1. oroidin-linearni monomeri, katerih strukture vsebujejo osnovni oroidinski skelet brez dodatnih alkilnih ali alkilaminskih skupin,
2. policiklični derivati oroidina,
3. enostavni ali ciklizirani dimeri oroidina,
4. drugi bromopirolni alkaloidi, ki jih ni mogoče vključiti v prejšnje skupine, predvsem zato, ker nimajo celotnega pirol-imidazolnega dela.^[4]

1.3. 2-AMINOIMIDAZOLSKI ALKALOIDI MORSKIH SPUŽEV

Družina 2-aminoimidazolskih pirolnih alkaloidov predstavlja zanimive in različne sekundarne presnovke morskih spužev. Obstaja več kot sto različnih alkaloidov, ki so strukturno in biološko povezani z oroidinskimi alkaloidi. Poleg tega jih tudi delijo v derivate 1-nesubstituiranega in 1-substituiranega 2-aminoimidazola. Te molekule se nahajajo v morskih spužvah družine *Agelasidae* in se pogosto nahajajo v vodah v tropskem okolju. Imajo pomembno vlogo kot obrambni mehanizem proti plenilcem. Najpomembnejši predstavnik je klatrodin.^[8]

1.4. KLATRODIN

Nevrotoksin klatrodin sodi v razred bromopirolnih alkaloidov, in sicer v skupino oroidin-linearnih monomerov. Klatrodin je edini 2,3-debromo derivat oroidina.^[4] Izoliramo ga iz morske spužve, *Agelas clathrodes* (slika 6), ki je znana tudi pod imenom Spužva slonjega ušesa in živi na grebenu 10 metrov pod gladino oceana. Je rdečkasto oranžne barve in se nahaja na območju Floride, Bahamov in Karibov.



Slika 5: Strukturna formula klatrodina^[14]

Klatrodin je poznan po svojih antiserotonergičnih in antiholinergičnih učinkih. Poskusi so pokazali, da je klatrodin nevrotoksin, ki vpliva tudi na delovanje natrijevih kanalov.^[7]

1.4.1 Zaviralci natrijevih kanalov

Za alkaloidne spojine se je izkazalo, da imajo pomembno vlogo pri moduliranju delovanja mišičnih in živčnih membranskih receptorjev in kanalov, vključno z natrijevimi kanali, in so tako odlična farmakološka orodja za preučevanje njihove vloge. Klatrodin (CLA) in dibromoskeptrin (DBS) imata nevrotoksične učinke. Obe spojini sta za 27-40% zmanjšali povprečno maksimalno amplitudo aktivnih natrijevih kanalov v celicah, izoliranih iz simpatičnega ganglija piščančjih zarodkov.



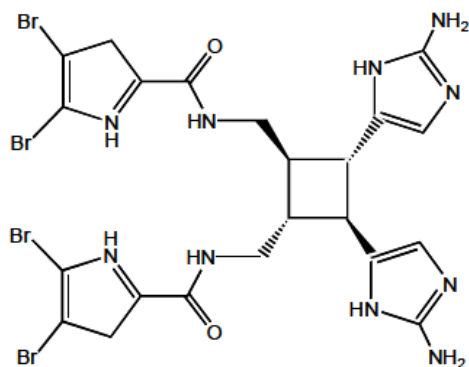
Slika 6: Morska spužva *Agelas clathrodes*^[2]

Študije so pokazale, da je DBS skoraj 90% zavrl vezavo saksitoksina (STx) na podganjih možganih, medtem ko je klatrodin inhibiral vezavo v obsegu 30%. Klatrodin in dibromoskeptrin sta nevrotoksina, ki zavirata delovanje natrijevih kanalov, in sicer tako, da se vežeta na mesto, kamor se veže STx.^[6]

Saksitoksin je nevrotoksični alkaloid, ki se kopiči predvsem v tkivu školjk. Je eden najmočnejših znanih naravnih toksinov, ki prepreči depolarizacijo nevronov preko blokade napetostno-odvisnih natrijevih kanalov, kar v končni fazi povzroči paralizo dihalnih mišic (paralitične zastrupitve s školjkami).^[16,17]

Klatrodin in dibromoskeptrin (slika 7) modulirata natrijeve kanale z različnimi mehanizmi. DBS, dimer s štirimi bromovimi atomi, zavira delovanje napetostno-odvisnih natrijevih kanalov, medtem ko je klatrodin, monomer brez bromovih atomov, usmerjen v zmanjšanje

prevodnosti ionskih kanalov. Poleg tega je bilo dokazano, da DBS moti celično homeostazo kalcija z moduliranjem kalcijevih kanalov v celicah PC12.^[6]



Slika 7: Strukturna formula dibromoskeptrina^[6]

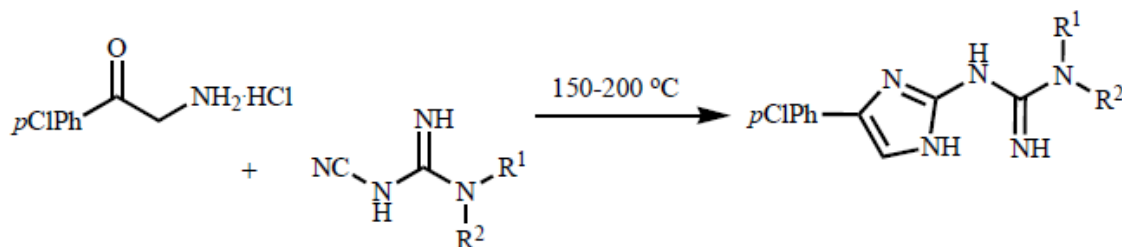
1.5. METODE ZA TVORBO 2-AMINOIMIDAZOLA IN NJEGOVO DERIVATIZACIJO

Poznamo več različnih metod za sintezo 2-aminoimidazola. Pogosto so potrebni ostri pogoji in/ali sintezno težko dostopne in nestabilne izhodne spojine. Metode za pripravo 2-aminoimidazola in njegovo derivatizacijo lahko razdelimo v štiri glavne kategorije:

1. reakcije kondenzacije,
2. substitucije 2-aminoimidazola na mestu C-4 ali amino skupini,
3. neposreden vnos NH_2 na mesto 2 v imidazolu,
4. heterociklične reakcije aromatske substitucije.

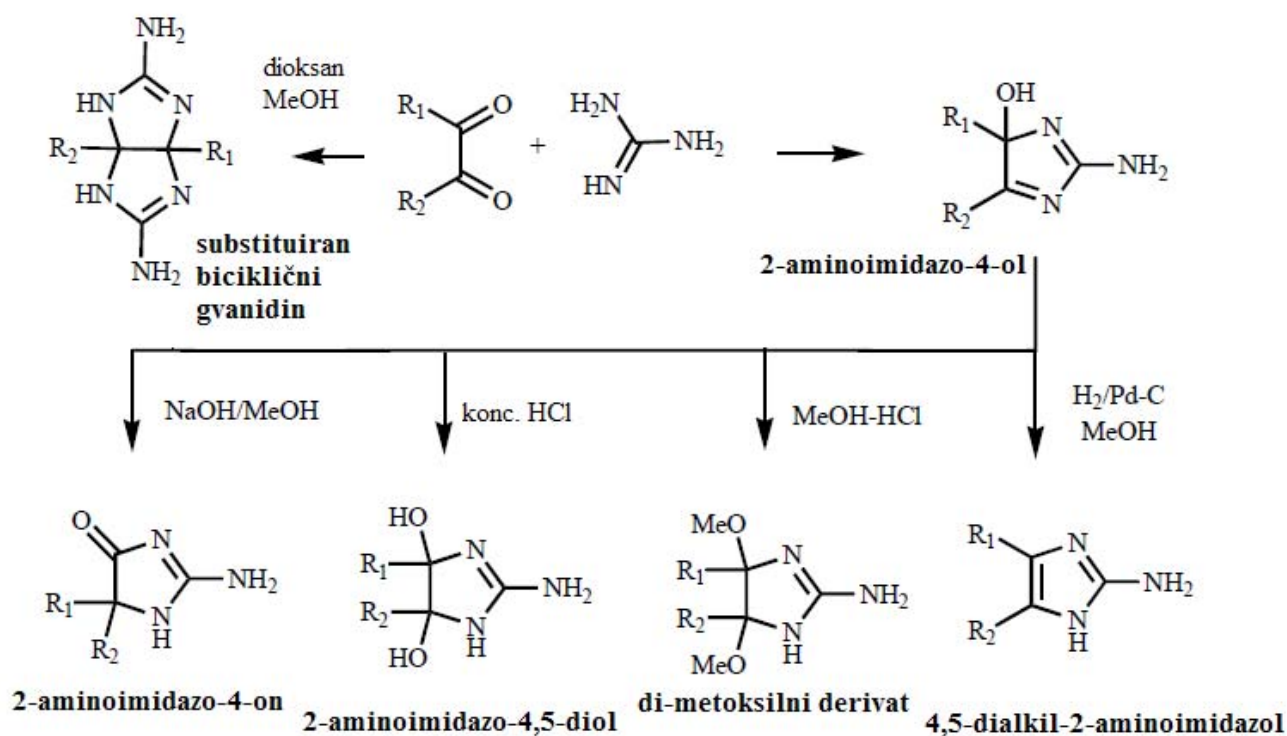
1.5.1. Reakcije kondenzacije

Najpogostejši način za pripravo 2-aminoimidazola je reakcija kondenzacije med α -amino ali α -haloketoni s cianamidom ali gvanidinskimi derivati. To strategijo sta prvič uporabila Norris in McKee, ki sta preučevala kondenzacijo med α -aminoacetofenoni in *N*-cianogvanidini (slika 8).



Slika 8: Primer kondenzacije med α -aminoacetofenoni in N-cianogvanidini^[10]

Drugi način je leta 1970 odkril Nishimura, ki je kondenziral substituirane α -diketone z gvanidini in tako dobil različne uporabne produkte. Pri reakciji med diketonom z gvanidinom v dioksanu in metanolu tako nastane substituiran biciklični gvanidin. Po drugi strani pa lahko v reakciji z diketonom in gvanidinom nastane tudi intermediat 2-aminoimidazo-4-ol. Ta intermediat se v bazičnem okolju (s pomočjo NaOH in MeOH) pretvori do 2-aminoimidazo-4-ona. Isti intermediat pa se lahko pretvori tudi v 2-aminoimidazo-4,5-diol, če ga izpostavimo vodni raztopini HCl. Poleg tega s pomočjo metanolne raztopine HCl lahko nastane tudi di-metoksilni derivat. Hidrogenoliza 2-aminoimidazo-4-ola pa nazadnje omogoča tudi nastanek 4,5-dialkil-2-aminoimidazola (slika 9).

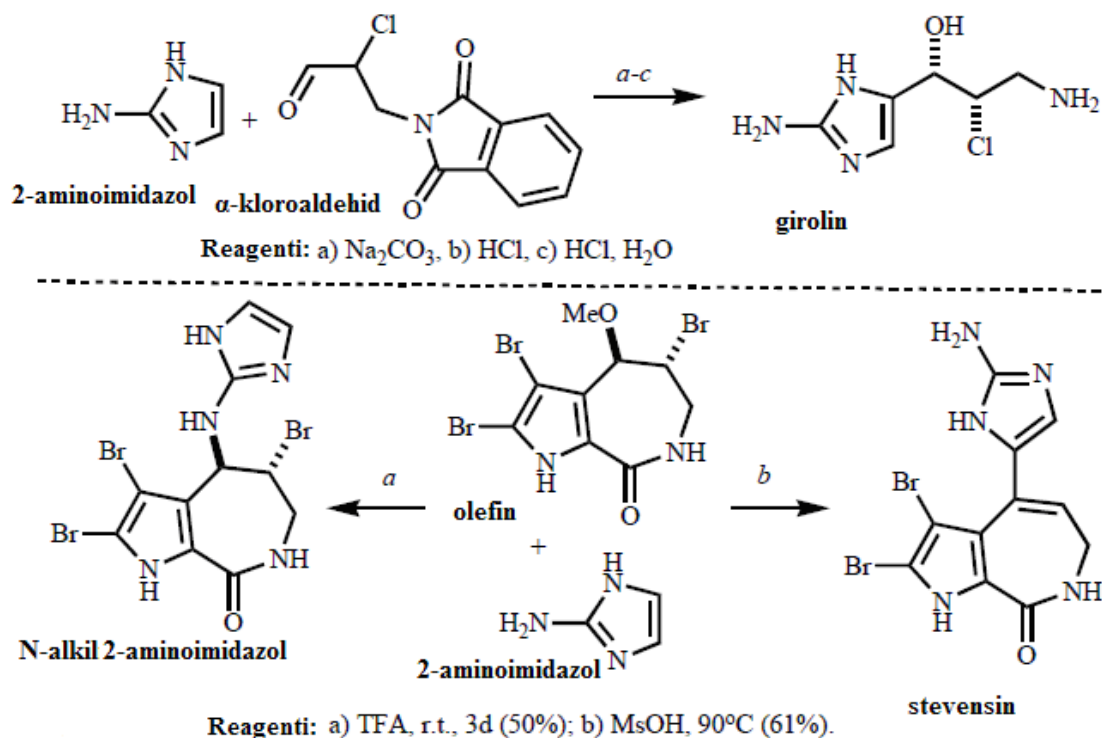


Slika 9: Kondenzacija med substituiranimi α -diketoni in gvanidini^[10]

1.5.2. Substitucije 2-aminoimidazola na mestu C-4 ali amino skupini

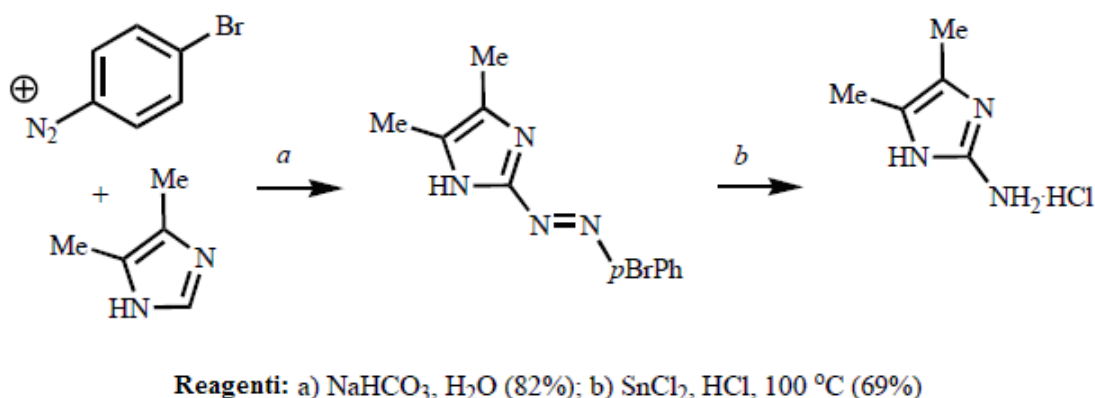
Ovisno od reakcijskih pogojev se lahko heterociklični 2-aminoimidazol substituirata na mestu C-4 ali na amski skupini na mestu 2. Pri sintezi girolina 2-aminoimidazol direktno dodajo k α -kloroaldehidu ob prisotnosti natrijevega karbonata, pri čemer pride do nukleofilnega napada na aldehyd in nastane girolin.

Pri sintezi stevensina izhajajo iz olefina, 2-aminoimidazola in metansulfonske kisline, kjer poteče substitucija na mestu 4 v 2-imidazolu, medtem ko v prisotnosti trifluoroocetne kisline poteče substitucija 2-aminske skupine 2-aminoimidazola (slika 10).

Slika 10: Substitucije 2-aminoimidazola na mestu C-4 ali amino skupini^[10]

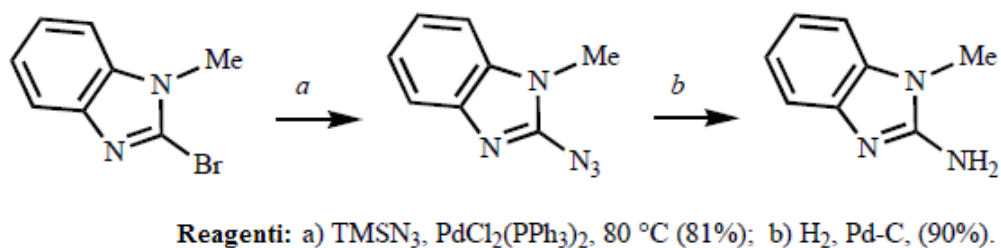
1.5.3. Neposreden vnos NH₂ na mesto 2 v imidazolu

Pri poizkusih so izhajali iz direktnega vnosa NH₂ na mesto 2. Najprej so že v letu 1925 izvedli aromatsko substitucijo med ustrezno diazonijevo soljo 4-bromo anilina in dimetilimidazolom. Nastalo arilazo spojino so reducirali s pomočjo cinkovega prahu in očetne kisline ali kositrovim kloridom ter klorovodikovo kislino do ustreznega 2-amino substituiranega imidazola (slika 11).



Slika 11: Prva metoda za neposredno uvajanje NH₂ na mesto 2 v imidazolu^[10]

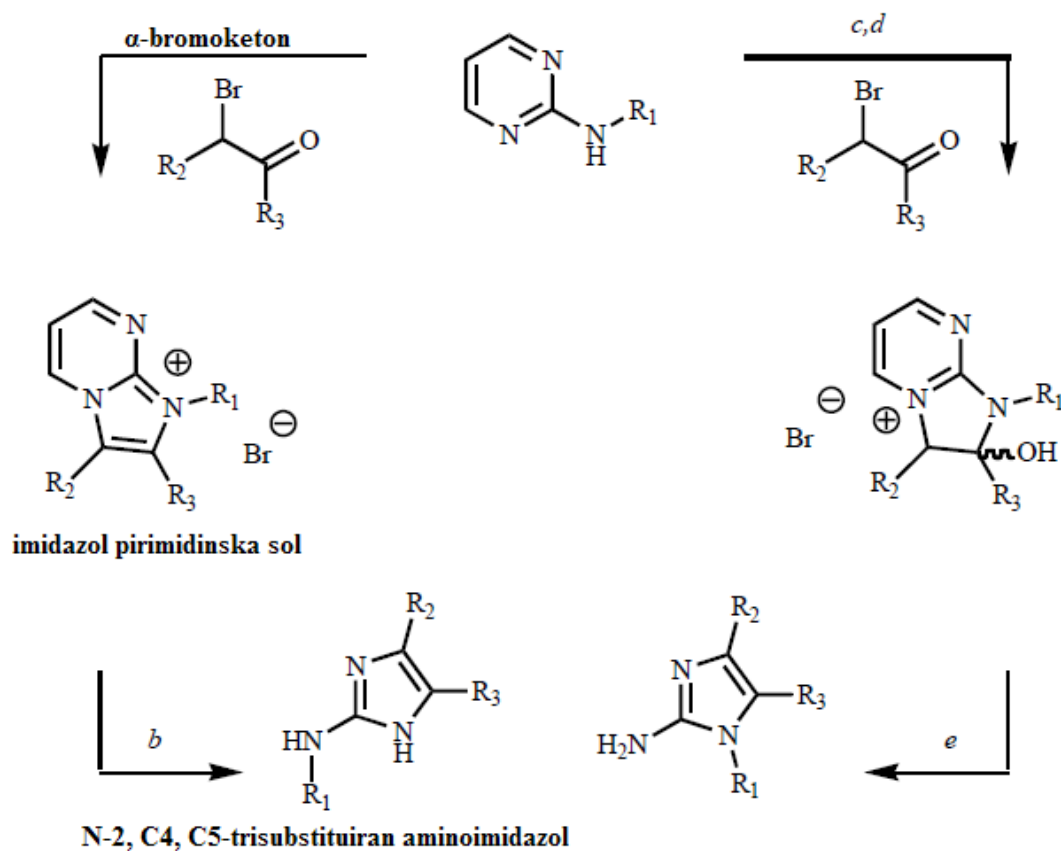
Leta 1996 pa je Ohta dokazal, da iz 2-bromo-1-metil-1*H*-benzimidazola s pomočjo ustreznega paladijevega katalizatorja in trimetilsilil azida (slika 12) ter sledečim katalitskim hidrogeniranjem nastane želen substituiran 2-aminoimidazol.



Slika 12: Druga metoda za neposredno uvajanje NH₂ na mesto 2 v imidazolu^[10]

1.5.4. Sinteza substituiranega 2-aminoimidazola pripravljenega iz 2-aminopirimidina in α -bromoketonov

Van der Eycken je poročal o kondenzaciji med α -bromoketoni in 2-aminopirimidinom pri sintezi substituiranih soli imidazopirimidina. Ta sol se lahko transaminira s hidrazinom s pomočjo mikrovalov in tako nastane 2-aminoimidazol. Takšna reakcija zagotavlja hiter dostop do N-2, C4 in C5-trisubstituiranih aminoimidazolov. Ta predlagani mehanizem reakcije nezaščitenega hidrazina ali sekundarnega amina do imidazolpirimidinske soli je adicija amina na pirimidinski obroč, ki mu sledi sigmatropna prerazporeditev do azabutadienskega intermediata (slika 13).

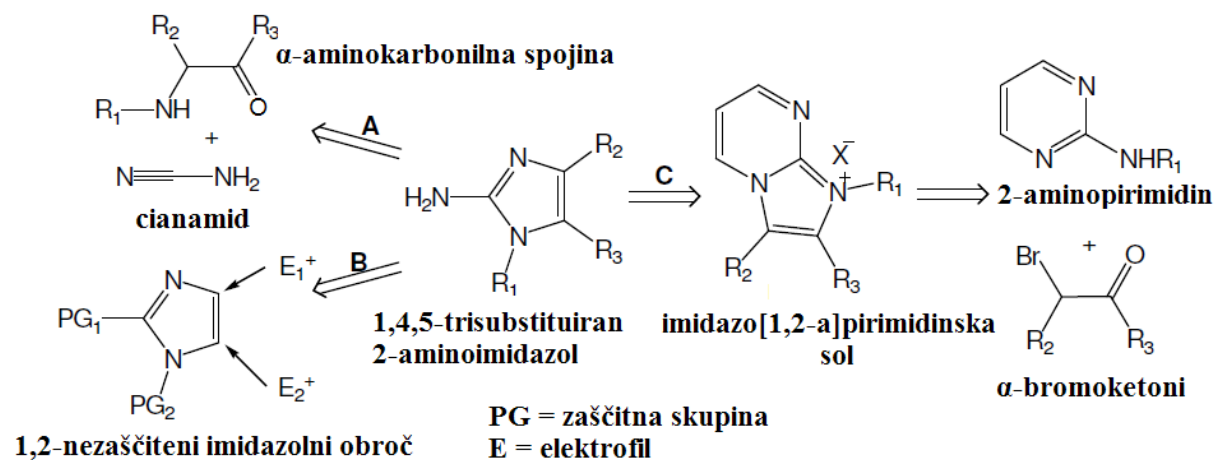


Reagenti: a) MW, 80 °C, MeCN, 30 min; b) N₂H₄, MeCN, MW, 100 °C, 10 min; c) MeCN, 15-25 min, 130-150 °C, MW; d) HBr ali PPA, 140 °C, 30 min; e) 60% N₂H₄, MeCN, 100 °C, MW.

Slika 13: Kondenzaciji med 2-aminopirimidinom in α -bromoketoni ^[10]

1.5.5. Heterociklične reakcije aromatske substitucije

Sodobni sintezni pristopi za pripravo 1-nesubstituiranega 2-amino-1*H*-imidazola lahko v grobem razdelimo na ciklizacijo substituiranih ali zaščitene gvanidinov z 1,2-dielektrofili, heteroaromske nukleofilne substitucije in reciklizacijo 2-aminooksazola. Čeprav so na voljo različni substituirani gvanidini in se lahko pripravijo in situ (kot na primer iz cianamidov), visoka bazičnost gvanidinov pogosto vodi do nastanka več različnih produktov. Pri odščiti aminske skupine, zaščitene z acetilno ali BOC skupino, uporabljajo kisel pH. Postopek za ciklokondenzacijo med aldehidi in gvanidijevim nitratom, pri katerem se uporabi natrijev cianid in aluminijev oksid, omogoča nastanek 2-aminoimidazola z enakimi substituenti na mestu 4 in mestu 5 obročne strukture.

Slika 14: Retrosintezne analize 1-substituiranega 2-aminoimidazola ^[8]

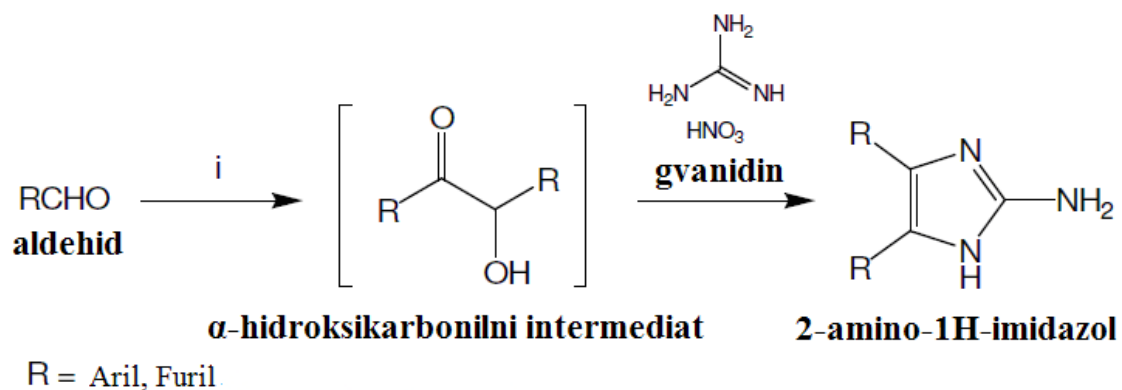
Vendar pa le nekaj pristopov opisuje neposredno sintezo 1-substituiranega 2-aminoimidazola, in zlasti 1,4,5-trisubstituiranega 2-aminoimidazola. Prva metoda vključuje kondenzacijo α -aminokarbonilne spojine s cianamidom, izotioureo ali njihovimi sintezni analogi (pot A) in je najbolj priljubljen način za neposredno tvorbo 2-aminoimidazolskega obroča. Ta reakcija je zelo občutljiva na pH, saj lahko pride do samo-kondenzacije α -aminokarbonilne spojine, kot

posledica pa se tvori simetrični pirazin. Pot B vključuje zaporedne funkcionalizacije 1,2-nezaščitenega imidazolnega obroča z različnimi elektrofilni.

Znano je, da neposredna ciklokondenzacija alkilgvanidinov z α -bromoketoni nikoli ne vodi do 1-substituiranega 2-aminoimidazola zaradi močne bazičnosti gvanidinov. Nasprotno je 2-aminopirimidin manj bazičen in zlahka reagira z α -bromokarbonilno spojino (pot C). Leta 1968 je Paudler s sodelavci poročal o prvi cepitvi 1-metilimidazo[1,2- α]pirimidinijeve soli v 1-metil-2-aminoimidazol. Pri tej reakciji je prišlo do oksidacijske cepitve pirimidinskega obroča in na podlagi tega so dokazovali reakcije metiliranja matičnega imidazo[1,2- α]pirimidina. Pogost način tvorbe imidazo[1,2- α]pirimidinijeve soli je dobro poznana pot ciklokondenzacije 2-aminopirimidina z že pripravljenimi α -bromoketoni. Te reakcije vključujejo začetno alkiliranje endocikličnega dušikovega atoma, pri čemer se določi položaj substituenta v imidazolu (pot C).^[8,13]

1.5.6. Uporaba mikrovalov pri sintezi 2-amino-1*H*-imidazola

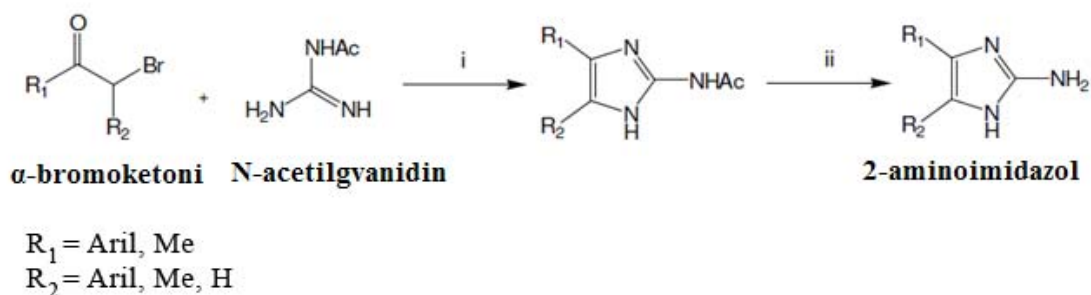
Ciklokondenzacija aromatskih in heteroaromatskih aldehydov z gvanidinijevim nitratom ob prisotnosti natrijevega cianida prav tako daje 2-amino-1*H*-imidazol. V prvi stopnji pride do reakcije med 2 molekulama aldehyda in NaCN, pri čemer nastane α -hidroksikarbonilni intermediat (slika 15).



(i) NaCN, Al₂O₃, MW, 30 min, 80-85%

Slika 15: Mikrovalovni proces sinteze 4,5-disubstituiranega 2-amino-1*H*-imidazola^[8]

Novejši postopek za pripravo 4(5)-mono- in 4,5-disubstituiranega 2-amino-1*H*-imidazola pa je pred kratkim razvil Lam skupaj s sodelavci. Za ciklokondenzacijo α -bromoketonov z *N*-acetilguanidinom v acetonitrilu potrebujemo le 10 minut. Odstranjevanje zaščite so izvedli v kislem mediju s pomočjo obsevanja z mikrovalovi, kar je vodilo do nastanka 2-aminoimidazola (slika 16).^[8,10,13]



(i) MeCN, MW, 100 °C, 10 min, 92-99%; (ii) (a) 20% H₂SO₄/EtOH (ali 20% H₂SO₄/MeOH), MW, 100 °C, 10 min. (b) 5M KOH/MeOH, 88-98%

Slika 16: Mikrovalovni proces sinteze asimetričnega 4,5-disubstituiranega 2-amino-1*H*-imidazola^[8]

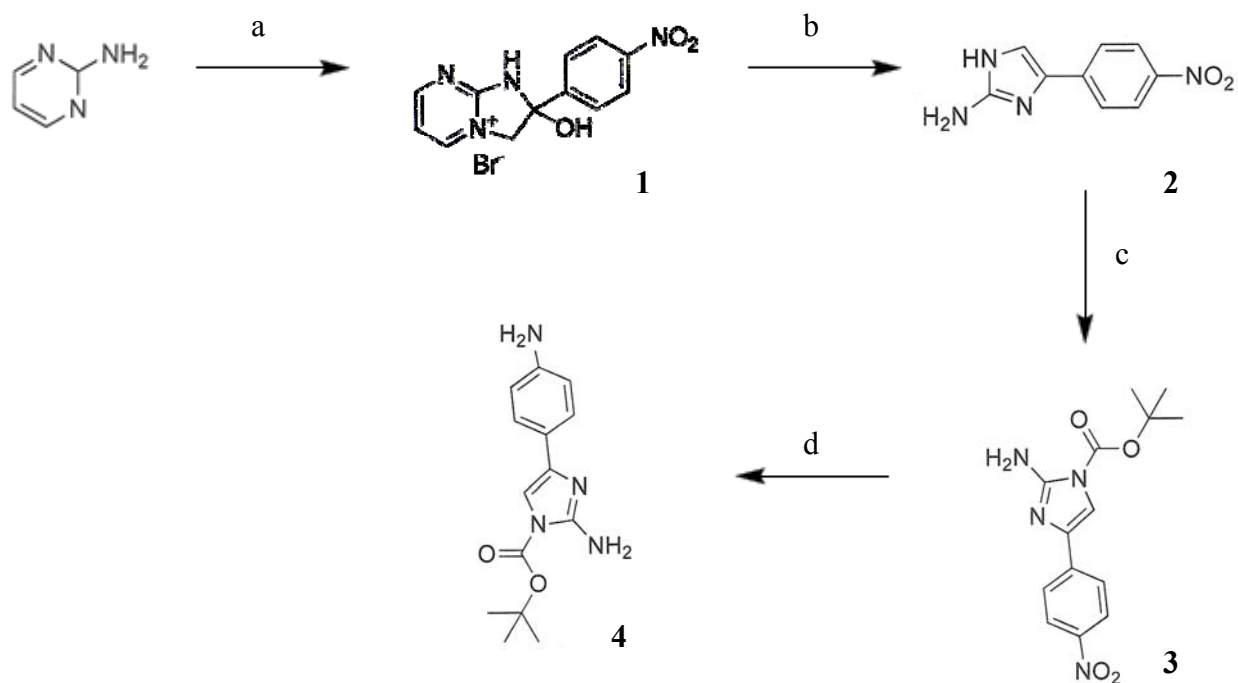
2. NAČRT ZA DELO

V okviru diplomskega dela bomo poskušali sintetizirati rigidne 2-aminoimidazolske derivate nevrotoksina klatrodina in jih ustrezno spektroskopsko in fizikalno-kemijsko karakterizirati.

V prvih dveh stopnjah bomo pripravili 4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-2-amin (**2**) iz 2-aminopirimidina in α -bromokarbonilne komponente s pomočjo segrevanja. Kot produkt prve stopnje bomo dobili 2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2- α]pirimidin-4-ijev bromid (**1**) in ga nato s hidrazinolizo pretvorili do produkta **2**, ki ga bomo v nadaljevanju zaščitili z BOC anhidridom. Nastali *tert*-butil 2-amino-4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**3**) bomo s katalitskim hidrogeniranjem reducirali v amin **4**, ki služi kot izhodna spojina za nastanek različnih 2-aminoimidazolnih derivatov klatrodina. Z različnimi kislinami bomo izvedli tvorbo amida na aromatskem aminu spojine **4**. Kot kisline bomo uporabili pirol-2-karboksilno kislino, indol-2-karboksilno kislino, BOC-L-prolin in BOC-D-prolin. Tako bomo poskušali sintetizirati (S)-*tert*-butil 2-amino-4-(4-(1-(*tert*-butoksikarbonil)pirolidin-2-karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**5**), (R)-*tert*-butil 2-amino-4-(4-(1-(*tert*-butoksikarbonil)pirolidin-2-karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**6**), *tert*-butil 4-(4-(1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**7**) in *tert*-butil 4-(4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**8**). Na koncu bomo z acidolizo odstranili BOC zaščito spojinam **5**, **7** in **8** ter tako dobili spojine 4-(4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**9**), 4-(4-(1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**10**) in 2-amino-4-(4-(pirolidin-1-2-karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**11**). Produkte vseh sinteznih stopenj bomo očistili in ovrednotili z NMR, MS, IR in HPLC.

2.1. REAKCIJSKE SHEME

Reakcijska shema 1: Sinteza intermediata 4

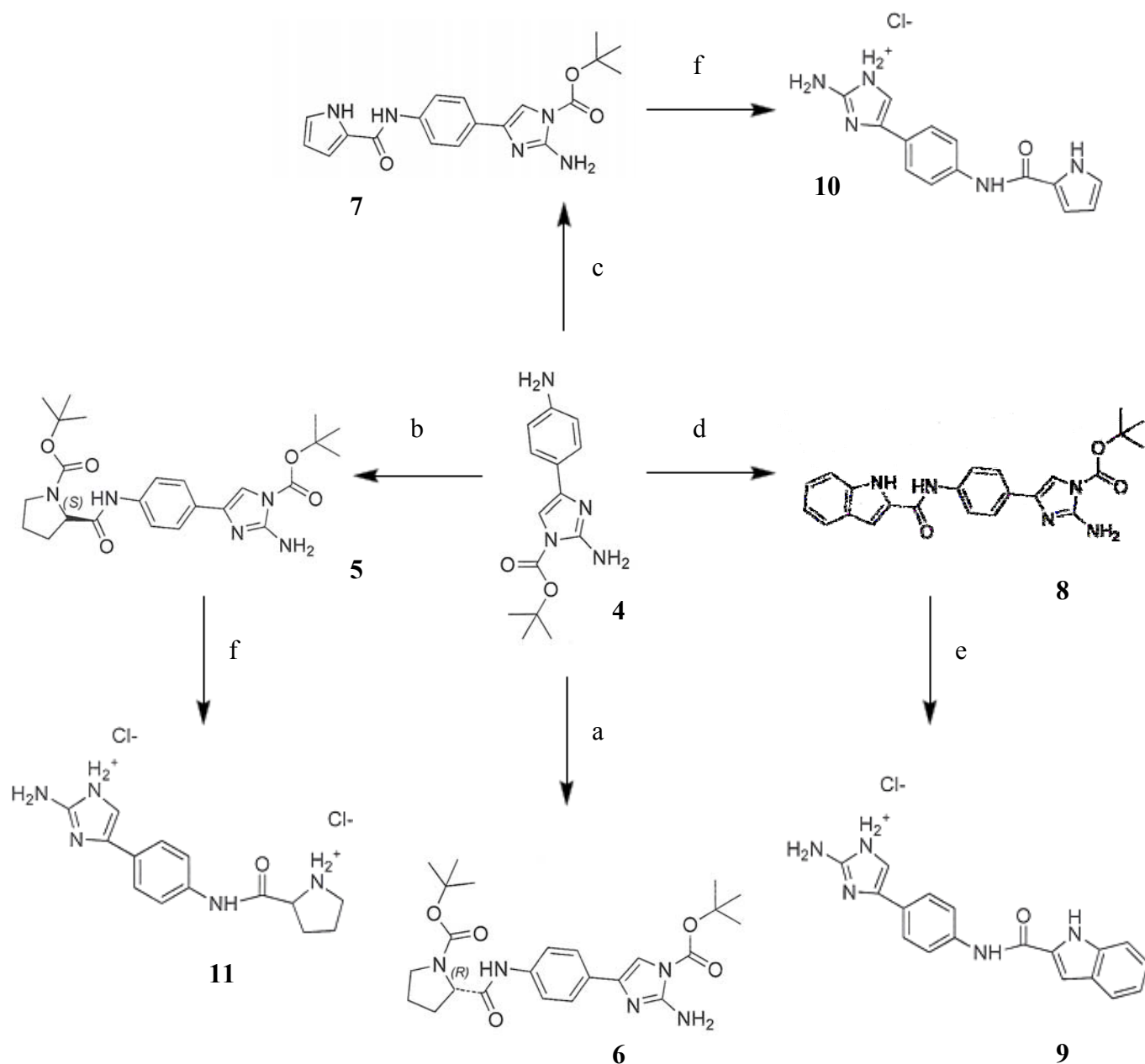


a: 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanon, DMAP/MeCN

b: $\text{NH}_2\text{NH}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ /EtOH abs.

c: BOC anhidrid, DMAP/ H_2O , MeOH

d: H_2 , Pd/C / THF

Reakcijska shema 2: Sinteza substituiranih 2-aminoimidazolov

a: BOC-D-prolin, TBTU, NMM / DKM, **b:** BOC-L-prolin, TBTU, NMM / DKM, **c:** pirol-2-karboksilna kislina, TBTU, NMM / DKM, **d:** indol-2-karboksilna kislina, TBTU, NMM / DKM, **e:** AcCl/THF, **f:** AcCl/EtOH abs.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Reagenti in topila

Pri sinteznem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros organics, Alfa Aesar, Fluka, Merck in Sigma Aldrich. Brezvodna topila smo pripravili po standardnih postopkih in jih shranjevali nad molekularnimi siti z velikostjo por 0,3 ali 0,4 nm.

Nomenklatura in risanje spojin

Za poimenovanje spojin in risanje strukturnih (IUPAC nomenklatura) formul smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.2. METODE

3.2.1. Kromatografske metode

- **S tankoplastno kromatografijo (TLC)** smo spremljali poteke reakcij, izolacij in kolonskih kromatografij. Uporabljali smo TLC plošče Silica gel 60F₂₅₄ (Merck KGaA) z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20×20 cm. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino $\lambda=254$ nm in orositvene reagente: ninhidrin za detekcijo aminov ter bromkrezol zeleno za detekcijo COOH skupine.

- **Kolonsko kromatografijo** smo uporabljali kot ločevalno tehniko za čiščenje spojin. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali Silikagel 60 (Kieselgel 60) proizvajalca Merck s premerom delcev 0,040-0,063 mm (flash silikagel).

- **HPLC:** HPLC analize so bile opravljene na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z detektorjem G1365B UV-VIS pri valovni dolžini $\lambda=254$ nm, kolono Luna C18 (4.6 ×

150 mm) in pretoku 1 mL/min. Kot mobilno fazo A smo uporabili vodo z 0.1 % TFA (trifluoroocetne kisline), kot mobilno fazo B pa metanol z 0.1 % TFA ter gradient 10 % - 90 % (0.1 % TFA – metanol) v 30 min.

- **Mobilne faze**, ki smo jih uporabljali:

MF1: etilacetat/heksan=1/1

MF2: diklorometan/metanol=9/1

MF3: diklorometan/metanol=4/1+Et₃N

MF4: diklorometan/metanol=1/1+ Et₃N

MF5: diklorometan/metanol=3/1

MF6: diklorometan/metanol=10/1+NH₃

MF7: acetonitril/metanol/voda=3/1/1

MF8: diklorometan/metanol=10/1+CH₃COOH

MF9: etilacetat/heksan=4/1

MF10: etilacetat

3.2.2. Spektroskopske metode

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR):** NMR so bili posneti na spektrometru Bruker UltraShield™ Plus pri 400 MHz v Spektroskopskem centru na Fakulteti za farmacijo in na spektrometru Bruker AVANCE DPX₃₀₀ pri 300,15 MHz v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Uporabljali smo devterirano topilo DMSO-d₆ in interni standard tetrametilsilan (TMS). Spektre smo procesirali s programom MestRec Version 4.8.6.0.

- **Infrardeča spektroskopija (IR):** IR spektri so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer 1600 Series FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

- **Masna spektrometrija (MS):** Masni spektri pa so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier z ESI ali HR-MS tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

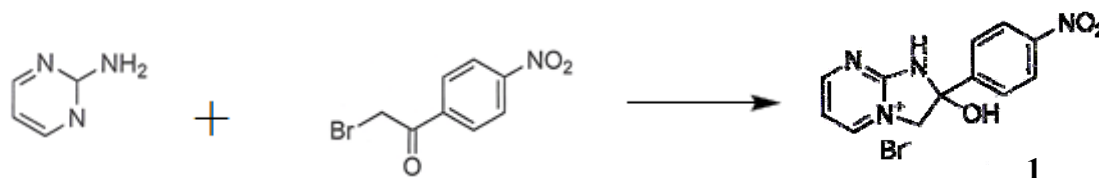
3.2.3. Določevanje tališč

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

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. SINTEZA 2-HIDROKSI-2-(4-NITROFENIL)-2,3-DIHIDRO-1H-IMIDAZO[1,2- α]PIRIMIDIN-4-IJEVEGA BROMIDA (1)

Reakcija:



Postopek:

Raztopini 1.7118 g (18.0 mmol) 2-aminopiridina in 5.28 g (21.6 mmol) 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona v acetonitrilu (24 mL) dodamo konico spatule katalizatorja 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Segrevamo pri temperaturi 85 °C in s pomočjo TLC spremljamo potek reakcije. Nato reakcijsko zmes razredčimo z 20 ml acetona. Nastalo oborino odfiltriramo z odsesavanjem, jo speremo z acetonom (2×20 ml), etrom (2×20 ml) in jo posušimo pri sobni temperaturi.

Rezultati:

Izgled: Rumeni kristali

Izkoristek: 82.9 % (5.051 g)

Tališče: nad 300 °C, 320 °C^[13]

IR (NaCl, cm⁻¹): 3410, 3007, 2919, 2148, 1654, 1438, 1407, 1317, 1020, 953, 902, 708

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 4.72-4.93 (dd, 4H, J=57.2 Hz, J=14.4 Hz, -OH, -CH₂)

7.99 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)

8.33 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)

8.88-9.01 (m, 2H, Pyr-H)

11.32 (s, 1H, -NH)

MS(ESI): 258.9 (M-Br)⁺, **Mr (izračunana):** 339.14

Rf: 0.89 (MF2), 0.79 (MF1)

HR MS: /

Elementna sestava: C₁₂H₁₁BrN₄O₃

4.2. SINTEZA 4-(4-NITROFENIL)-1H-IMIDAZOL-2-AMINA (2)

Reakcija:



Postopek:

V procesno vialo natehtamo 676 mg (2.0 mmol) spojine **1**, jo raztopimo v 5 mL absolutnega etanola in dodamo 815 µL (14.0 mmol) 55 % raztopine hidrazin hidrata. Nato vialo segrevamo 15 minut v mikrovalovnem reaktorju pri moči 50 W, temperaturi 120 °C in tlaku 200 Psi. Topilo odparimo pod znižanim tlakom, suh preostanek pa očistimo s kolonsko kromatografijo (MF6). Produkt **2** nato posušimo v sušilniku pri temperaturi 50 °C.

Rezultati:

Izgled: Rdeči kristali

Izkoristek: 77 % (2.949 g)

Tališče: 207-210 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3448, 3377, 1596, 1579, 1497, 1318, 1093, 852, 722, 617, 490

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm] = 5.52 (s, 2H, Ar-NH₂)
7.40 (s, 1H, imidazol-H)
7.81 (d, 2H, J=9.2 Hz, Ar-H)
8.14 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)

MS(ESI): 205.1 (MH^+), **Mr (izračunana):** 204.19

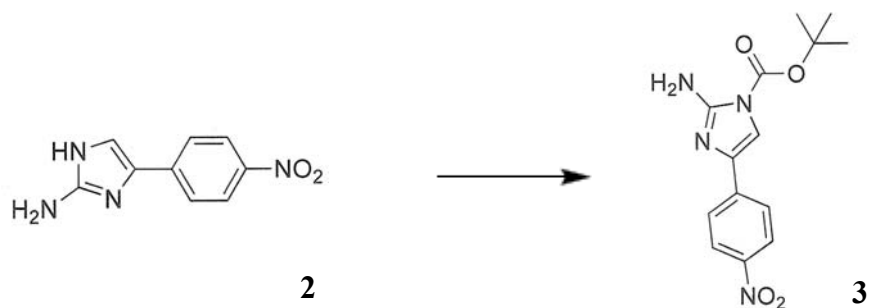
Rf: 0.24 (MF6)

HR MS: 205.0726 (izračunana: 205.0726)

Elementna sestava: C₉H₈N₄O₂

HPLC: 100.0 % (254 nm), t_r =12.09 min

4.3. SINTEZA *TERC*-BUTIL-2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (3)

Reakcija:**Postopek:**

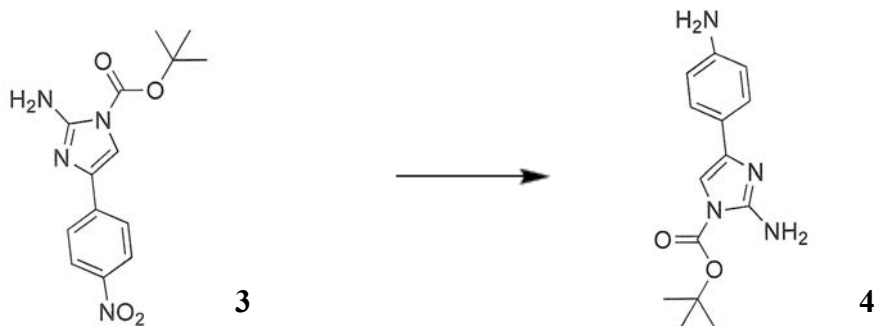
V bučko natehtamo 816 mg (4.0 mmol) spojine **2**, jo suspendiramo v 10 mL destilirane vode in dodamo še 2-3 ml metanola. Ob mešanju dodamo približno 0.05 g (0.41 mmol) DMAP in 2.62 g (12.0 mmol) BOC anhidrida ter segrevamo pri temperaturi 60 °C, dokler s TLC ne zaznamo konca reakcije. Izpadlo oborino nato odfiltriramo in posušimo v sušilniku pri temperaturi 50 °C.

Rezultati:**Izgled:** Rumeni kristali**Izkoristek:** 89.2 % (1.086 g)**Tališče:** 185-188 °C**IR (KBr, cm⁻¹):** 3409, 3273, 3124, 2992, 1737, 1637, 1603, 1540, 1515, 1478, 1437, 1412, 1341, 1313, 1292, 1265, 1211, 1157, 1125, 1106, 856, 844, 783, 770, 750, 721, 670, 637, 596, 541, 516, 494, 459**¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ [ppm] = 1.60 (s, 9H, (CH₃)₃)6.73 (s, 2H, Ar-NH₂)

7.72 (s, 1H, imidazol-H)

8.00 (d, 2H, J=7.0 Hz, Ar-H)

8.22 (d, 2H, J=7.0 Hz, Ar-H)

MS(ESI): 305.1 (MH⁺), **Mr (izračunana):** 304.3**Rf:** 0.95 (MF6)**HR MS:** 305.1260 (izračunana: 305.1250)**Elementna sestava:** C₁₄H₁₆N₄O₄**HPLC:** 100.0 % (254 nm), t_r=16.89 min**4.4. SINTEZA TERC-BUTIL 2-AMINO-4-(4-AMINOFENIL)-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (4)****Reakcija:**

Postopek:

V dvogrlo bučko zatehtamo 0.5 g (1.6 mmol) spojine **3** in jo raztopimo v približno 30 mL THF. Raztopino prepihamo z argonom in dodamo približno 10 masnih % (0.05 g) katalizatorja Pd/C. Med mešanjem vsebino bučke prepihavamo z vodikom. Po končani reakciji odfiltriramo katalizator, z rotavaporjem odparimo topilo in tako dobimo spojino **4**.

Rezultati:

Izgled: Rumeno-beli kristali

Izkoristek: 95.4 % (3.006 g)

Tališče: 147-150 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3451, 3372, 3301, 3050, 2977, 1731, 1655, 1619, 1544, 1510, 1476, 1442, 1358, 1312, 1286, 1257, 1208, 1177, 1157, 1118, 1062, 937, 836, 769, 739, 693, 646, 596, 519, 472

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 1.57 (s, 9H, (CH₃)₃)
5.12 (s, 2H, Ph-NH₂)
6.50-6.55 (m, 4H, Ar-NH₂, 2×Ar-H)
7.01 (s, 1H, imidazol-H)
7.38 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-H)

MS(ESI): 275.2 (MH⁺), **Mr (izračunana):** 274.32

Rf: 0.54 (MF6)

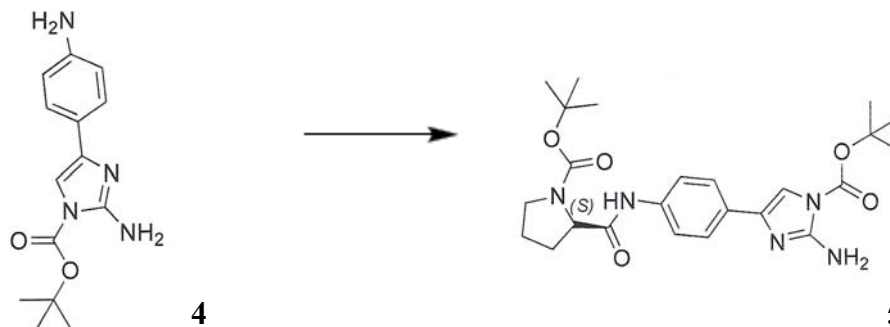
HR MS: 275.1503 (izračunana: 275.1508)

Elementna sestava: C₁₄H₁₈N₄O₂

HPLC: 100.0 % (254 nm), t_r=12.32 min

4.5. SINTEZA (S)-TERC-BUTIL 2-AMINO-4-(4-(1-(TERC-BUTOKSIKARBONIL)PIROLIDIN-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (5)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 484 mg (2.25 mmol) BOC-L-prolina in 702 mg (2.25 mmol) TBTU, ju raztopimo v 10 mL diklorometana in dodamo 550 μ L (5.0 mmol) NMM. Po 1 uri mešanja dodamo še 275 μ L (2.5 mmol) NMM in 411 mg (1.5 mmol) spojine **4** ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo pod znižanim tlakom in preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (MF 9).

Rezultati:

Izgled: Oranžno-rjavi kristali

Izkoristek: 21.5 % (152 mg)

Tališče: 182-185 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3421, 3309, 2978, 1744, 1701, 1527, 1364, 1290, 1258, 1162, 1126, 850, 771, 691

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 1.28 (s, 9H, (CH₃)₃-pirolidin)
 1.58 (s, 9H, (CH₃)₃-imidazol)
 1.74-2.27 (m, 4H, -CH₂-CH₂)
 3.28-3.47 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-)
 4.17-4.27 (m, 1H, CO-CH-N)
 6.56 (s, 2H, Ar-NH₂)
 7.25 (s, 1H, imidazol-H)
 7.57 (d, 2H, J=7.7 Hz, Ar-H)
 7.66 (d, 2H, J=7.7 Hz, Ar-H)
 9.96 (s, 1H, CONH)

MS(ESI): 472.3 (MH⁺), **Mr (izračunana):** 471.55

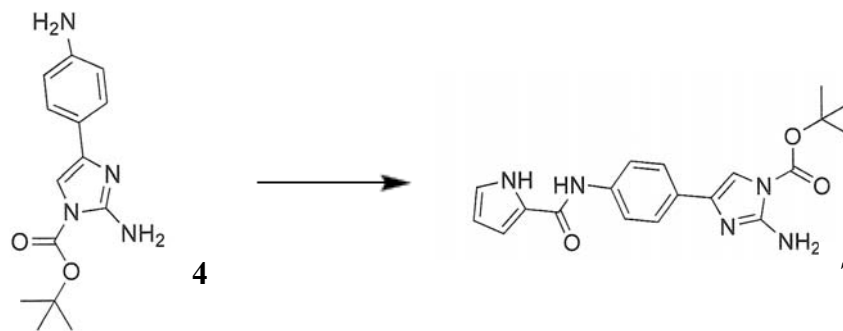
Rf: 0.42 (MF10), orositveni reagent: ninhidrin

HR MS: 472.2568 (izračunana: 472.2560)

Elementna sestava: C₂₄H₃₃N₅O₅

HPLC: 95.9 % (254 nm), t_r=15.20 min

4.6. SINTEZA *TERC*-BUTIL 4-(4-(1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO-1*H*-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (7)

Reakcija:

Postopek:

V bučko zatehtamo 250 mg (2.25 mmol) pirol-2-karboksilne kisline in 702 mg (2.25 mmol) TBTU, ju raztopimo v 10 mL diklorometana in dodamo 550 μ L (5.0 mmol) NMM. Po 1 uri mešanja dodamo še 275 μ L (2.5 mmol) NMM in 411 mg (1.5 mmol) spojine **4** ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino **7** izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: Rumeni kristali

Izkoristek: 42.36 % (70 mg)

Tališče: 167-170 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3307, 1685, 1593, 1551, 1522, 1413, 1334, 1240, 1111, 1042, 890, 865, 829, 753, 641, 584, 522

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 1.59 (s, 9H, (CH₃)₃)
6.16-6.18 (m, 1H, pirol-H)
6.56 (s, 2H, Ar-NH₂)
6.59-6.60 (m, 1H, pirol-H)
7.07 (s, 1H, pirol-H)
7.28 (s, 1H, imidazol-H)
7.67 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
7.72 (d, 2H, J=9.0 Hz, Ar-H)
9.76 (s, 1H, CONH)
11.66 (s, 1H, pirol-NH)

MS(ESI): 368.2 (MH⁺), **Mr (izračunana):** 367.40

Rf: 0.53 (MF10), orositveni reagent: ninhidrin

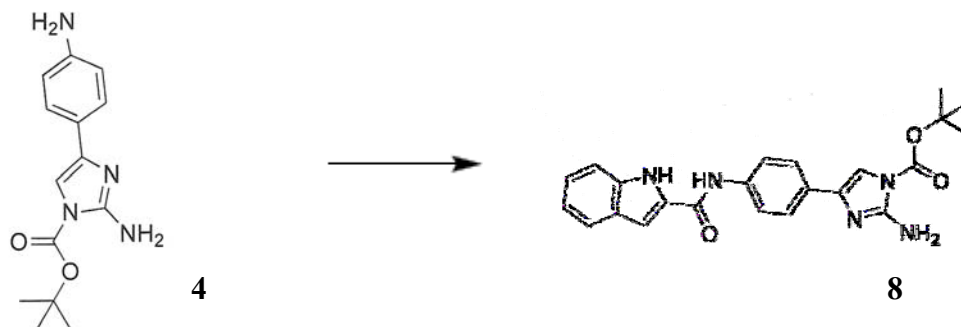
HR MS: 368.1734 (izračunana: 368.1723)

Elementna sestava: C₁₉H₂₁N₅O₃

HPLC: 95.3 % (254 nm), t_r=17.14 min

4.7. SINTEZA *TERC*-BUTIL 4-(4-(1*H*-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO-1*H*-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (8)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 360 mg (2.25 mmol) indol-2-karboksilne kisline in 702 mg (2.25 mmol) TBTU, ju raztopimo v 10 mL diklorometana in dodamo 550 μ L (5.0 mmol) NMM. Po 1 uri mešanja dodamo še 275 μ L (2.5 mmol) NMM ter 411 mg (1.5 mmol) spojine 4. Po končani reakciji topilo odparimo na rotavaporju in preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (MF 9).

Rezultati:

Izgled: Rumeni kristali

Izkoristek: 35 % (218 mg)

Tališče: 276-279 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3412, 1734, 1642, 1357, 1314, 1260, 1159, 1120, 838, 740

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm] = 1.59 (s, 9H, (CH_3)₃)

6.58 (s, 2H, Ar-NH₂)

7.07 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, indol-H)

7.23 (t, 1H, J=7.5 Hz, indol-H)
 7.42-4.79 (m, 2H, imidazol-H, indol-H)
 7.68 (d, 1H, J=7.8 Hz, indol-H)
 7.72 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
 7.80 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
 10.20 (s, 1H, CONH)
 11.70 (s, 1H, indol NH)

MS(ESI): 418.2 (MH⁺), **Mr (izračunana):** 417.46

Rf: 0.60 (MF9), 0.50 (MF10), orositveni reagent: ninhidrin

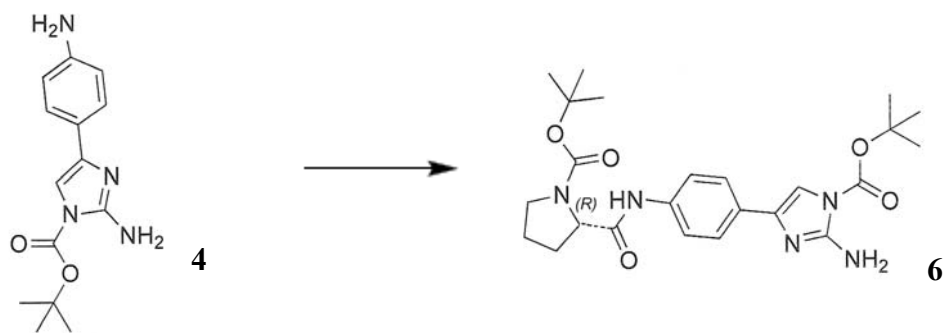
HR MS: 418.1875 (izračunana: 418.1879)

Elementna sestava: C₂₃H₂₃N₅O₃

HPLC: 100.0 % (254 nm), t_r=16.84 min

4.8. SINTEZA (R)-TERC-BUTIL 2-AMINO-4-(4-(1-(TERC-BUTOKSIKARBONIL)PIROLIDIN-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (6)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 78 mg (0.36 mmol) BOC-D-prolina in 113 mg (0.36 mmol) TBTU, ju raztopimo v 2 mL diklorometana in dodamo še 80 μ L (0.73 mmol) NMM. Po 30 minutah mešanja dodamo še 66 mg (0.242 mmol) spojine **4** in 53 μ L (0.48 mmol) NMM ter pustimo, da se meša preko noči. Po koncu reakcije topilo odparimo in preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (MF 9).

Rezultati:

Izgled: Beli kristali

Izkoristek: 21.9 % (25 mg)

Tališče: 180-184 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3408, 3301, 2978, 1743, 1699, 1642, 1601, 1527, 1478, 1409, 1361, 1304, 1289, 1258, 1161, 1122, 984, 923, 848, 771, 738, 698, 524

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm] = 1.28 (s, 9H, (CH_3)₃-pirolidin)
1.58 (s, 9H, (CH_3)₃-imidazol)
1.75-1.95 (m, 4H, -CH₂, -CH₂-)
3.24-3.46 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂-)
4.19-4.25 (m, 1H, -CO-CH-N)
6.55 (s, 2H, Ar-NH₂)
7.25 (s, 1H, imidazol-H)
7.57 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-H)
7.67 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
9.96 (s, 1H, CONH)

MS(ESI): 472.3 (MH^+), **Mr (izračunana):** 471.55

Rf: 0.47 (MF10), orositveni reagent: ninhidrin

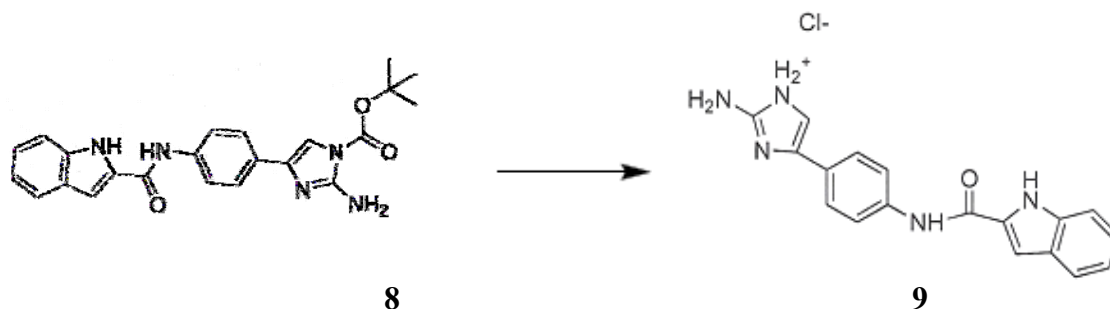
HR MS: 472.2569 (izračunana: 472.2560)

Elementna sestava: C₂₄H₃₃N₅O₅

HPLC: 91.1 % (254 nm), t_r =15.22 min

4.9. SINTEZA 4-(4-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO-1H-IMIDAZOL-1-IJEVEGA KLORIDA (9)

Reakcija:



Postopek:

V bučko odmerimo 4 mL absolutnega etanola, ga ohladimo na 0 °C ter ob mešanju počasi po kapljicah dodamo 150 μ L (2.1 mmol) acetilklorida. Raztopino mešamo 10 minut, nato odstavimo ledeno kopel in s pomočjo injekcije vbrizgamo 70 mg (0,17 mmol) spojine **8** raztopljene v 2 mL THF. Po 3 urah bučko ponovno ohladimo na 0 °C in dodamo še 150 μ L (2.1 mmol) acetilklorida, da reakcija poteče v celoti. Po končani reakciji topilo odparimo na rotavaporju, dodamo kapalko THF in etra ter tako izoborimo spojino **9**, ki jo nato še odfiltriramo in posušimo na zraku.

Rezultati:

Izgled: Rumeno-beli kristali

Izkoristek: 71 % (50 mg)

Tališče: 191-194 °C

IR (KBr, cm^{-1}): 3402, 1662, 1522, 1320, 1232, 1196, 834, 741

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm] = 7.07-7.11 (m, 1H, indol-H)

7.22-7.26 (m, 1H, indol-H)
 7.34-7.35 (m, 1H, indol-H)
 7.45-7.49 (m, Ar-NH₂, indol-H, imidazol-H)
 7.66-7.71 (m, 2H, Ar-H, indol-H)
 7.90 (d, 2H, J=2.4 Hz, Ar-H)
 10.38 (s, 1H, J=11.6 Hz, Ar-NHCO)
 11.80 (d, 1H, J=1.6 Hz, indol-NH)
 12.01 (s, 1H, H_A-NH₂⁺Cl⁻)
 12.69 (s, 1H, H_B-NH₂⁺Cl⁻)

MS(ESI): 318.1 (M-Cl)⁺, **Mr (izračunana):** 353.81

Rf: 0.62 (MF10)

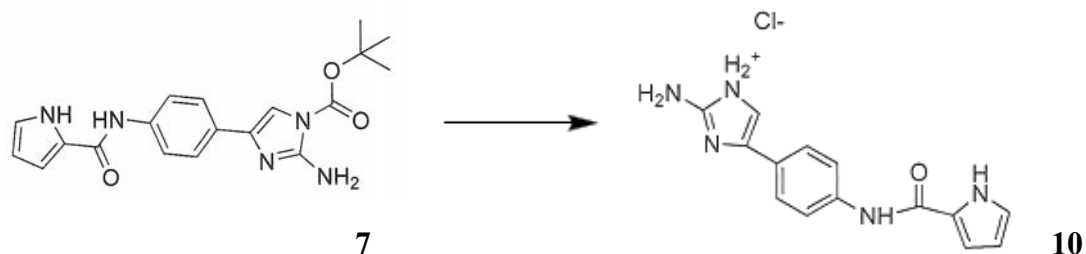
HR MS: 318.1359 (izračunana: 318.1355)

Elementna sestava: C₁₈H₁₆ClN₅O

HPLC: 85.7 % (254 nm), t_r=16.60 min

4.10. SINTEZA 4-(4-(1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-2-AMINO-1H-IMIDAZOL-1-IJEVEGA KLORIDA (10)

Reakcija:



Postopek:

V bučko odmerimo 4 mL absolutnega etanola, ga ohladimo na 0 °C ter ob mešanju počasi po kapljicah dodamo 400 µL (5.6 mmol) acetilklorida. Raztopino mešamo 10 minut, nato odstavimo ledeno kopel in s pomočjo injekcije vbrizgamo 200 mg (0.544 mmol) spojine 7

raztopljene v 3 mL absolutnega etanola. Po približno 2 urah bučko ponovno ohladimo na 0 °C in dodamo še 200 µL (2.8 mmol) acetilklorida, da reakcija poteče v celoti. Po končani reakciji topilo odparimo na rotavaporju, dodamo nekaj kapalk etra, ter tako izoborimo spojino **10**, ki jo na koncu še odfiltriramo. Vzorec večkrat spiramo z etrom in ga posušimo na zraku.

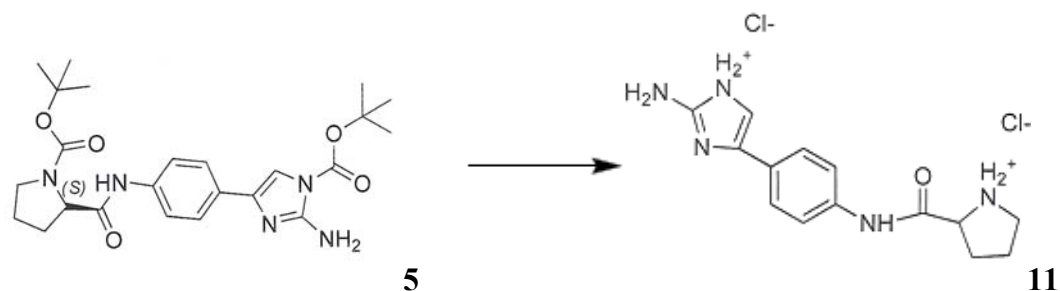
Rezultati:**Izgled:** Zelenkasti kristali**Izkoristek:** 42.36 % (70 mg)**Tališče:** 114-117 °C**IR (KBr, cm⁻¹):** 3421, 1656, 1412, 1333, 1124, 836, 746**¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):**

δ [ppm] = 6.16-6.19 (m, 1H, pirol-H)
6.98 (s, 2H, Ar-NH₂)
7.08 (s, 1H, pirol-H)
7.29 (s, 1H, pirol-H)
7.41 (s, 1H, imidazol-H)
7.61 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
7.84 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
9.94 (s, 1H, CONH)
11.73 (s, 1H, pirol-NH)
12.02 (s, 1H, H_A-NH₂⁺Cl⁻)
12.76 (s, 1H, H_B-NH₂⁺Cl⁻)

MS(ESI): 268.1 (M-Cl)⁺, **Mr (izračunana):** 303.75**Rf:** 0.52 (MF10)**HR MS:** 268.1194 (izračunana: 268.1198)**Elementna sestava:** C₁₄H₁₄ClN₅O**HPLC:** 95.1 % (254 nm), t_r=12.88 min

4.11. SINTEZA 2-AMINO-4-(4-(PIROLIDIN-1-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1H-IMIDAZOL-1-IJEVEGA KLORIDA (11)

Reakcija:



Postopek:

V bučko odmerimo 1 mL absolutnega etanola, ga ohladimo na 0 °C ter ob mešanju počasi po kapljicah dodamo 100 µL (1.4 mmol) acetilklorida. Raztopino mešamo 10 minut, nato odstavimo ledeno kopel in s pomočjo injekcije vbrizgamo 50 mg (0.106 mmol) spojine **5** raztopljene v 2 mL absolutnega etanola. Po približno 2 urah bučko ponovno ohladimo na 0 °C in dodamo še 25 µL (0.35 mmol) acetilklorida, da reakcija poteče v celoti. Po končani reakciji topilo odparimo na rotavaporju, dodamo nekaj kapalk etra ter tako izoborimo spojino **6**, ki jo nato še odfiltriramo. Vzorec večkrat spiramo z etrom in ga posušimo na zraku.

Rezultati:

Izgled: Zelo higroskopska belkasta spojina

Izkoristek: 68.5 % (25 mg)

Tališče: Zaradi visoke higroskopsnosti nismo mogli določiti tališča

IR (NaCl, cm⁻¹): 3362, 1682, 1605, 1546, 1323, 1265, 838

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm] = 1.93-2.01 (m, 4H, -CH₂, CH₂)

3.25-3.31 (m, 2H, -N-CH₂-CH₂)

4.36-4.44 (m, 1H, CO-CH-N)

7.34 (s, 2H, Ar-NH₂)
7.43 (s, 1H, imidazol-H)
7.65 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H)
7.70 (d, 2H, J=9.0 Hz, Ar-H)
8.67 (s, 1H, H_A-NH₂⁺Cl⁻ pirolidin)
9.81 (s, 1H, H_B-NH₂⁺Cl⁻ pirolidin)
10.99 (s, 1H, CONH)
12.07 (s, 1H, H_A-NH₂⁺Cl⁻ imidazol)
12.87 (s, 1H, H_B-NH₂⁺Cl⁻ imidazol)

MS(ESI): 272.2 (M-2Cl)⁺, **Mr (izračunana):** 344.24

Rf: 0.52 (MF10)

HR MS: 272.1520 (izračunana: 272.1511)

Elementna sestava: C₁₄H₁₉Cl₂N₅O

HPLC: 99.1 % (254 nm), t_r=8.78 min

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

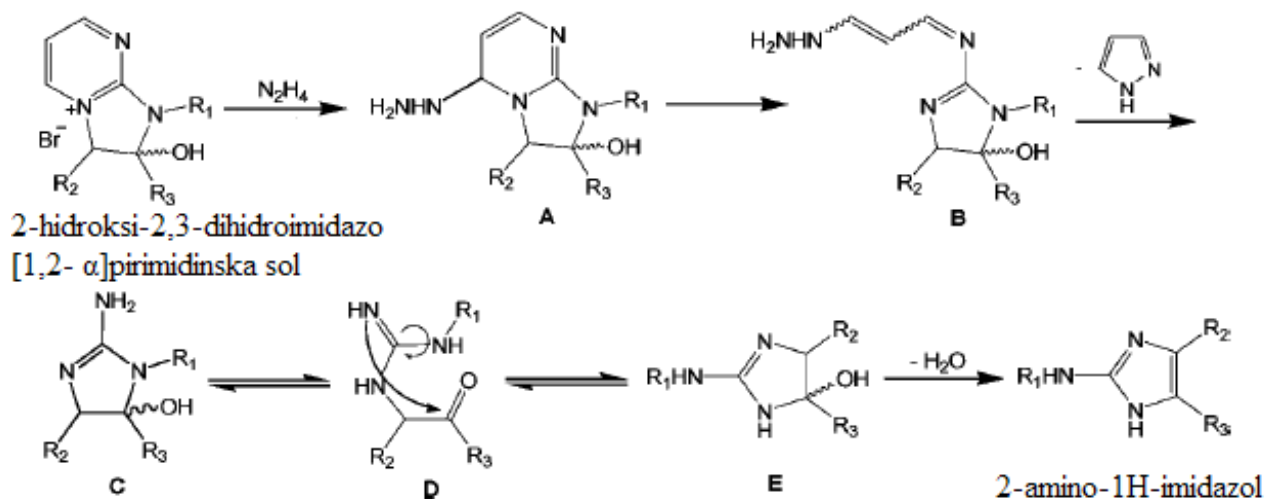
5.1. SINTEZA 2-AMINOIMIDAZOLA

Po znanem sinteznem postopku, ki temelji na ciklokondenzaciji 2-aminopirimidina in 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona s pomočjo katalizatorja DMAP, smo pripravili produkt v obliki soli **1**. Optimiziran dvostopenjski protokol smo uspešno uporabili za sintezo 4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-2-amina (**2**).

Glede na mehanizem pretvorbe 2-hidroksi-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2- α]pirimidin-4-ijeve soli v 2-amino-1*H*-imidazol, predvidevajo, da reakcija poteka po neobičajni preureditvi tipa Dimroth *in situ* (slika 17):

V prvem koraku s hidrazin hidratom cepijo primarni obroč spojine 2-hidroksi-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2- α]pirimidin-4-ijeve soli.^[13] Ugotovili so, da je hidrazin hidrat najbolj reaktiven bis-nukleofil v primerjavi s hidroksilaminom in alkilamini.^[22]

V nadaljevanju reakcije nastane 2-amino-5-hidroksiimidazolidin **C**, ki je v ravnovesju z odprto obliko **D**, kar lahko privede do izomernega 2-amino-5(4)-hidroksiimidazolidina **E**. Pri obsevanju z mikrovalovi izstopa voda in tako nastane 2-amino-1*H*-imidazol. Gre za najpočasnejši korak opisane transformacije. Medtem ko dehidracija nekaterih 2-amino-5(4)-hidroksiimidazolidinov **E** poteka spontano že pri sobni temperaturi, je bila pri ostalih potrebna višja temperatura. Da se ne bi prvi korak zaustavil, so izvedli reakcije pri temperaturi 100 °C.^[13]



Slika 17: Predlagani mehanizem preureditve tipa Dimroth 2-hidroksi-2,3-dihidro-1H-imidazo[1,2- α]pirimidin-4-ijeve soli.^[13]

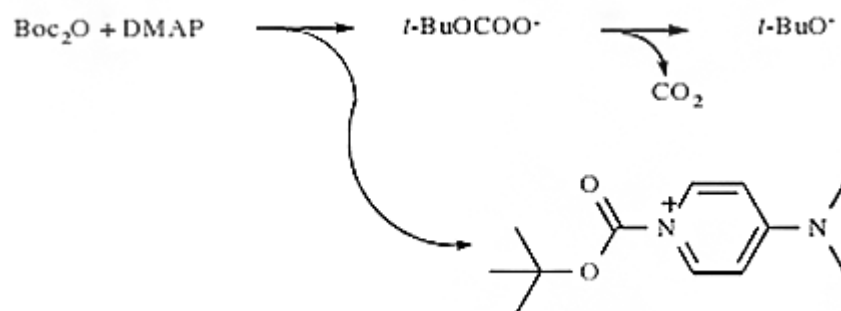
Najuspešnejša metoda priprave 4-(4-nitrofenil)-1H-imidazol-2-amina (**2**), ki smo jo uporabili tudi sami, je reakcija s hidrazin hidratom pod pogoji obsevanja z mikrovalovi v absolutnem etanolu. Gre za hitro in enostavno reakcijo z visokim izkoristkom (77 %). K temu prispeva tudi dobra topnost začetne spojine v absolutnem etanolu. Poleg tega se absolutni etanol pogosto uporablja pri reakcijah, kjer je prisotnost vode nezaželena in je na splošno dobro topilo za alkalioide.

5.2. ZAŠČITA AMINSKE SKUPINE Z BOC SKUPINO

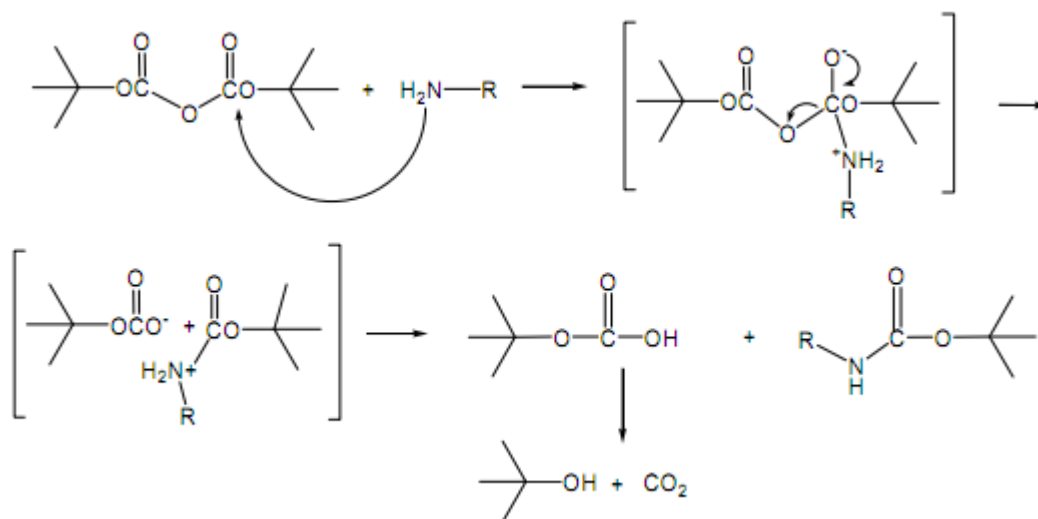
V tretji stopnji reakcije smo želeli spojini **2** zaščititi NH skupino 1H-imidazola, kar pomeni, da smo jo skušali pretvoriti v neko drugo funkcionalno skupino, ki pri načrtovani reakciji ne bo reagirala. Amini so srednje močne baze in odlični nukleofili, zaradi česar jih moramo zaščititi, kadar imamo opravka z elektrofilni ali s kislimi reakcijskimi pogoji. Amino skupino najpogosteje zaščitimo v obliki metil, benzil ali tercbutil karbamatov. Uspelo nam je z uporabo di-*terc*-butildikarbonata (BOC_2O), dodatkom katalizatorja DMAP (nukleofil in močna baza) in segrevanjem pri temperaturi 60 °C, pri čemer je nastal BOC zaščiten derivat **3**. Zaradi slabše topnosti smo večkrat dodajali metanol, saj se je spojina zelo hitro oborila in že

po nekaj minutah spremenila v spojino z intenzivno rumeno barvo. Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne adicije in eliminacije (slika 19). Aminska skupina napade BOC skupino in nastane vmesni intermedat, ki v nadaljevanju reagira do *tert*-butilnega estra ogljikove kisline, ki se nato še razcepi na CO₂ in *tert*-butanol. Dobili smo visok izkoristek reakcije (89.2 %), saj ni prišlo do nastanka stranskih produktov. Poleg tega je bil končni produkt dovolj čist, da smo nadaljevali z reduciranjem nitro skupine.

V reakciji s katalizatorjem DMAP in BOC anhidridom nastane aktiviran acilni derivat in stranski produkt *tert*-butoksikarboksilatna skupina. Ta se ob odcepu CO₂ pretvori v *tert*-butilat (slika 18).^[22]



Slika 18: Mehanizem reakcije DMAP-a z BOC anhidridom.^[22]

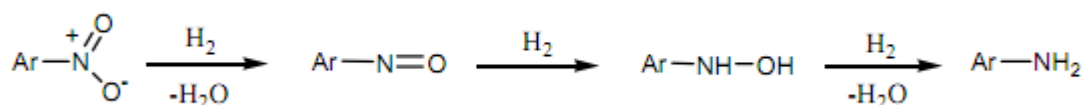


Slika 19: Mehanizem zaščite aminske skupine z uporabo di-*tert*-butildikarbonata.^[14]

5.3. REDUKCIJA NITRO SKUPINE

Za reakcijo redukcije nitro skupine v amsko skupino smo izbrali katalitsko hidrogeniranje z uporabo katalizatorja paladija na ogljiku (Pd/C), katerega prednost so številne pore in posledično velika specifična površina, kamor se lahko adsorbira vodik. Gre za reakcijo v vodikovi atmosferi, kjer vodik predstavlja enega od reaktantov. Ker vodik tvori s kisikom eksplozivne zmesi, moramo biti pri izvedbi hidrogeniranja zelo natančni in previdni, zlasti v začetni in končni fazi, ko lahko pride do mešanja vodika z zrakom.

Spojina reagira z vodikom ob prisotnosti Pd/C, kot topilo pa smo uporabili tetrahidrofur (THF), s katerim lahko vplivamo na potek reakcije ter na topnost reaktanta in vodika. Reakcije redukcije nitro skupine s katalitskim hidrogeniranjem veljajo za reakcije s kvantitativnim potekom, visokim izkoristkom (95.4 %) in potečejo v relativno kratkem času (30-60 minut). Med potekom reakcije se je pojavljala le ena lisa na TLC, ki je bila nižja od izhodne.



Slika 20: Mehanizem redukcije nitro skupine v amsko skupino.^[14]

Poleg katalitskega hidrogeniranja pa lahko reduciramo nitro skupine v amsko skupino tudi z drugimi metodami, na primer z uporabo kovin (Fe, Zn, Sn) in njihovimi solmi (SnCl₂) ter z uporabo natrijevih sulfidov.

- **Sn in SnCl₂** se uporabljata predvsem za redukcijo nitro skupine v amsko skupino, pri čemer SnCl₂ v zmesi ledocta in etra, nasičeni s plinastim HCl, ne reducira aldehydov in ketonov.
- **Fe in njegove soli** se uporabljajo za redukcijo nitro skupine v amsko skupino. Ob prisotnosti železovih opilkov in HCl se poleg nitro skupine reducira tudi aldehydna skupina do

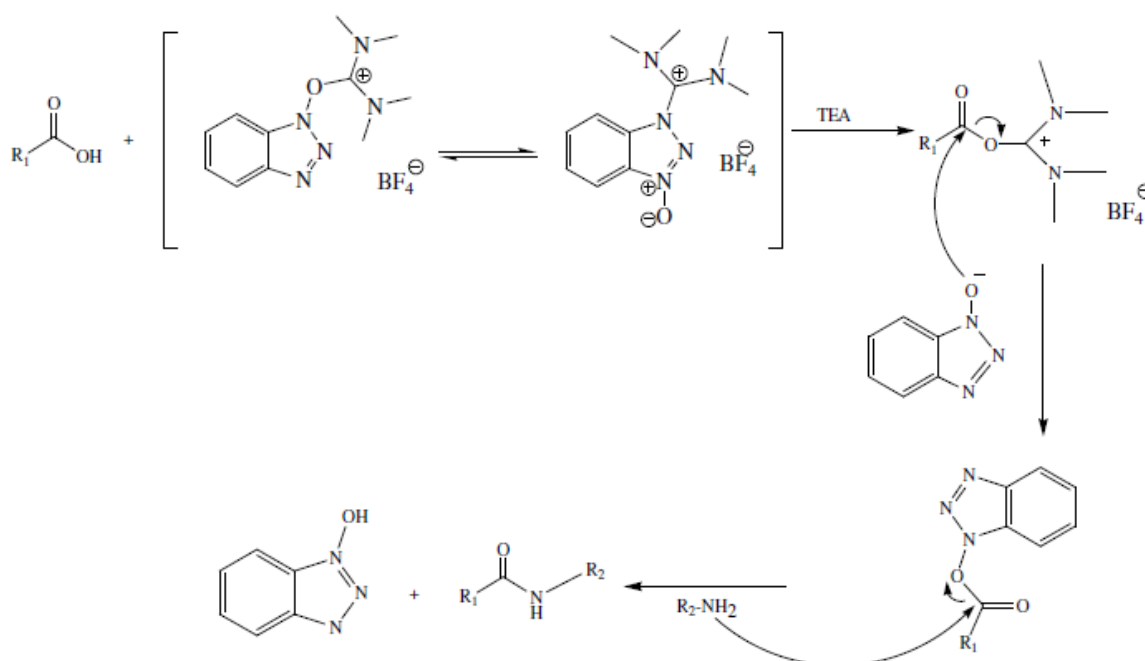
alkohola. FeSO_4 pa nam omogoča selektivno redukcijo nitro skupine v aminske skupine tudi ob prisotnosti aldehydne skupine.^[23]

- **Redukcije z natrijevimi sulfidi:**

Sulfidi (Na_2S , NaHS) so eni izmed najmilejših reducentov, ki jih uporabljamo predvsem za redukcijo nitro in azo spojin v amine, še posebno takrat, ko imamo v molekuli občutljive skupine. Pri redukciji z Na_2S nastaja NaOH , zato postanejo reakcijske zmesi močno alkalne. Če se hočemo temu izogniti, uporabimo hidrogensulfid – NaHS .^[23]

5.4. TVORBA AMIDNE VEZI

V naslednji stopnji smo z različnimi kislinami izvedli tvorbo amida na aromatskem aminu spojine **4**. Gre torej za amidno vez; kemijsko vez, ki nastane z vezavo karboksilne kisline ene in aminske skupine druge molekule, pri čemer se sprosti molekula vode. »Coupling« reagenti se uporabljajo za *in-situ* aktivacijo karboksilne skupine. Z industrijskega in okoljskega vidika bi moral vsebovati določene lastnosti, kot so: visoka učinkovitost, delovanje v stehiometričnih količinah in topnost v uporabljenem topilu. Aktivacijo karboksilne kisline je lahko doseči bodisi s pretvorbo v bolj reaktivne funkcionalne spojine, kot so: acil halogenidi, anhidridi in acil azidi.^[24] Za neposredno aktivacijo kislin (BOC-D-prolin, BOC-L-prolin, indol-2-karboksilna kislina in pirol-2-karboksilna kislina) smo uporabili enega najbolj pogostih »coupling« reagentov, TBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat). Pri reakciji med kislino in TBTU se le-ta aktivira (slika 21) in se nato veže z izhodno spojino **4** do končnega amida. V reakcijsko zmes smo dodali tudi bazičen N-metil morfolin, ki poskrbi za ionizacijo karboksilne kisline.



Slika 21: Mehanizem aktivacije karboksilne kisline s pomočjo TBTU in tvorba amida.^{27]}

Spojine smo pripravili z nizkim izkoristkom, kar lahko pripišemo nastanku stranskih produktov (to smo opazili na TLC-kromatogramu). Pri reakciji moti predvsem imidazol 2-aminska skupina, ker prav tako spada med nukleofilne skupine kot aromatska aminska skupina.

5.5. ODSTRANITEV DI-*TERC*-BUTILDIKARBONATA (BOC ZAŠČITE) Z ACIDOLIZO

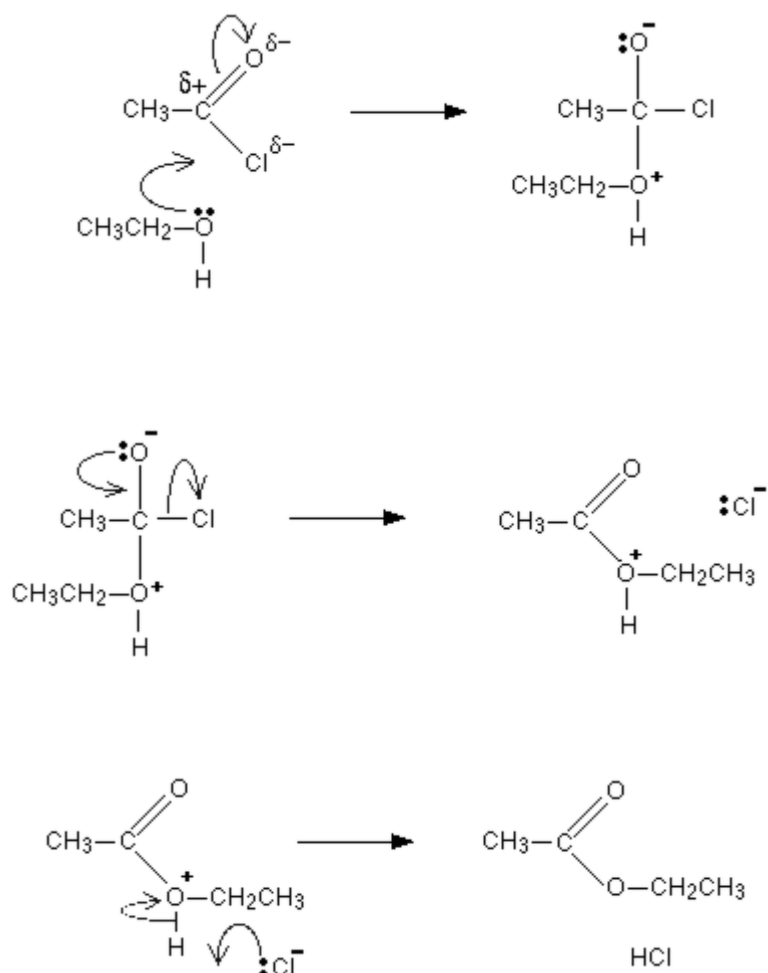
Odstranitev BOC zaščite je mogoče doseči z močnimi kislinami, kot so trifluoroocetna kislina ali s klorovodikovo kislino. Sami smo uporabili metodo z acetilkloridom.

Acetilklorid reagira takoj, ko pride v stik z ohlajenim etanolom. Pri tem nastane etilacetat (ester) in HCl. HCl je v organskih topilih uporaben reagent za mnoge reakcije, predvsem tiste, ki vključujejo nastanek aaminskih soli, esterifikacijo karboksilne kisline in odstranitev zaščitnih skupin (BOC zaščitne skupine). Glavna pomanjkljivost uporabe plinastega HCl izhaja iz

velikih presežkov kisline v raztopini, saj so organska topila tako nasičena s plinastim HCl. Poleg tega uporabo plinaste HCl spremlja korozija plinskih ventilov in ostali učinki zaradi uhajanja plina po nasičenju topil. HCl pa je po drugi strani veliko bolj uporabna z ekonomskega vidika kot trifluoroocetna kislina.^[25]



Slika 22: Reakcija med acetilkloridom in etanolom.^[15]



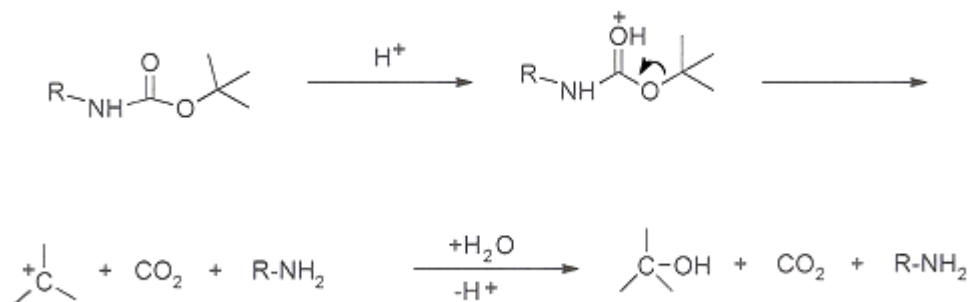
Slika 23: Mehanizem nukleofilne adicije in eliminacije v reakciji med acetilkloridom in alkoholom.^[15]

Prva stopnja reakcije vključuje nukleofilni napad na pozitivni atom ogljika z enim od parov kisika na molekuli etanola.

Druga stopnja poteka v dveh korakih. V prvem koraku nastane C=O vez, medtem ko izstopi kloridni ion. Temu sledi odstranitev vodikovega iona (protona) do končnega nastanka etilacetata in vodikovega klorida (slika 23).

V kislem BOC zaščita zreagira do *tert*-butanola in CO₂. Karbokation, ki nastane pri cepitvi BOC, je stabiliziran zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin (slika 24).^[16]

Po končani reakciji smo topilo odparili, dodali nekaj kapalk etra in postavili v hladilnik. Nato smo jih odfiltrirali s pomočjo podtlaka in večkrat sprali z etrom, da smo dobili čimbolj čisto spojino. Produkta **9** in **10** sta v obliki soli s klorovodikovo kislino in sta trdni spojini. Pri spojini **6** pa smo imeli težave pri filtriranju, saj smo ugotovili, da gre za higroskopno snov (snov, ki po stiku z običajno atmosfero veže nase zračno vlogo).



Slika 24: Mehanizem odstranitve BOC-zaščite v kislem.^{[14]F}

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali 2-aminoimidazolske derivate nevrotoksina klatrodina v obliki soli s HCl: 4-(4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**9**), 4-(4-(1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**10**) in 2-amino-4-(4-(pirolidin-1-2- karboksamido)fenil)-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**11**).

Tvorba 4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-2-amina (**2**) je dober sintezni pristop, saj je reakcija potekla že v 15 minutah v mikrovalovnem reaktorju in z visokim izkoristkom. Na koncu smo produkt le še očistili s kolonsko kromatografijo.

Najprimernejša metoda za zaščito aminske skupine spojine **2** je uporaba di-*terc*-butildikarbonata (BOC₂O). Gre za enostavno reakcijo s pomočjo katalizatorja DMAP in segrevanja, saj smo že po intenzivni spremembi barve lahko sklepali, da je nastal BOC zaščiten derivat **3**. Le-tega smo nato reducirali v amino skupino s pomočjo katalitskega hidrogeniranja.

Novo nastali amin, *terc*-butil 2-amino-4-(4-aminofenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**4**), je služil kot izhodna spojina produktom **5**, **6**, **7**. in **8**. Gre za spojine, ki imajo poleg osnovnega skeleta v svoji strukturi z BOC anhidridom zaščiten amino skupino, amidno vez in različne heterocikle (pirolidin, pirol ali indol).

Na koncu smo morali 2-aminoimidazolskim derivatom le še odstraniti BOC zaščito. Ugotovili smo, da je zato potreben kisel medij in tako smo uporabili absolutni etanol in kislinski klorid (acetilklorid). Produkta ni bilo potrebno očistiti, dovolj je bilo večkratno spiranje z etrom in filtracija za izolacijo spojin. Ker je spojina **6** zelo higroskopska, smo imeli težave pri njeni izolaciji in čiščenju. Pomagali smo si tako, da spojine nismo prefiltrirali. Topilo smo odparili na rotavaporju, spojino pa večkrat sprali z etrom. Spojina je nato po stiku z običajno atmosfero vezala nase zračno vlago.

Za sintetizirane analoge klatrodina pričakujemo, da se bodo vezali na iste tarče kot klatrodin.

7. LITERATURA

1. Roberts, F. M.; Wink, M. Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. Plenum Press, New York; 1998; 11-14.
2. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Alkaloid> (april 2011)
3. Aniszewski, T. Alkaloids - Secrets of life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Radarweg 29, PO B0x 211, Amsterdam, The Netherlands, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, UK, 1st Ed, 2007; 1-13, 105, 112, 170.
4. Fattorusso, E.; Tagliatela, S. O. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008; 3-14, 16, 271-273.
5. Forte, B.; Malgesini, B.; Piutti, C.; Quartieri, F.; Scolaro, A.; Papeo, G.: A Submarine Journey: The Pyrrole - Imidazole Alkaloids. Marine Drugs, 2009, 7, 705-753.
6. Al-Sabi, A.; Mcarthur, J.; Ostroumov, V.; French, J. R. Marine Toxins That Target Voltage – gated Sodium Channels. Marine drugs, 2006; 4, 157-192.
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Agelas_clathrodes (junij 2011)
8. Ermolat'ev, D. New Approaches to 2-Aminoimidazoles and Their Derivatives. Doktorska disertacija. Faculteit Wetenschappen, Heverlee, 2008.
9. Richards, J. J.; Melander, C. Small Molecule Approaches Toward the Non - Microbicidal Modulation of Bacterial Growth and maintenance. Anti – Infective Agents in Medicinal Chemistry, 2009; 8, 295 – 314.

10. Sullivan, J. D.; Looper, R. E.; Looper, G. 2-Aminoimidazoles from Leucetta Sponges: Synthesis and Biology of an Important Pharmacophore. *Current Bioactive Compounds*, 2009; 5, 7 – 14.
11. Chanas, B.; Pawlik, R. J.; Lindel, T.; Fenical, W. Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208, 1996; 186 – 187.
12. Cesarec, P. Izolacija vodotopnih biološko aktivnih snovi iz tropskih m.orskih spužev. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2009.
13. Ermolat'ev, D. S.; Van der Eycken E. V. A divergent Synthesis of Substituted 2 – Aminoimidazoles from 2 – Aminopyrimidines. *JOC Article*, 2008; 73, 6691-6697.
14. Stanonik, V. Sinteza 3-aminobenzensulfoniltreoninskih inhibitorjev ligaz Mur. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2009.
15. <http://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/alcohol.html> (avgust 2011)
16. Turk, T. Mikrob in patogeneza – toksikoze: slikovno gradivo in teze predavanj za študente mikrobiologije, s. l. : samozal., 2003.
17. http://3.bp.blogspot.com/_9fGSBvHreQs/SIItkXVhxMI/AAAAAAAAACY/A6HsBk0lbtM/s320/hordenine.bmp (avgust 2011)
18. http://www.erowid.org/chemicals/mescaline/images/archive/mescaline_2d.gif (avgust 2011)
19. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c6/Solanidine.PNG/800px-Solanidine.PNG> (avgust 2011)

20. <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/tilling/caffeine2Dimp.GIF> (avgust 2011)
21. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b1/Theobromin_-_Theobromine.svg/220px-Theobromin_-_Theobromine.svg.png (avgust 2011)
22. Dalpozzo, R.; Bartoli, G.; Bosco, M.; Melchiorre, P.; Sambri, L. Recent Development about the Use of Pyrocarbonates as Activator in Organic Synthesis: A Review. *Current Organic Synthesis*, 2009, 6, 79-101.
23. Sollner, M.; Pečar S. Vaje iz farmacevtske kemije, 2. dopolnjena izdaja, Fakulteta za farmacijo Ljubljana, 2003: 91-94.
24. Balalaie, S.; Mahdidoust, M.; Eshaghi-Najafabadi R. 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate as an Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Phenylhydrazation of CarboxylicAcids at Room Temperature. *J. Iran. Chem. Soc.*, Vol. 4, No. 3, 2007: 364-369.
25. Nudelman, A.; Bechor, Y.; Falb, E.; Fischer, B.; Wexler, B.A. Acetyl chloride-methanol as a convenient reagent for: A) Quantitative formation of amine hydrochlorides, B) carboxylate ester formation, C) mild removal of N-t-BOC-protective group. *Synthetic communications*, 1998, 28(3), 471-474.