

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**MAJA PODLIPNIK**

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA 1,2,4-OKSADIAZOLNIH  
ANALOGOV RESVERATROLA**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



**MAJA PODLIPNIK**

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA 1,2,4-OKSADIAZOLNIH  
ANALOGOV RESVERATROLA**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF 1,2,4-OXADIAZOLE  
ANALOGS OF RESVERATROL**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2014

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Žigi Jakopinu, mag.farm. za izkazano zaupanje, ves vložen čas, potrpežljivost, neprecenljivo strokovno vodenje ter vsestransko pomoč pri nastajanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi tako ali drugače pomagali pri opravljanju eksperimentalnega dela.

Posebno zahvalo namenjam fantu Tadeju, družini in prijateljem, ki so me tekom študija neprestano spodbujali, mi stali ob strani in verjeli vame. Hvala vsem!

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Maja Podlipnik

Predsednik komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Članica komisije: izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

# VSEBINA

<b>POVZETEK .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. RESVERATROL.....	1
1.1.1. Struktura in naravni viri .....	2
1.1.2. Farmakokinetične lastnosti.....	3
1.1.3. Farmakodinamične lastnosti / mehanizmi delovanja .....	3
1.2. ANALOGI RESVERATROLA.....	7
1.2.1. Nekateri znani sintezni analogi resveratrola .....	8
1.3. BIOIZOSTERIJA .....	9
1.4. 1,2,4-OKSADIAZOLI .....	10
1.4.1. Reaktivnost 1,2,4-oksadiazolov .....	11
1.4.2. 1,2,4-oksadiazoli kot biološko aktivne spojine .....	12
1.4.3. Sinteza 1,2,4-oksadiazolov.....	13
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIALI .....	18
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Kromatografske metode .....	18
3.2.2. Spektroskopske metode.....	20
3.2.3. Določanje tališča .....	20
3.2.4. Biološko testiranje spojin .....	20
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>22</b>
4.1. REAKCIJSKE SHEME .....	22

4.2. SINTEZA 2,4-DIACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (1) .....	24
4.3. SINTEZA 2,3-DIACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (2) .....	25
4.4. SINTEZA 3,4-DIACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (3) .....	26
4.5. SINTEZA 3-ACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (4) .....	27
4.6. SINTEZA 4-ACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (5) .....	28
4.7. SINTEZA 4-HIDROKSIBENZAMIDOKSIMA (6) .....	29
4.8. POSKUS SINTEZE 4-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL)-1,3-FENILEN DIACETATA (7) .....	30
4.9. SINTEZA 4-(5-METIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) FENOLA (8) .....	31
4.10. SINTEZA 4-(KLOROKARBONIL) FENILACETATA (9) .....	32
4.11. POSKUS SINTEZE 4-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL) FENILACETATA (10) .....	33
4.12. SINTEZA 4,4'-(1,2,4-OKSADIAZOL-3,5-DIIL) DIFENOLA (11) .....	34
4.13. SINTEZA 4-(5-(3,5-DIMETOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) FENOLA (12) .....	36
4.14. SINTEZA 3-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL) FENOLA (13) .....	38
4.15. SINTEZA 4-(5-(2,4-DIMETOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) FENOLA (14) .....	40
4.16. SINTEZA 5-(3,5-DIMETOKSIFENIL)-3-(4-METOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOLA (15) .....	41
4.17. SINTEZA 5-(2,4-DIMETOKSIFENIL)-3-(4-METOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOLA (16) .....	42
4.18. SINTEZA 5-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL) BENZEN-1,3-DIOLA (17) .....	44
4.19. SINTEZA 4-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL)-3-METOKSIFENOLA (18) .....	45
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>47</b>

5.1. SINTEZNI POSTOPKI .....	47
5.1.1. Zaščita in odščita OH-skupine hidroksibenzojskih kislin .....	47
5.1.2. Sinteza amidoksima.....	48
5.1.3. Sinteza 1,2,4-oksadiazolnega obroča .....	48
5.1.4. Uvedba in odstranitev metilne skupine na fenolno OH-skupino .....	52
5.2. TESTIRANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA .....	53
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>60</b>

## POVZETEK

Resveratrol je naravni antioksidant, ki spada v podskupino polifenolov, imenovano stilbeni in izkazuje številne raznolike biološke učinke. Sintetizira se v številnih rastlinah, največ pa ga najdemo v grozdju.

V okviru magistrske naloge smo z različnimi sinteznimi postopki sintetizirali 1,2,4-oksadiazolne analoge resveratrola, z namenom, da bi ohranili njegove biološke učinke in hkrati izboljšali njegove farmakokinetične lastnosti. 1,2,4-oksadiazolni obroč smo uporabili kot bioizosterno zamenjavo stilbenske dvojne vezi C=C. Za sintezo 1,2,4-oksadiazolnega obroča smo uporabili sintezno metodo ciklizacije *O*-acilamidoksimov sintetiziranih z aciliranjem 4-hidroksibenzamidoksim (spojina **6**) z različnimi benzojskimi kislinami. Sintezo 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola smo izvedli v dveh stopnjah.

V prvi stopnji smo sintetizirali *O*-acilamidoksim. Za aktivacijo kisline se je v tej stopnji najbolje obnesel sklopitveni reagent TBTU ob prisotnosti *N*-metilmorfolina (NMM), kot reakcijsko topilo pa mešanica topil acetonitrila (ACN) in tetrahidrofurana (THF). Reakcijski zmesi smo dodali tudi katalizator reakcije 4-dimetilaminopiridin (DMAP). V drugi stopnji pa smo izvedli ciklodehidracijo. Kot reakcijsko topilo se je v tej stopnji najbolje obnesel dioksan, za čim boljši potek ciklizacije pa je bil potreben dodatek tetrabutilamonijevega fluorida (TBAF) in KF.

Spojina **11** (4,4'-(1,2,4-oksadiazol-3,5-diil)difenol) je izkazovala najboljše antioksidativno delovanje, ki je bilo celo boljše od resveratrola in zato lahko služi kot osnova za nadaljnjo optimizacijo.

**Ključne besede:** resveratrol, antioksidativno delovanje, 1,2,4-oksadiazol, bioizosterija

## ABSTRACT

Resveratrol is a natural antioxidant that belongs to a subgroup of polyphenols, named stilbenes and exhibits a number of various biological effects. It is synthesized in a number of plants, however, the highest amount is found in grapes.

In the framework of my thesis we used different synthetic methods to synthesize 1,2,4-oxadiazole analogues of resveratrol, with the purpose to retain its biological effects and to improve its pharmacokinetic properties. 1,2,4-oxadiazole ring was used as bioisosteric replacement of the stilbenic double bond C = C. For the synthesis of 1,2,4-oxadiazole ring the synthetic method of cyclization *O*-acylamidoximes, obtained from acylation of 4-hydroxybenzamidoxime (compound **6**) with a variety of benzoic acids was used. The synthesis of 1,2,4-oxadiazole analogues of resveratrol was carried out in two stages.

In the first step we have synthesized *O*-acylamidoximes. In this stage the most effective coupling reagent for the activation of the acid was TBTU in the presence of *N*-methylmorpholine (NMM), while the mixture of acetonitrile (ACN) and tetrahydrofuran (THF) was chosen as the best reaction solvent. A catalyst for the reaction 4-dimethylaminopyridine (DMAP) was also added in the reaction mixture. In the second stage cyclodehydration of the *O*-acylamidoximes was carried out. The best reaction solvent in this stage was dioxan, and to optimize the cyclization process, the addition of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) and KF was pivotal.

Compound **11** (4,4'-(1,2,4-oxadiazol-3,5-diyl)diphenol) had the best antioxidant activity which was even better than that of resveratrol and therefore represents a good starting point for further optimization.

**Keywords:** resveratrol, antioxidant activity, 1,2,4 –oxadiazole, bioisosterism

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>AP-1</b>	<i>activator protein 1</i> – aktivatorski protein 1
<b>Apo B</b>	apolipoprotein B
<b>CDI</b>	<i>1,1'-carbonyldiimidazole</i> – karbonildiimidazol
<b>COX-2</b>	<i>cyclooxygenase-2</i> – ciklooksigenaza 2
<b>d</b>	dublet
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMAP</b>	<i>4-dimethylaminopyridine</i> – 4-dimetilaminopiridin
<b>DMF</b>	<i>dimethylformamide</i> – dimetilformamid
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid
<b>eq</b>	ekvivalent
<b>eNOS</b>	<i>endothelial nitric oxide synthase</i> – endotelijska dušikov oksid sintaza
<b>GSH</b>	glutation
<b>Hb</b>	hemoglobin
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i> – visokoločljivostna tekočinska kromatografija
<b>HR-MS</b>	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>IKK</b>	<i>inhibitor of kappa B kinase</i> – IκB kinaza
<b>IL</b>	<i>interleukin</i> – interlevkin
<b>IR</b>	<i>infrared spectroscopy</i> – infrardeča spektroskopija
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> – c-Jun N-terminalna kinaza
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i> – lipoprotein z nizko gostoto
<b>m</b>	multiplet
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinases</i> – z mitogenom aktivirane protein kinaze
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>Mr</b>	molekulska masa
<b>MS</b>	<i>mass spectrometry</i> – masna spektrometrija
<b>NF-κB</b>	<i>nuclear factor-light-chain enhancer of activated B cells</i> – jedrni faktor κB
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
<b>QR 1</b>	<i>quinone reductase 1</i> – kinon reduktaza 1; citoprotektivni encim

<b>Rf</b>	retencijski faktor
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove zvrsti
<b>s</b>	singlet
<b>SERM</b>	<i>selective estrogen-receptor modulator</i> – selektivni modulator estrogenskih receptorjev
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza
<b>SULT</b>	<i>sulfotransferase</i> – sulfotransferaza
<b>T</b>	temperatura
<b>t</b>	triplet
<b>TBTU</b>	<i>N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat</i>
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
<b>TMS</b>	tetrametilsilan
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>tumor necrosis factor-alpha</i> – dejavnik tumorske nekroze alfa
<b>TNFR</b>	<i>tumor necrosis factor receptor</i> – receptor dejavnika tumorske nekroze
<b>UGT</b>	<i>uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase</i> – UDP-glukuronil transferaza
<b><math>\delta</math></b>	kemijski premik

# 1. UVOD

Rastline imajo sposobnost, da proizvajajo mnogo raznolikih naravnih spojin z nizko molekulsko maso. To so tako imenovani sekundarni metaboliti rastlin. Večina teh spojin igra pomembno vlogo pri obrambi rastlin proti raznim infekcijam in dejavnikom okolja, ki povzročajo stres [1].

Znana sta dva tipa protimikrobnih sekundarnih metabolitov, in sicer fitoleksi in fitoanticipini. Fitoanticipini so inhibitorji infekcije, ki jih rastline sintetizirajo že pred stikom z mikroorganizmom, medtem ko se fitoleksi sintetizirajo in kopičijo v rastlinah, šele kot odgovor na infekcijo [1]. Eden izmed bolj poznanih fitoleksinov je tudi resveratrol, naravni antioksidant, ki spada v podskupino polifenolov, imenovano stilbeni. Sintetizira se v številnih semenkah, kot so japonski dresnik, borovnice, smreka, jelka, evkaliptus, lilija, vinska trta in druge, kot odziv na stres, poškodbe, ultravijolično sevanje in glivične infekcije [2].

## 1.1. RESVERATROL

Resveratrol so prvič odkrili leta 1939 v koreninah strupene, a zdravilne bele čmerike (*Veratrum grandiflorum*), in kasneje leta 1963, ko so ga izolirali iz korenin japonskega dresnika (*Polygonum cuspidatum*), ki se uporablja v tradicionalni kitajski medicini. V vinski trti (*Vitis vinifera*) so ga, kot fitoleksin odkrili leta 1976, njegovo prisotnost v rdečem vinu pa so potrdili v devetdesetih letih prejšnjega stoletja [1, 2].



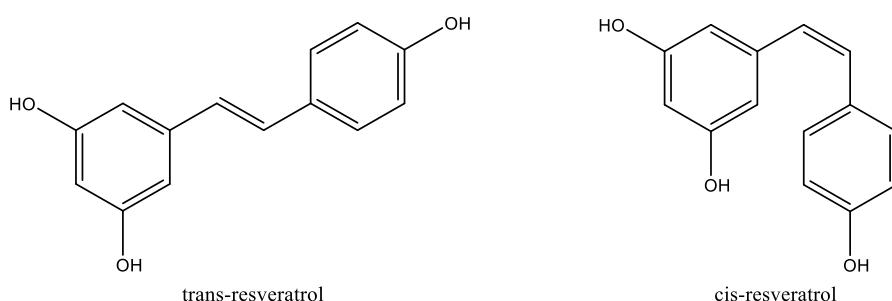
Slika 1: Bela čmerika (*Veratrum grandiflorum*) [3], japonski dresnik (*Polygonum cuspidatum*) [4], vinska trta (*Vitis vinifera*) [5]

Najzgodnejše ugotovitve o koristnih učinkih resveratrola na človeško telo izhajajo iz

epidemioloških študij o t.i. "francoskem paradoksu". Te študije so namreč razkrile obratno korelacijo med porabo rdečega vina in pojavnostjo bolezni srca in ožilja. Pojavnost bolezni srca in ožilja je v Franciji okoli 40% nižja kot v preostali Evropi, kljub prehrani, ki je tradicionalno bogata z nasičenimi maščobami. To je pripeljalo do ugotovitve, da je razlog v rdečem vinu, katerega aktivna substanca je ravno resveratrol [1, 2]. Znanstveno zanimanje za resveratrol pa se je občutno povečalo po letu 1997, ko so prvič dokazali, da resveratrol preprečuje karcinogenezo na več stopnjah [6].

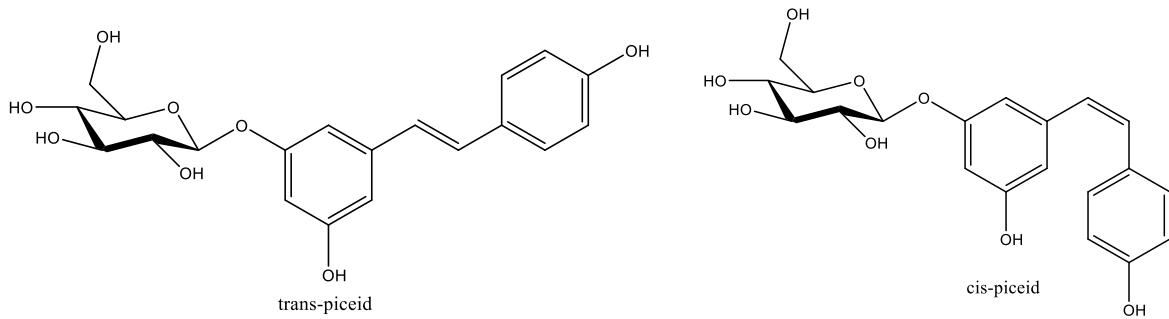
### 1.1.1. Struktura in naravni viri

Resveratrol je 3,5,4`-trihidroksistilben (derivat stilbena), ki v naravi obstaja v dveh stereoizomernih oblikah, *cis* in *trans* (slika 2). *Trans*-resveratrol je bolj stabilna in glavna naravna oblika, ki izraža močnejše biološke učinke. Po izpostavitvi UV sevanju (svetloba), kljub večji stabilnosti, *trans* oblika prehaja v *cis* obliko, kar imenujemo izomerizacija [1].



*Slika 2: Strukturni formuli trans-resveratrola in cis-resveratrola [1]*

Največ resveratrola v naravi najdemo v grozdju, kjer se sintetizira predvsem v povrhnjici listov in v lupini grozdnih jagod. Sveža lupina grozdnih jagod vsebuje 50 – 100 µg/g resveratrola. V proizvodnem procesu belih vin se lupine grozdnih jagod ne fermentirajo, saj jih predhodno odstranijo, zato le rdeča vina vsebujejo omembe vredne količine resveratrola. V lupini grozdnih jagod je prisoten v glikozidni oblikki (*cis*- in *trans*- piceid (slika 3)), v vinu pa kot *cis*- in *trans*-resveratrol [1, 2].



*Slika 3: Strukturni formuli trans-piceida in cis-piceida*

### 1.1.2. Farmakokinetične lastnosti

Resveratrol je neenakomerno bel prašek, ki je topen v lipofilnih medijih, etanolu in DMSO, v vodi je praktično netopen [7]. Številne študije na živalih in ljudeh so pokazale, da je biološka uporabnost resveratrola po peroralni aplikaciji zelo nizka, in sicer znaša manj kot 1 %. To je posledica obsežnega metabolizma prvega prehoda v tankem črevesu in jetrih. Zaradi njegove lipofilnosti se vsaj 75 % zaužitega resveratrola sicer hitro absorbira, vendar se tudi zelo hitro metabolizira s konjugacijo, in tvori predvsem glukuronide in sulfate [8]. Bakterije črevesne flore pa ga lahko pretvorijo tudi v njegov nasičen metabolit dihidroresveratrol. Črevesna absorpcija je zato nizka in vodi do nizkih koncentracij resveratrola v plazmi. Koncentracija v plazmi doseže svoj maksimum že 30 minut po zaužitju [9].

Slaba topnost v vodi lahko vpliva na porazdelitev resveratrola v telesu. Po plazmi se prenaša vezan na plazemske proteine, predvsem na albumin in lipoproteine. Glavni mehanizem prehoda v celice je pasivna transepitelna difuzija, lahko pa prehaja tudi preko vezave na nespecifične receptorje (aktivni transport). V celicah je prisoten predvsem v citoplazmi in celičnem jedru [10, 11].

### 1.1.3. Farmakodinamične lastnosti / mehanizmi delovanja

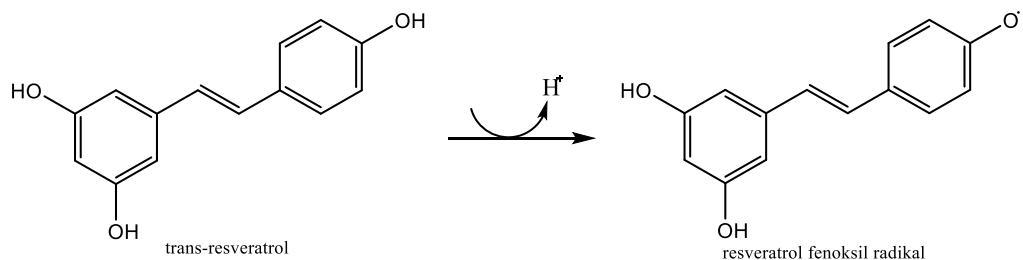
Številne *in vivo* in *in vitro* študije so pokazale, da resveratrol izkazuje raznolike biološke učinke in lahko prepreči ali upočasni napredovanje številnih patoloških stanj. Podaljša lahko tudi življenjsko dobo nekaterih organizmov in poveča odpornost na stres [9].

### **Antioksidativno delovanje**

Normalni celični metabolizem povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kot so superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in hidroksilni radikal ( $OH^-$ ) [2]. Prekomerno kopičenje ROS v telesu je kontrolirano s celičnim sistemom antioksidativnih encimov, med katere sodijo glutation reduktaza, glutation peroksidaza, superoksid dismutaza (SOD) in katalaza. Zmanjšana učinkovitost teh antioksidativnih encimov in/ali prekomerno nastajanje radikalov povzroči nenormalno kopičenje ROS v organizmu, ki škodljivo delujejo na celice in tkiva. To stanje imenujemo oksidativni stres. Rezultat oksidativnega stresa so škodljive oksidativne spremembe celičnih makromolekul (lipidi, proteini in nukleinske kisline), ki so odgovorne za vrsto pomembnih bolezni, kot so ateroskleroza, srčni infarkt, sladkorna bolezen, nevrodegenerativne bolezni in nekatere vrste raka [12].

Antioksidanti so različne snovi endogenega (encimski sistemi, npr. SOD) ali eksogenega izvora (vitamini, karoteni, polifenoli rastlinskega izvora itd.), ki preko različnih mehanizmov lahko upočasnijo, prekinejo ali preprečijo oksidacijo pomembnih celičnih makromolekul in na ta način varujejo celice pred oksidativnimi poškodbami [13].

Eden izmed naravnih antioksidantov eksogenega izvora je tudi resveratrol. Fenolne skupine resveratrola, zaradi redoks lastnosti, lahko sprejmejo elektron kar vodi do nastanka resveratrol fenoksil radikala (slika 3), ki je bolj stabilen kot ROS, s čimer se prekine veriga reakcij oksidacije [14].



*Slika 4: Nastanek resveratrol fenoksil radikala [15]*

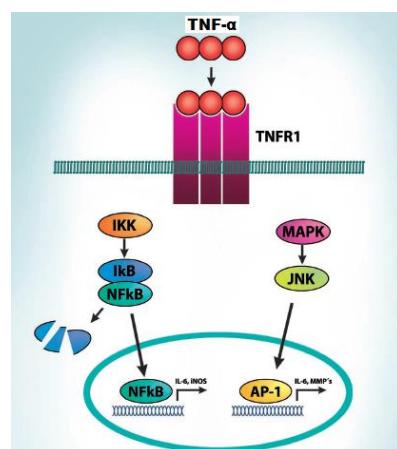
Antioksidativno delovanje resveratrola temelji na povečanju aktivnosti antioksidativnih celičnih encimov in zmanjšanju aktivnosti encimov, ki igrajo pomembno vlogo pri proizvodnji ROS, hkrati pa je tudi lovilec radikalov [9].

## Protivnetno delovanje

Protivnetno delovanje resveratrola je posledica inhibicije citokinskega odziva oziroma odziva akutne faze. Citokinski odziv je mehanizem prirojene imunosti, do katerega pride pri nastanku vnetja v organizmu. Citokini so beljakovine, poznani tudi kot mediatorji vnetja, ki jih izločajo aktivirani makrofagi in limfociti. Zanje velja, da skrbijo za rast, razvoj in regulacijo celic imunskega sistema. Najpomembnejša citokina sta dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in interlevkin-1 (IL-1), ki spodbujata vnetne procese [16].

TNF- $\alpha$  primarno nastaja kot transmembranski protein, nato se proteolitsko cepi in sprošča. Sintetizira se kot odziv na vnetje, infekcijo ali druge stresne dejavnike iz okolja. Svoje raznolike biološke učinke posreduje preko vezave na dva različna receptorja: TNF- $\alpha$  receptor tipa I (TNFR1) in TNF- $\alpha$  receptor tipa II (TNFR2) [17].

Vezava TNF- $\alpha$  na TNFR1 sproži zaporedje dogodkov, vključno z aktivacijo številnih z mitogeni aktiviranih protein kinaz (MAPK) [17]. Posledično pride tudi do aktivacije c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) in aktivatorskega proteina 1 (AP-1) (slika 4) [18]. AP-1 je transkripcijski faktor, ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju izražanja genov, pri odzivu telesa na razne dražljaje, kot so vnetje, stres, bakterijske in virusne infekcije. Udeležen je pri številnih celičnih procesih, vključno s celično diferenciacijo, proliferacijo in apoptozo [19]. Drugi pomembnejši dogodek vezave TNF- $\alpha$  na TNFR1, je aktivacija jedrskega faktorja kB (NF- $\kappa$ B). Vezava TNF- $\alpha$  na TNFR1 sproži aktivacijo I $\kappa$ B-kinaze (ang. inhibitor of kappa B kinase; IKK). Aktivirana IKK fosforilira I $\kappa$ B $\alpha$  v kompleksu NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B, posledično se aktivirane beljakovine NF- $\kappa$ B sprostijo iz kompleksa in potujejo iz citoplazme v jedro, kjer pride do aktivacije izražanja številnih genov, ki so vključeni v celično proliferacijo, preživetje in vnetni odgovor (slika 4) [17].



Slika 5: S TNF- $\alpha$  inducirana aktivacija AP-1 in NF- $\kappa$ B [18]

Povečana sinteza TNF- $\alpha$  v telesu, je tako povezana z razvojem mnogih kliničnih stanj, pri katerih je prisotno vnetje, npr. astma, rak, diabetes, artritis in vnetna črevesna bolezen. Resveratrol je naravni produkt, ki znatno inhibira sproščanje TNF- $\alpha$  iz aktiviranih makrofagov, in na ta način zmanjša njegovo raven v telesu. Posledično zmanjša izražanje tudi nekaterih drugih pomembnih vnetnih označevalcev (npr. AP-1 in NF- $\kappa$ B), ki so udeleženi v izražanju TNF- $\alpha$  in zavre odziv imunskega sistema [17].

### **Bolezni srca in ožilja**

Resveratrol prepreči ali upočasni napredovanje bolezni srca in ožilja. S tem, da poveča aktivnost večine antioksidativnih encimov (glutation peroksidaza, hem-oksigenaza, SOD) v srčno-žilnih celicah, zmanjšuje oksidativni stres in na ta način preprečuje oksidacijo lipoproteina nizke gostote (LDL – low density lipoprotein). Inhibira tudi oksidacijo polinenasičenih maščobnih kislin, ki jih najdemo v LDL [9] in zmanjšuje znotrajcelično koncentracijo apolipoproteina B (Apo B), ki omogoča vezavo LDL na receptor, kar povzroči pomembno zmanjšanje izločanja holesterolnih estrov in trigliceridov iz jeter v kri [1, 2]. Resveratrol vpliva tudi na agregacijo trombocitov, saj jo zmanjšuje ter inhibira vnetne procese v srčno-žilnih celicah. Deluje tudi vazodilatorno in znižuje krvni tlak. Ima sposobnost, da poveča aktivnost endotelne NO-sintaze (eNOS), ki katalizira sintezo dušikovega oksida (NO), ki je eden najpomembnejših lokalnih vazodilatatorjev [1, 9].

### **Sladkorna bolezen**

Resveratrol naj bi po nekaterih raziskavah na živalih, zaradi svojega antioksidativnega delovanja, vplival tudi na upočasnitev razvoja sladkorne bolezni tipa 2. Oksidativni stres namreč lahko privede do odpovedi  $\beta$ -celic trebušne slinavke, ki izločajo insulin, in do povišane koncentracije oksidirane glukoze v krvi [1, 9]. Resveratrol lahko zmanjša izločanje insulina, s tem se zmanjša koncentracija insulinu v krvi in zakasni nastanek resistance na insulin [14]. Spodbuja tudi jetrno sintezo glikogena in privzem glukoze v razna tkiva, posledično se zniža koncentracija glukoze v krvi, izboljša pa se tudi občutljivost na insulin [8].

### **Protirakavo delovanje**

Številne obširne študije s katerimi so preučevali učinke resveratrola na več vrst rakavih celic so pokazale, da je njegovo protirakavo delovanje močno povezano z njegovimi

antioksidativnimi lastnostmi [8]. Karcinogenezo preprečuje na vseh stopnjah: iniciacija, promocija in progresija [11]. V visokih dozah sproži apoptozo v rakavih celicah in s tem zmanjša sposobnost celic za življenje. Inhibira lahko tudi proliferacijo in angiogenezo rakavih celic ter s tem prepreči napredovanje raka oziroma rast tumorjev. Resveratrol lahko znatno upočasni ali prepreči tudi metastaziranje [1].

Deluje lahko tudi kot fitoestrogen. Fitoestrogeni so spojine, ki jih najdemo v rastlinah in se vežejo na estrogenske receptorje ter delujejo podobno kot estrogeni, ženski spolni hormoni [20]. Ima podobno strukturo kot dietilstilbestrol, ki je selektivni modulator estrogenskih receptorjev (SERM), zato se lahko veže na estrogenske receptorje in deluje agonistično, kljub nizki vezavni afiniteti [2].

### **Nevrodegenerativne bolezni**

Patološke spremembe v specifičnih možganskih področjih in porušeno metabolično ravnotežje so osnova za različne kronične progresivne nevrodegenerativne bolezni, kot so Alzheimerjeva, Huntingtonova in Parkinsonova bolezen [22].

Resveratrol lahko zaradi svoje lipofilne narave prehaja hematoencefalno bariero in izkazuje močne nevroprotективne učinke že v nizkih odmerkih [11]. Oksidativni stres in posledične poškodbe možganskih makromolekul lahko še pospešijo razvoj nevrodegenerativnih bolezni, zato je tudi pri nevroprotективnem delovanju resveratrola najbolj pomembna njegova učinkovita antioksidativna aktivnost [14]. Preko vpliva na sintezo NO pa poveča tudi pretok krvi v možganih, ki je pomemben element pri kognitivni funkciji [8].

## **1.2. ANALOGI RESVERATROLA**

Resveratrol je v zadnjih desetletjih močno pritegnil pozornost, zaradi svoje preproste strukture in številnih bioloških učinkov, ki jih izkazuje [23]. Njegova pomanjkljivost je predvsem v tem, da ima zelo nizko metabolno stabilnost. V črevesju in jetrih se hitro metabolizira z encimi 2. faze metabolizma do glukuronidov in sulfatov ter posledično izkazuje nizko biološko uporabnost. Njegova slabost je tudi v pomanjkanju selektivnosti, saj deluje na mnoge različne biološke tarče [24].

Zadnja leta smo bili priča številnim raziskavam, ki so se osredotočile na načrtovanje in sintezo novih analogov resveratrola, s ciljem povečati metabolno stabilnost, hkrati pa tudi sintetizirati bolj učinkovite in bolj selektivne analoge, ki bodo hkrati še vedno izkazovali

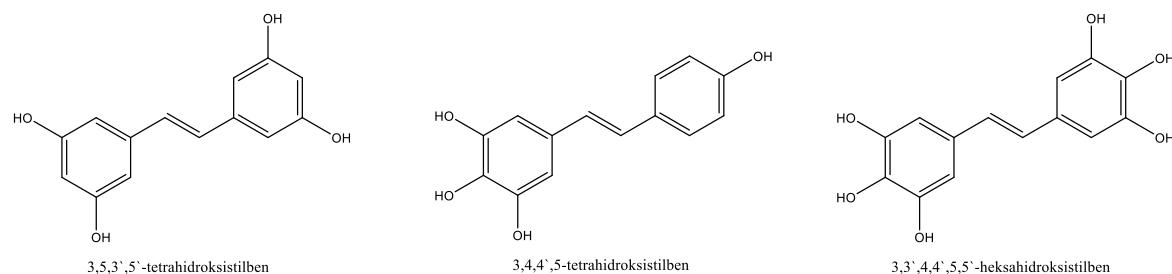
farmakološke lastnosti resveratrola [23, 24].

Sinteza novih analogov resveratrola v večini primerov temelji na modifikaciji substituentov na obeh fenolnih obročih in/ali zamenjavi dvojne (C=C) vezi, z uporabo različnih sinteznih pristopov.

### 1.2.1. Nekateri znani sintezni analogi resveratrola

#### Hidrosilirani analogi reveratrola

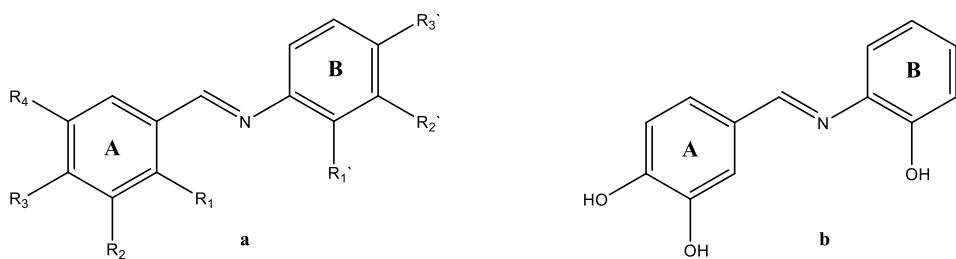
Analogi resveratrola z dodatnimi hidrosilnimi skupinami na obeh fenolnih obročih izkazujejo močnejše antioksidativno delovanje od resveratrola. Najmočnejše antioksidativno delovanje ima tako 3,3',4,4',5,5'-heksahidrosistilben (slika 5) [25].



*Slika 6: Strukturne formule nekaterih hidrosiliranih analogov resveratrola [25]*

#### Iminski analogi resveratrola

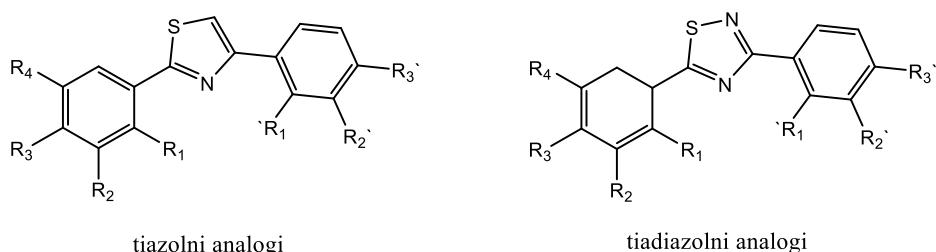
Iminski analogi resveratrola so analogi, pri katerih so stilbensko dvojno vez C=C zamenjali z vezjo C=N in hkrati modificirali substituente na obeh fenolnih obročih. Odvisno od substituentov na fenolnih obročih: -H, -OH, -OCH<sub>3</sub> ali -CH<sub>3</sub> so nekateri izmed njih močnejši antioksidanti kot resveratrol, nekateri pa šibkejši. Ugotovili so, da je za antioksidativno delovanje iminskih analogov resveratrola, ključna vezava OH skupine na obroč B. Če je OH skupina na obroču B vezana na *ortho*-mestu (R<sub>1</sub>'), so iminski analogi močnejši antioksidanti kot resveratrol, če pa je OH skupina vezana na *meta*- ali *para*-mestu (R<sub>2</sub>' ali R<sub>3</sub>'), pa so iminski analogi šibkejši antioksidanti kot resveratrol (slika 6) [23].



**Slika 7:** Splošna struktura formula iminskih analogov resveratrola (a) in struktura formula iminskega analoga resveratrola, ki ima najmočnejše antioksidativno delovanje (b)

### Tiazolni in tiadiazolni analogi resveratrola

Resveratrol izkazuje tudi protirakovo delovanje, njegova pomanjkljivost pa je v tem, da ima šibke in nespecifične učinke na več bioloških tarč. Med drugim vpliva tudi na povečanje aktivnosti kinon reduktaze 1 (QR1), ki je citoprotективni encim, njegova aktivacija pa je pomembna za protirakovo delovanje. Tiazolne in tiadiazolne analoge resveratrola so sintetizirali z namenom, da bi izboljšali učinkovitost in specifičnost resveratrola na QR1. Tiazolni in tiadiazolni analogi resveratrola so analogi, pri katerih so stilbensko dvojno vez zamenjali s tiazolnim ali tiadiazolnim obročem, in hkrati modificirali substituente na obeh fenilnih obročih. Že samo zamenjava stilbenske dvojne vezi C=C s 5-členskim heterocikličnim sistemom je opazno izboljšala aktivnost QR1 v primerjavi z resveratrolom [26, 27].



**Slika 8:** Splošni strukturni formuli tiazolnih in tiadiazolnih analogov resveratrola

## 1.3. BIOIZOSTERIJA

Bioizosterija je uporabna strategija v farmacevtski kemiji, ki se uporablja za racionalno načrtovanje novih učinkovin. Gre za proces modifikacije in optimizacije molekule spojine vodnici, s tem da moramo popolnoma poznati kemijsko strukturo, mehanizem delovanja (interakcije z receptorjem), farmakoforne skupine, metabolizem, vplive na biološko

uporabnost in stranske učinke spojine vodnice.

Cilji bioizosterije pri načrtovanju nove učinkovine so sledeči:

- izboljšanje farmakodinamičnih lastnosti
- povečanje selektivnosti za določen receptor
- zmanjšanje določenih stranskih učinkov
- optimizacija farmakokinetičnih lastnosti
- izboljšanje stabilnosti
- poenostavljena sinteza

Bioizosteri so spojine oz. skupine, ki so strukturno sorodne spojini vodnici (oblika, prostornina molekule), imajo podobne fizikalne lastnosti in izkazujejo podobne biološke aktivnosti, kot spojina vodnica. Delimo jih na klasične in neklasične bioizostere.

**Klasični bioizosteri:** ustrezajo osnovnim pogojem izosterov.

- monovalentni atomi/skupine
- divalentni atomi/skupine
- trivalentni atomi/skupine
- tetrasubstituirani atomi/skupine
- obročni ekvivalenti

**Neklasični bioizosteri:** ne ustrezajo osnovni definiciji izosterije in ni nujno, da imajo enako število atomov. Imajo pa podobno biološko aktivnost.

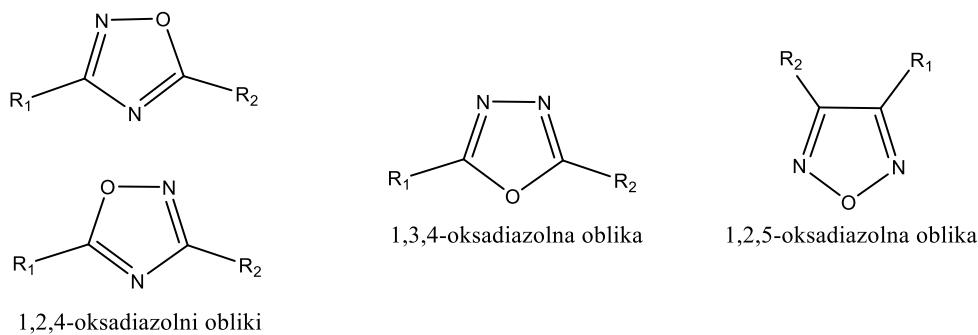
- aciklične/obročne oblike
- zamenljive funkcionalne skupine
- retroizosterija (inverzija določene funkcionalne skupine)

Pravilna uporaba metode modifikacije molekul omogoča sintezo novih analogov spojine vodnice z ugodnimi lastnostmi in izboljšuje možnosti za uspeh pri odkrivanju učinkovin z bolj varno in učinkovitejšo uporabo [28].

## 1.4. 1,2,4-OKSADIAZOLI

Oksadiazoli so 5-členski heterociklični obroči, ki vsebujejo dva ogljikova atoma, dva dušikova atoma in en kisikov atom. Obstajajo v različnih regioizomernih oblikah: dva

različno substituirana 1,2,4-izomera (če sta asimetrično substituirana), 1,3,4-izomer in 1,2,5-izomer (slika 8). 1,2,5-izomer je manj pogosta in zato manj pomembna oblika. 1,2,4-izomera in 1,3,4-izomer so geometrijsko skoraj identični, usmerjajo možne substituente v isti prostor, zato je pričakovati, da se na vezavno mesto vežejo na podoben način [29].



*Slika 9: Različne regioizomerne oblike oksadiazolov [29]*

1,2,4- in 1,3,4- oksadiazoli imajo velik pomen v farmacevtski industriji, pri načrtovanju in sintezi novih učinkovin in se jih uporablja za različne namene:

- kot pomemben del farmakofora, ki prispeva k vezavi na ligand,
- delujejo kot planaren aromatski most, ki zagotavlja primerno orientiranost substituentov,
- za modulacijo farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti molekule,
- kot bioizosterna zamenjava za spojine s karbonilno skupino: estri, amidi in karbamati [29].

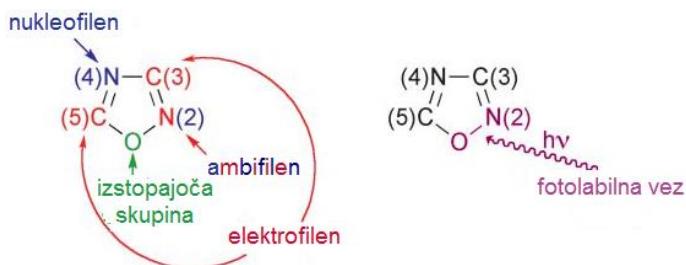
#### 1.4.1. Reaktivnost 1,2,4-oksadiazolov

V razredu 5-členskih heterocikličnih sistemov, spada 1,2,4-oksadiazolni sistem med najmanj aromatične in ima zato visoko nagnjenost k preureditvi v druge, stabilnejše heterocikle.

Njegova topotna ali fotokemična reaktivnost je posledica večih karakteristik (slika 9):

- fotolabilne O-N vezi,
- elektrofilnosti ogljikovih atomov na mestih 3 in 5, ki se še poveča ob prisotnosti elektron privlačnih skupin,
- nukleofilnosti ali šibke bazičnosti dušikovega atoma na mestu 4,
- ambifilnega (se lahko obnaša kot elektrofil ali kot nukleofil) dušika na mestu 2,
- sposobnosti obročnega kisika, da se obnaša kot dobro izstopajoča skupina,

- prisotnosti možne stranske verige, ki je potencialno lahko vključena v intramolekulske preureditev [30].



*Slika 10: Reaktivnost 1,2,4-oksadiazolnega obroča [30]*

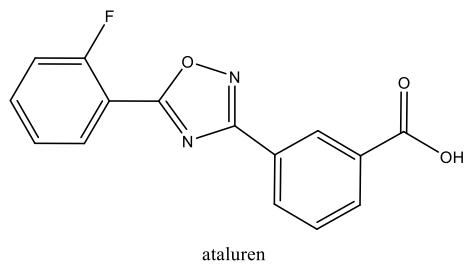
Zaradi vseh teh lastnosti je 1,2,4-oksadiazolni obroč izrazito multifunkcionalen heterocikel, katerega reaktivnost je močno odvisna od vrste substituentov, uporabljenih reagentov in reakcijskega medija [30].

#### 1.4.2. 1,2,4-oksadiazoli kot biološko aktivne spojine

V različnih programih načrtovanja in sinteze novih učinkovin, najdemo mnoge spojine, ki vsebujejo oksadiazolni obroč in izkazujejo pomembne biološke učinke, kot so:

- antiastmatiki
- antidiabetiki
- protivnetne spojine
- protimikrobne spojine
- protitumorne/protirakave spojine
- nevroprotективne spojine
- antioksidanti in
- imunosupresivi.

Številne med njimi so v poznih fazah kliničnih testiranj, vključno z atalurenom, ki je namenjen za terapijo cistične fibroze (slika 10) [29, 30].



*Slika 11: Strukturna formula atalurena [29]*

#### 1.4.3. Sinteza 1,2,4-oksadiazolov

1,2,4-oksadiazole so v naravi zasledili v morskem organizmu, v vrsti morskega polža *Phidiana militaris*, sintezno pa jih lahko pridobimo z različnimi sinteznimi metodami [31]. Obstaja pet glavnih sinteznih metod za sintezo 1,2,4-oksadiazolnega obroča:

1. ciklizacija *O*-acilamidoksimov
2. ciklizacija *N*-acilamidoksimov
3. oksidacija 4,5-dihidro-1,2,4-oksadiazolov
4. 1,3-dipolarna cikloadicija nitrilosidov z nitrili in sorodnimi spojinami
5. transformacije drugih heterocikličnih obročev

Najbolj splošno sprejeta in uporabljana je sintezna metoda ciklizacije *O*-acilamidoksimov, ki se jih predhodno sintetizira z aciliranjem amidoksimov s karboksilnimi kislinami ali njihovimi aktiviranimi derivati (estri, kislinski kloridi, simetrični ali nesimetrični anhidridi in ortoestri) [32].

Sinteza poteka v dveh stopnjah:

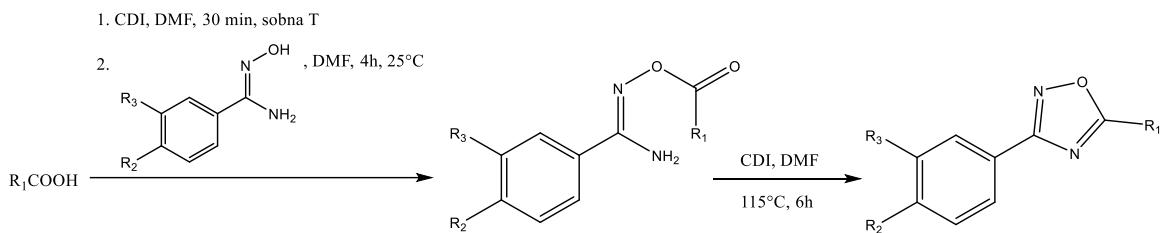
- 1) Amidoksim, ki je bil predhodno sintetiziran z adicijo hidroksilamina na nitril, se *O*-acilira z aktiviranim derivatom karboksilne kisline.
- 2) Z intramolekulsко ciklodehidracijo se tvori 1,2,4-oksadiazolni obroč [33].

Sintezo 1,2,4-oksadiazolov lahko izvedemo pod različnimi reakcijskimi pogoji.

##### a) Sinteza 1,2,4-oksadiazolov z uporabo CDI (1,1'-karbonildiimidazol)

Različne karbodiimide, kot so EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid), DCC (*N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid), DIC (*N,N'*-diizopropilkarbodiimid) in CDI uporabljamo pri sintezi 1,2,4-oksadiazolov za aktivacijo karboksilne kisline »in situ« ter olajšanje sledeče ciklodehidracije. Med vsemi sklopitvenimi (ang. coupling) reagenti, se je CDI med

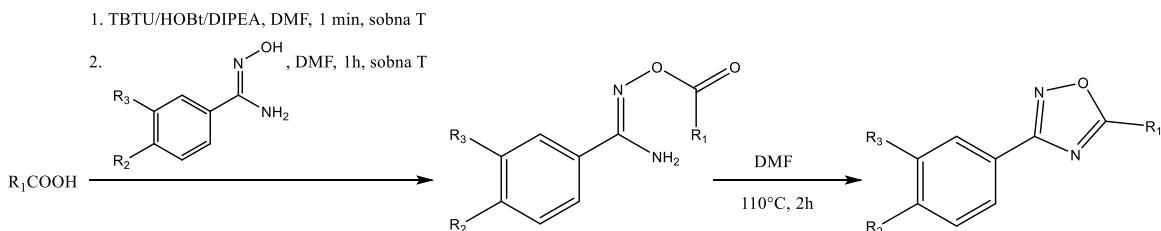
testiranimi karbodiimidi izkazal za najboljšega, saj je njegova uporaba vodila do boljših izkoristkov reakcije in čistejših produktov [34].



*Slika 12: Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo CDI za aktivacijo karboksilne kisline [34]*

**b) Sinteza 1,2,4-oksadiazolov z uporabo TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat)**

Uronijeve soli so topne v DMF in so poznane po enostavnem rokovjanju, hitri sklopitveni kinetiki, ter po tem, da omogočajo tudi učinkovito sklopitev sterično oviranih kislin. Pri uporabi TBTU za aktivacijo karboksilne kisline so dobili višje izkoristke reakcije kot pri uporabi CDI. Z uporabo TBTU se skrajša čas aktivacije in s tem prepreči deaktivacija aktiviranega intermediata pred dodatkom amidoksim, zato je metoda uporabna tudi za kisline, katerih aktiviran intermediat ni stabilen. Posledično se skrajša tudi celotni čas kemijske reakcije [35].

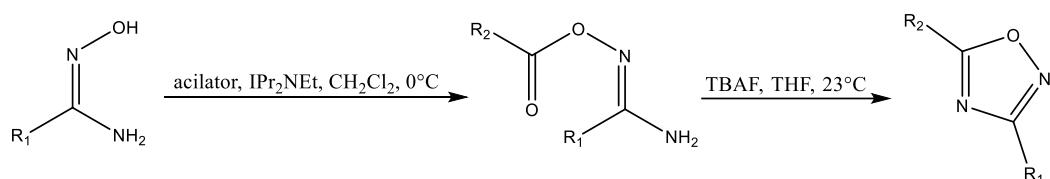


*Slika 13: Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo TBTU za aktivacijo karboksilne kisline [35]*

Dodatek HOBt (hidroksibenzotriazol) pospeši sklopitev in ga lahko nato enostavno odstranimo s spiranjem z vodo. DIPEA (*N,N*-diizopropyletilamin) pa se v organski sintezi uporablja kot baza [35].

c) **TBAF (tetrabutilamonijev fluorid): blag in učinkovit katalizator za sintezo 1,2,4-oksadiazolov**

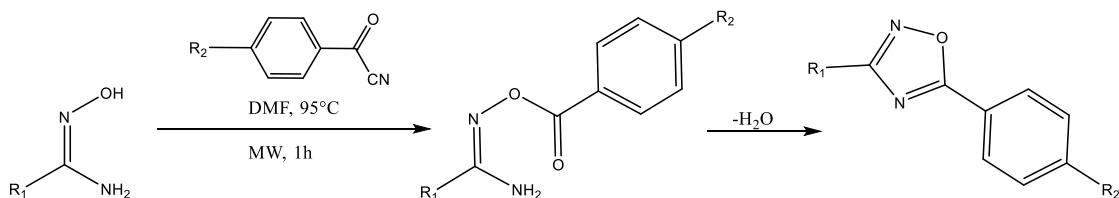
Ostri reakcijski pogoji pri sintezi 1,2,4-oksadiazolov lahko vodijo do slabih izkoristkov reakcije, zaradi tvorbe neželenih stranskih produktov, ki lahko nastanejo iz reaktivnega intermediata. TBAF je dokazano vsestranski reagent v organski sintezi in se je tudi pri sintezi 1,2,4-oksadiazolov izkazal kot blag in učinkovit katalizator reakcije. Dodatek TBAF olajša in pospeši ciklodehidracijo ter omogoča uporabo najrazličnejših acilirnih sredstev (kislinski kloridi, anhidridi). Najprimernejše topilo za potek reakcije v tem primeru je THF (tetrahidrofuran) [36].



*Slika 14: Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov z uporabo TBAF kot katalizatorja [36]*

d) **Sinteza 1,2,4-oksadiazolov pod vplivom mikrovalov**

Uporaba mikrovalov pri sintezi 1,2,4-oksadiazolov iz amidoksimov in benzoil cianidov se je izkazala kot učinkovita alternativna metoda. Gre za enostavno sintezno metodo, ki skrajša reakcijski čas, izboljša izkoristek reakcije in daje čistejše produkte (izognemo se čiščenju produkta s kolonsko kromatografijo). Reakcija poteka preko *O*-acilamidoksim (intermediat) [37].



*Slika 15: Potek sinteze 1,2,4-oksadiazolov pod vplivom mikrovalov [37]*

## 2. NAMEN DELA

Resveratrol je naravni antioksidant, ki izkazuje številne biološke učinke, vendar je njegova omejitev v tem, da:

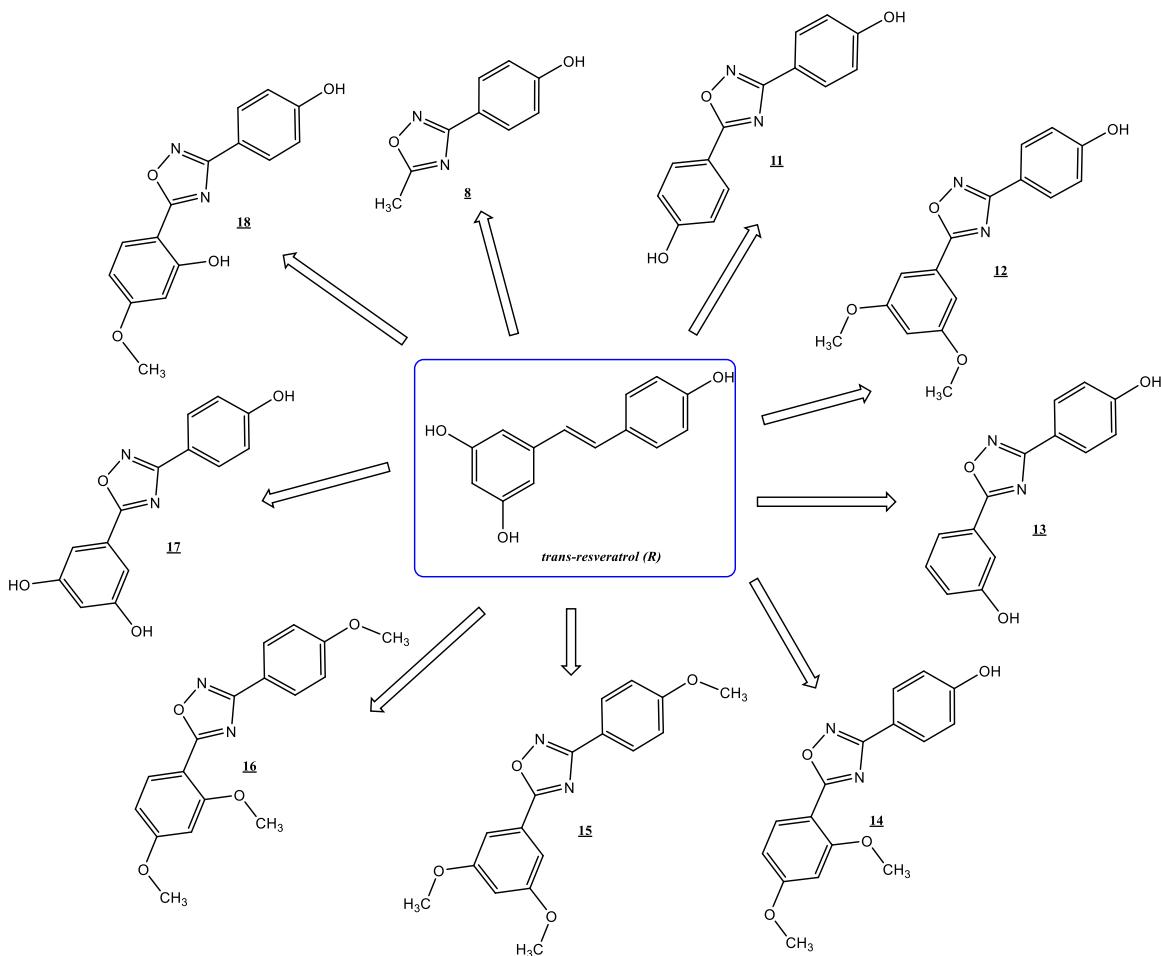
- pri izpostavitvi svetlobi *trans*-oblika (bolj stabilna) prehaja v *cis*-obliko (nestabilnost na svetlobi),
- ima zaradi obsežnega metabolizma prvega prehoda v tankem črevesju in jetrih zelo nizko biološko uporabnost po peroralni aplikaciji
- je zelo slabo topen v vodi, kar vpliva na njegovo porazdelitev v telesu.

V okviru magistrske naloge bomo z različnimi sinteznimi pristopi sintetizirali 1,2,4-oksadiazolne analoge resveratrola in jih ustrezno spektroskopsko in fizikalno-kemijsko ovrednotili.

Pri načrtovanju analogov bomo izhajali iz strukturne formule resveratrola. 1,2,4-oksadiazolni obroč bomo uporabili kot bioizosterno zamenjavo stilbenske dvojne vezi C=C in potencialno tudi kot farmakoforno skupino, saj oksadiazolni obroč lahko tvori še številne dodatne interakcije (vodikove vezi, vezi  $\pi-\pi$  in druge). Za sintezo 1,2,4-oksadiazolnega obroča bomo uporabili sintezno metodo ciklizacije *O*-acilamidoksimov sintetiziranih z aciliranjem amidoksimov s karboksilnimi kislinami ali njihovimi derivati. Za ciklizacijo *O*-acilamidoksimov bomo uporabili različne sintezne pristope (različna reakcijska topila in reagenti) z namenom, da bi našli najbolj optimalnega, uporaba katerega bo vodila do najboljših izkoristkov reakcije in najčistejših končnih produktov. Ta pristop bomo nato uporabili za sintezo končnih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola.

Poleg tega bomo tudi modificirali substituente na obeh fenilnih obročih. Na različna mesta na fenilnih obročih bomo uvedli dve oziroma tri OH skupine, kasneje pa bomo na nekatere OH skupine uvedli še metilne skupine. Pričakujemo lahko, da bodo analogi z uvedenima dodatnima dvema oziroma tremi metilnimi skupinami, bolj lipofilni od ostalih analogov in s tem slabše topni v vodnih raztopinah. Prav tako lahko pričakujemo, da bodo analogi s prostimi OH skupinami imeli boljše antioksidativne lastnosti, kot analogi z uvedenimi dodatnimi metilnimi skupinami. V okviru druge magistrske naloge pa bodo naše spojine biološko ovrednotili.

Z namenom ohranitve njegovih bioloških učinkov, izboljšanja njegove topnosti v vodi in njegovih farmakokinetičnih lastnosti (metabolna stabilnost in biološka uporabnost), bomo sintetizirali 9 različnih analogov resveratrola.



Slika 16: Končni 1,2,4-oksadiazolni analogi resveratrola

## **3. MATERIALI IN METODE**

### **3.1. MATERIALI**

- Reagenti in topila**

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabili kemikalije in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics (Belgia), Sigma-Aldrich (ZDA), Fluka (Švica), Janssen (ZDA) in Merck (Nemčija). Uporabili smo jih brez čiščenja in sušenja.

- Laboratorijska oprema**

- magnetno mešalo z grelnikom: IKA Labortechnik RCT basic
- rotavapor: Büchi Rotavapor R-114 ter Büchi Waterbath B-480, Švica
- tehntica: Mettler Toledo PG 803
- analitska tehnica: Mettler Toledo AG 245
- UV svetilka: Lamag UV-CABINET II, Nemčija
- žarilna pištola: SKILL 1800 Watt
- sušilnik: Instrumentaria sterimatic ST-11

- Poimenovanje in risanje spojin**

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 13.0, proizvajalca CambridgeSoft.

### **3.2. METODE**

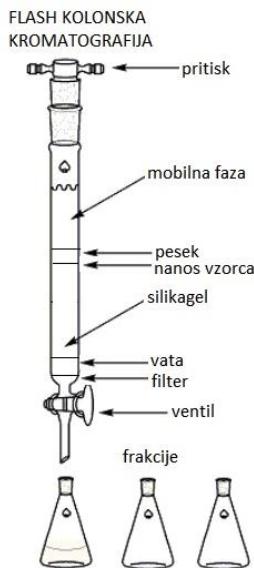
#### **3.2.1. Kromatografske metode**

- Tankoplastna kromatografija (TLC)**

S pomočjo tankoplastne kromatografije smo spremljali potek reakcij, izolacij in kolonskih kromatografij. Uporabljali smo plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60 F254 (Merck) z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20x20 cm. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda=254$  nm in orositveni reagent  $\text{FeCl}_3$ , s pomočjo katerega smo detektirali proste fenolne OH skupine.

- **Kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje spojin. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (Kieselgel 60) proizvajalca Merck s premerom delcev 0,04-0,063 mm (flash silikagel) in kot mobilno fazo smo uporabili različna topila. Pri delu smo potrebovali še vato Cik-cak podjetja Tosama (Slovenija), pesek in sušilno sredstvo  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , proizvajalca Merck (Nemčija).



*Slika 17: Prikaz izvedbe flash kolonske kromatografije [38]*

- **Mobilne faze**, ki smo jih uporabili pri tankoplastni in kolonski kromatografiji:

**MF 1:** heksan/etilacetat = 1/1

**MF 2:** heksan/etilacetat = 1/1 + 1 % ocetne kisline

**MF 3:** heksan/etilacetat = 1/2

**MF 4:** heksan/etilacetat = 1/2 + 1 % ocetne kisline

**MF 5:** heksan/etilacetat = 2/1

**MF 6:** heksan/etilacetat = 5/1

**MF 7:** heksan/etilacetat = 2,5/1

**MF 8:** petroleter/etilacetat = 2/1

**MF 9:** petroleter/etilacetat = 3/1

**MF 10:** etilacetat

### **3.2.2. Spektroskopske metode**

- Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE III pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Kot topilo smo uporabili devterirano topilo DMSO-d<sub>6</sub> z dodanim TMS ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) kot internim standardom. Za računalniško obdelavo spektrov smo uporabili program MestRec 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research.

- Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektri so bili posneti na spektrometru Nexus z metodo ATR-IR na Fakulteti za farmacijo. Dobljene spektre smo računalniško obdelali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

- Masna spektrometrija (MS)**

Masni spektri in HR-MS spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass (Velika Britanija) z ESI tehniko na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- Elementarna analiza (CHN)**

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

### **3.2.3. Določanje tališča**

Tališča smo določili s talilnim mikroskopom znamke Leica z ogrevalno mizico in niso korigirana.

### **3.2.4. Biološko testiranje spojin**

Na novo sintetizirane spojine so biološko ovrednotili na Fakulteti za farmacijo, in sicer na Katedri za klinično biokemijo, pod vodstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

- Postopek testiranja antioksidativnega delovanja**

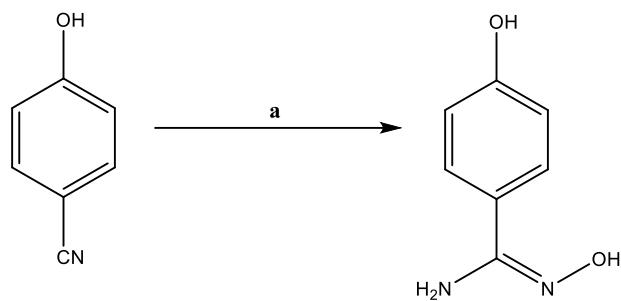
Najprej so pripravili suspenzijo THP-1 celične kulture v koncentraciji  $8 \times 10^5$  celic/mL v

mediju RPMI 1640. Tako pripravljeno suspenzijo celic so centrifugirali 5 min pri 1500 obr./min in jo nato resuspendirali v sterilni raztopini fosfatnega pufra (ang. phosphate buffered saline; PBS) z dodanim barvilm H<sub>2</sub>DCFDA v koncentraciji 10 µM . Za slepo kontrolo so bile vzete celice brez dodanega barvila. Vse vzorce so tretirali 15 min pri 37° C in 5 % CO<sub>2</sub>. Sledilo je centrifugiranje 5 min pri 1500 obr./min. Nato so odpipetirali supernatant in dodali 500 µL svežega medija RPMI 1640 ter naše spojine ali resveratrol s koncentracijo 25 µM (razen spojine **15** z 10 µM) in 100 µM TBH. Vse skupaj so tretirali še eno uro pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Nazadnje so prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti določili s pretočnim citometrom. Test so ponovili 3-krat.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

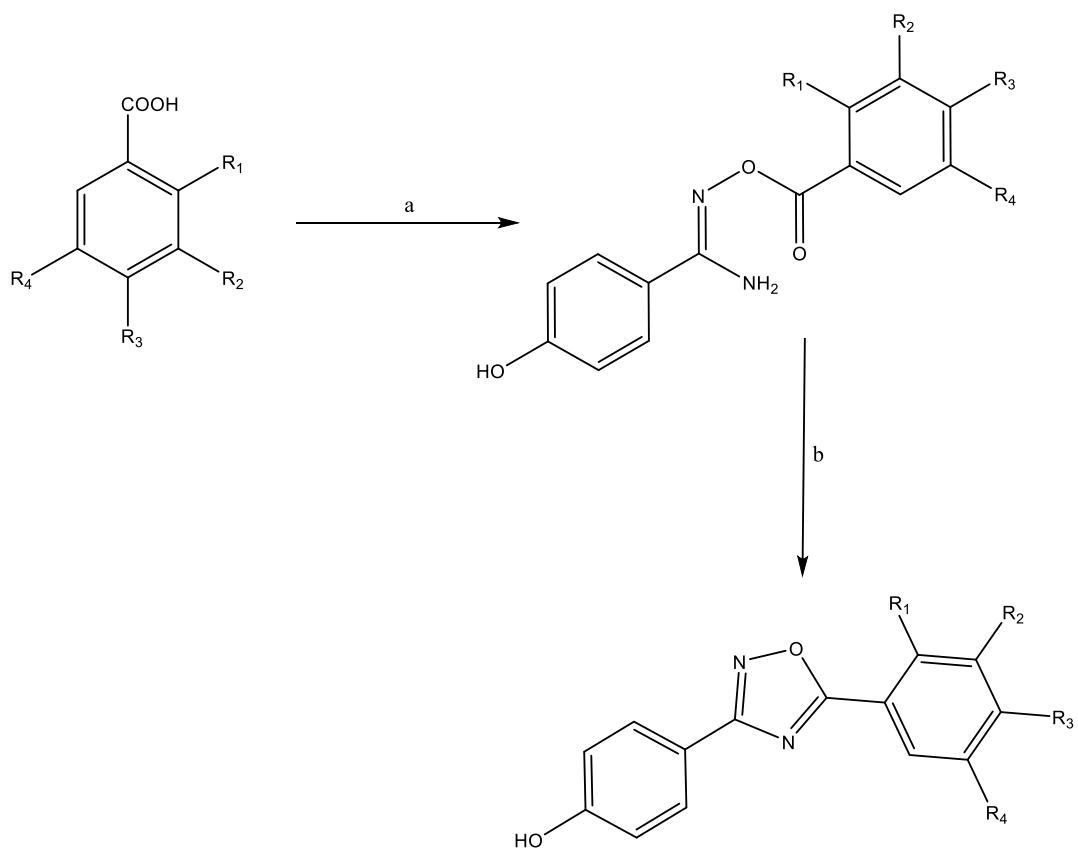
### 4.1. REAKCIJSKE SHEME

*Reakcijska shema 1:* Sinteza amidoksima.



a: NH<sub>2</sub>OH · HCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, etanol, T = 90 °C

*Reakcijska shema 2:* Sinteza 1,2,4-oksadiazolov pod različnimi reakcijskimi pogoji.



<b>a</b>	<b>b</b>
1) CDI, DMF (dimetilformamid), amidoksim	1) segrevanje ( $\Delta$ ), T = 160 °C
2) CDI, THF (tetrahidrofuran) + dioksan, amidoksim	2) $\Delta$ , T = 80 °C
3) TBTU, acetonitril (ACN) + THF, N-metilmorfolin (NMM) , amidoksim	3) piridin + dioksan, $\Delta$ , T = 120 °C
4) TBTU, DMF, trietilamin (Et <sub>3</sub> N), , amidoksim	4) $\Delta$ , T = 110-115°C
5) TBTU, THF, NMM, amidoksim	5) <u>a</u> : piridin + dioksan, $\Delta$ z mikrovalovi (MW), T = 130 °C <u>b</u> : etanol + Et <sub>3</sub> N, $\Delta$ MW, T = 110 °C
6) TBTU, THF + ACN, NMM, 4-dimetilaminopiridin (DMAP), amidoksim	6) dioksan, TBAF, kalijev fluorid (KF), $\Delta$ , T = 120 °C

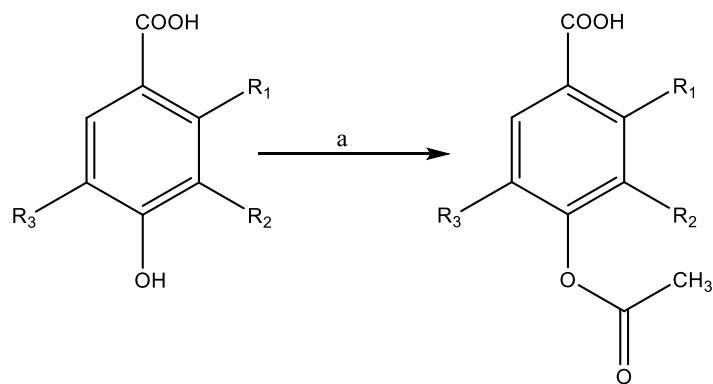
**R<sub>1</sub>:** -OC(O)CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OH ali -H

**R<sub>2</sub>:** -OC(O)CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OH ali -H

**R<sub>3</sub>:** -OC(O)CH<sub>3</sub>, -OH ali -H

**R<sub>4</sub>:** -OCH<sub>3</sub> ali -H

**Reakcijska shema 3:** Zaščita OH-skupine hidroksibenzojskih kislin.



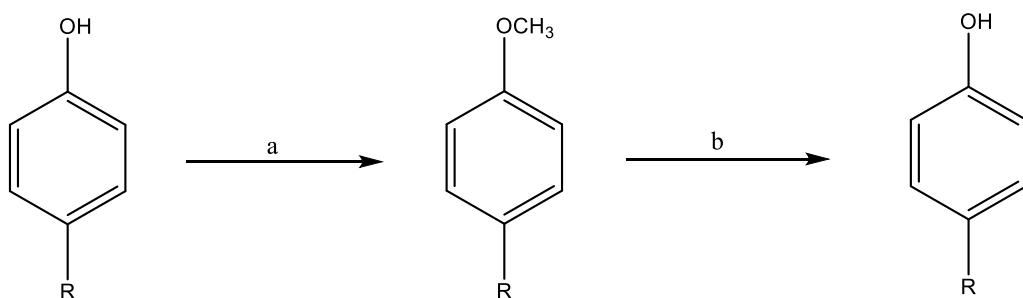
**a:** acetanhidrid (Ac<sub>2</sub>O), piridin, DMAP, sobna T, tema

**R<sub>1</sub>:** -OH ali -H

**R<sub>2</sub>:** -OH ali -H

**R<sub>3</sub>:** -OH ali -H

**Reakcijska shema 4:** Uvedba in odstranitev metilne skupine na fenolno OH-skupino

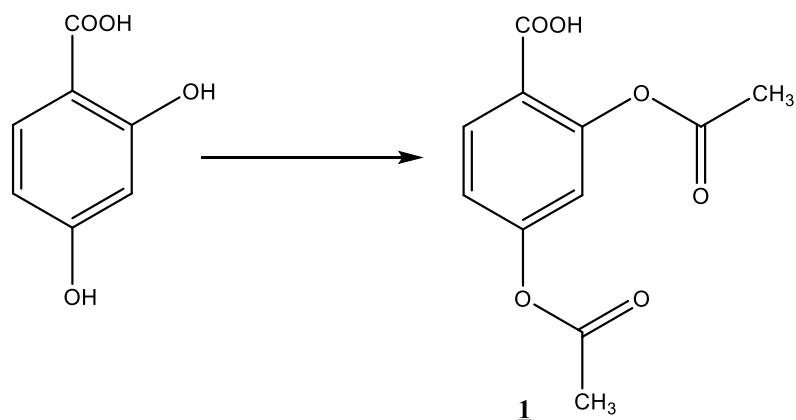


a:  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , ACN, sobna T (15 min) +  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $T = 80^\circ\text{C}$  (refluks), 1,5 h

b:  $\text{BBr}_3$ , diklorometan (DKM),  $T = -20^\circ\text{C}$  (nekaj časa, nato sobna T), 24 h

## 4.2. SINTEZA 2,4-DIACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (1)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 50 ml bučko smo natehtali 1,54 g (10 mmol) 2,4-dihidroksibenzojske kisline in jo raztopili v 5 ml piridina ter dodali 5 ml acetanhidrida (acetilirno sredstvo). Reakcijsko zmes smo 1 h mešali pri sobni T. Ker tudi po 2 h s TLC še vedno nismo zaznali konca reakcije, smo reakcijski zmesi dodali še 3 ml piridina in 3 ml acetanhidrida, ter bučko ovili z alufolijo (reakcija v temi). Po 3,5 h smo dodali še konico spatule 4-dimetilaminopiridina (DMAP; katalizator) in pustili reakcijo potekati čez noč (24 h). Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom in postavili na mešalo. Ledeno zmes smo po predpisu nakisali s 3M HCl do  $\text{pH} \sim 1$ . Nakisano zmes smo

nato ekstrahirali s  $3 \times 60$  ml etilacetata. Zbrane frakcije organske faze smo sprali s približno  $30$  ml nasičene raztopine NaCl, ji dodali sušilno sredstvo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in jo filtrirali. Filtrat smo prelili v bučko in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo prenesli na petrijevko in ga 1-2 h sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili  $2,105$  g spojine **1**.

### Rezultati:

**Izgled:** umazano beli kristali

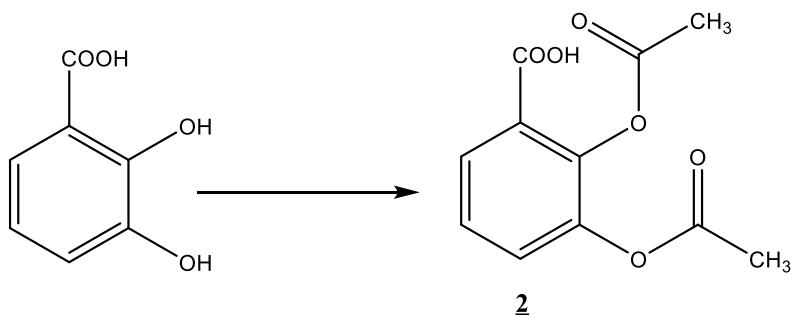
**Izkoristek:**  $88.45\%$  ( $2,105$  g)

**Rf:**  $0.37$  (MF: heksan/etilacetat =  $1/2 + 1\%$  ocetne kisline)

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] =  $2.25$  (s,  $3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ),  $2.30$  (s,  $3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ),  $7.10$  (d,  $1\text{H}$ ,  $J = 2.2$  Hz, Ar-H),  $7.19$  (dd,  $1\text{H}$ ,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz, Ar-H),  $7.99$  (d,  $1\text{H}$ ,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H),  $13.03$  (s,  $1\text{H}$ , Ar-COOH)

## 4.3. SINTEZA 2,3-DIACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (2)

### Reakcija:



### Postopek:

V  $50$  ml bučko smo natehtali  $2,315$  g (15 mmol) 2,3-dihidroksibenzojske kisline in jo najprej raztopili v  $8$  ml piridina ter dodali  $8$  ml acetanhidrida in konico spatule DMAP. Bučko smo zaprli, ovili z alufolijo in pustili reakcijo ob mešanju potekati čez noč pri sobni T. Po  $24$  h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom in postavili na mešalo. Ledeno zmes smo nakisali s  $3\text{M HCl}$  do  $\text{pH} \sim 1-2$ . Nakisano zmes smo nato ekstrahirali s  $3 \times 60$  ml etilacetata. Organsko fazo smo sprali s približno  $30$  ml nasičene raztopine NaCl, jo dodatno sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in jo filtrirali. Filtrat smo prelili v bučko in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo prenesli na petrijevko in ga 1-2 h sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili  $3,086$  g spojine **2**.

## Rezultati:

**Izgled:** oranžno-beli kristali

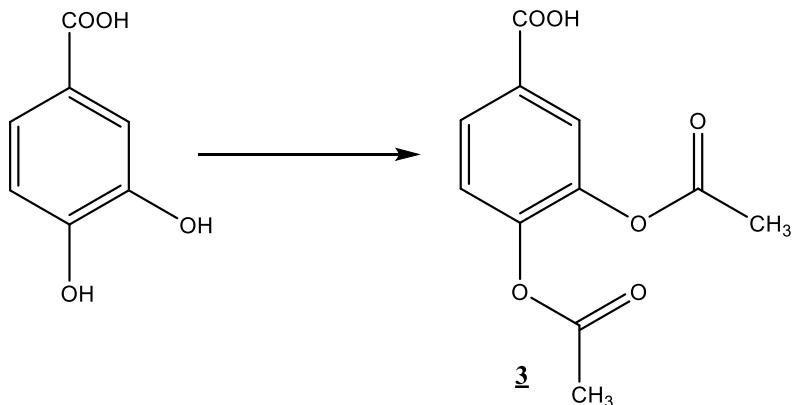
**Izkoristek:** 86.39 % (3,086 g)

**Rf:** 0.33 (MF: heksan/etilacetat = 1/1 + 1 % ocetne kisline)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.42 (t, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.52 (d, 1H, J = 8.0, Ar-H), 7.82 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 13.30 (s, 1H, Ar-COOH)

## 4.4. SINTEZA 3,4-DIACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (3)

### Reakcija:



### Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 2,315 g (15 mmol) 3,4-dihidroksibenzojske kisline in jo najprej raztopili v 8 ml piridina ter dodali 8 ml acetanhidrida in konico spatule DMAP. Bučko smo zaprli, ovili z alufolijo in pustili reakcijo ob mešanju potekati čez noč pri sobni T. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom in postavili na mešalo. Ledeno zmes smo nakisali s 3M HCl do pH ~ 1-2. Nakisano zmes smo nato ekstrahirali s 3 × 60 ml etilacetata. Organsko fazo smo sprali s približno 30 ml nasičene raztopine NaCl, jo dodatno sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jo filtrirali. Filtrat smo prenigli v bučko in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo prenesli na petrijevko in ga 1-2 h sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili 2,975 g spojine 3.

### **Rezultati:**

**Izgled:** beli kristali

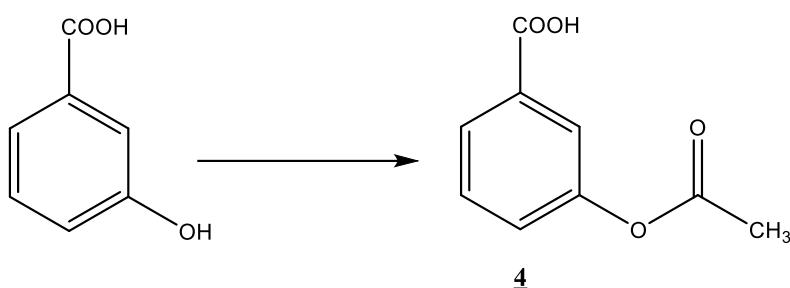
**Izkoristek:** 83.29 % (2,975 g)

**Rf:** 0.39 (MF: heksan/etilacetat = 1/1 + 1 % ocetne kisline)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 2.30 (s, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>), 7.41 (d, 1H, J = 8.4, Ar-H), 7.81 (s, 1H, Ar-H), 7.88 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 13.25 (s, 1H, Ar-COOH)

## **4.5. SINTEZA 3-ACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (4)**

### **Reakcija:**



### **Postopek:**

V 50 ml bučko smo natehtali 2,072 g (15 mmol) 3-hidroksibenzojske kisline in jo najprej raztopili v 8 ml piridina ter dodali 8 ml acetanhidrida in konico spatule DMAP. Bučko smo zaprli, ovili z alufolijo in pustili reakcijo ob mešanju potekati čez noč pri sobni T. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo zlili v časo z ledom in postavili na mešalo. Ledeno zmes smo nakisali s 3M HCl do pH ~ 1-2. Nakisano zmes smo nato ekstrahirali s 3 × 60 ml etilacetata. Organsko fazo smo sprali s približno 30 ml nasičene raztopine NaCl, jo dodatno sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jo filtrirali. Filtrat smo preniesli na petrijevko in ga 1-2 h sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili 2,498 g spojine **4**.

### **Rezultati:**

**Izgled:** umazano beli kristali

**Izkoristek:** 92.48 % (2,498 g)

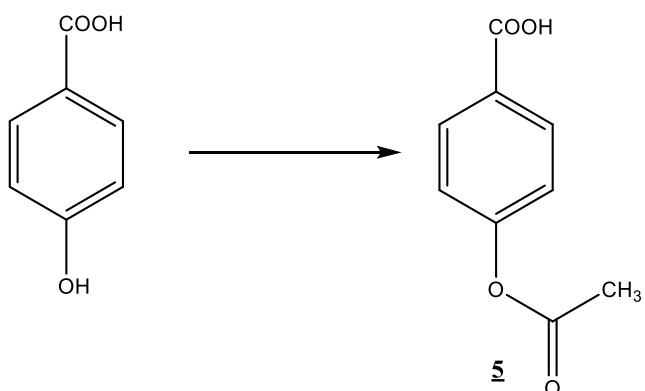
**Rf:** 0.52 (MF: heksan/etilacetat = 1/1 + 1 % ocetne kisline)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.40 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-

H), 7.55 (t, 1H, J = 7,8 Hz, Ar-H), 7.67 (s, 1H, Ar-H), 7.84 (d, 1H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 13.14 (s, 1H, Ar-COOH)

#### **4.6. SINTEZA 4-ACETOKSIBENZOJSKE KISLINE (5)**

##### **Reakcija:**



##### **Postopek:**

V 50 ml bučko smo natehtali 2,072 g (15 mmol) 4-hidroksibenzojske kisline in jo najprej raztopili v 8 ml piridina ter dodali 8 ml acetanhidrida in konico spatule DMAP. Bučko smo zaprli, ovili z alufolijo in pustili reakcijo ob mešanju potekati čez noč pri sobni T. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijo prekinili. Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom in postavili na mešalo. Ledeno zmes smo nakisali s 3M HCl do pH ~ 1-2. Nakisano zmes smo nato ekstrahirali s  $3 \times 60$  ml etilacetata. Organsko fazo smo sprali s približno 30 ml nasičene raztopine NaCl, jo dodatno sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jo filtrirali. Filtrat smo prelili v bučko in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo prenesli na petrijevko in ga 1-2 h sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili 2,433 g spojine **5**.

##### **Rezultati:**

**Izgled:** svetlo oranžni kristali

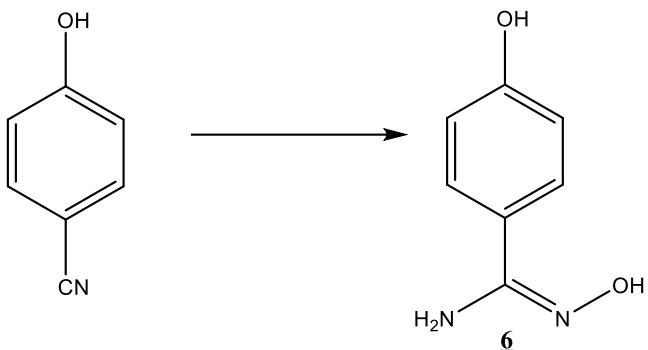
**Izkoristek:** 90.08 % (2,433 g)

**Rf:** 0.54 (MF: heksan/etilacetat = 1/1 + 1 % ocetne kisline)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.26 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Ar-H), 7.99 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Ar-H), 13.00 (s, 1H, Ar-COOH)

## 4.7. SINTEZA 4-HIDROKSIBENZAMIDOKSIMA (**6**)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 250 ml bučko smo natehtali 2,5 g (21 mmol) 4-cianofenola in ga raztopili v 90 ml etanola. Dodali smo 14,5 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105 mmol) in nato še 7,0 g NH<sub>2</sub>OH × HCl (101 mmol), ki smo ga predhodno 2,5 h sušili v sušilniku, saj gre za zelo higroskopno snov. Reakcijsko zmes smo segrevali pod refluksom pri 90 °C na oljni kopeli in reakcijo pustili potekati čez noč (24 h). Po 24 h smo še vročo reakcijsko zmes filtrirali in oborino sprali s 60 ml vročega etanola. Filtratu smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in dobili produkt, ki je vseboval še nekaj izhodne spojine (nečistota). Produkt smo zato še sprali z 2 × 50 ml acetona in na ta način skoraj v celoti odstranili izhodno spojino ter dobili skoraj popolnoma čist produkt. Produkt smo prenesli na petrijevko in ga posušili v sušilniku pri 40 °C ter dobili 1,936 g spojine **6**.

**Rezultati:**

**Izgled:** svetlo rjavi kristali

**Izkoristek:** 60.59 % (1,936 g)

**Rf:** 0.10 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 173 – 176 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3440, 3320, 2527, 2011, 1637, 1585, 1540, 1503, 1371, 1309, 1285, 1185, 1136, 1111, 1081, 991, 911, 842, 781, 745, 697, 666, 607

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 5.32 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.28 (d, 2H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.18 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H)

**MS (ESI):** 151.1 [M-H]<sup>-</sup>

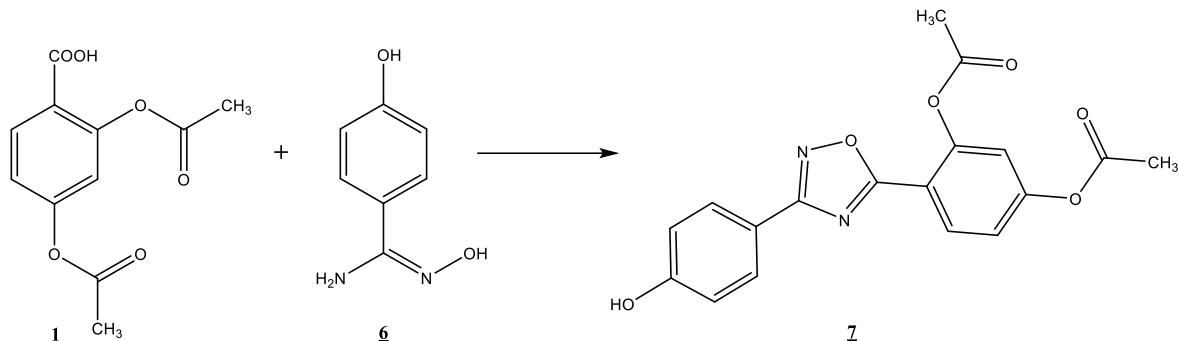
**Mr (izračunana):** 152.15

**HR-MS za C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** 151.0511 (izračunana: 151.0508)

**Elementna sestava:** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 4.8. POSKUS SINTEZE 4-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL)-1,3-FENILEN DIACETATA (**7**)

### Reakcija:



### Postopek:

V 25 ml bučko z ozkim obrusom smo natehtali 154 mg (0,65 mmol) spojine **1** (2,4-diacetoksihidroksi benzojska kislina), dodali 177 mg (1,2 mmol) CDI ("coupling" reagent) in vse skupaj raztopili v 5-6 ml dimetilformamida (DMF). Reakcijsko zmes smo mešali 30 min pri sobni T, da je potekla aktivacija kisline, nato smo dodali še 183 mg (1,2 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**) in reakcijsko zmes segrevali na 160 °C pod refluksom. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijsko zmes zlili v čašo s 30 ml H<sub>2</sub>O. Nato smo izvedli ekstrakcijo s 3 × 30 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali še s 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in s 30 ml nasičene raztopine NaCl, ter jo sušili z natrijevim sulfatom (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Nato smo organsko fazo filtrirali in jo prelili v bučko ter pod znižanim tlakom odpareli topilo. Dobljeno nečisto spojino smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 1/1), vendar analize tudi po čiščenju niso ustrezale želenemu produktu.

### Rezultati:

**Izgled:** umazano beli kristali

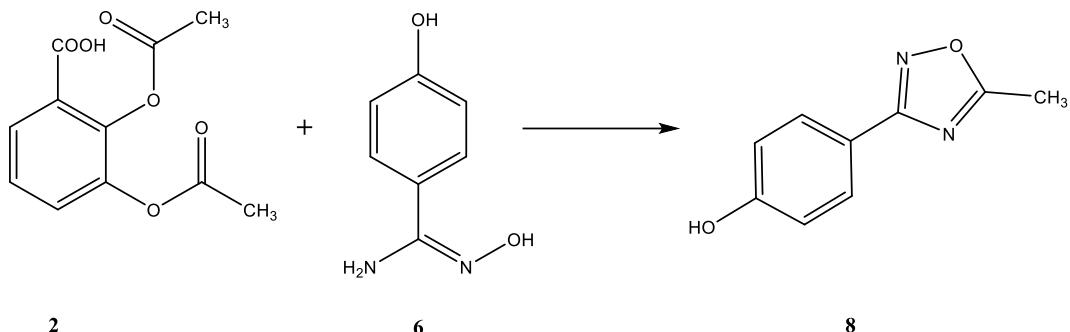
**Izkoristek:** 23.02 % (53 mg)

**Rf:** 0.61 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 6.18 (m, 2H, Ar-H), 6.92 (m, 2H, Ar-H), 7.02 (s, 1H, Ar-H), 7.65 (m, 1H, Ar-H), 7.82 (d, 1H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 9.16 (s, 1H, Ar-OH)

## 4.9. SINTEZA 4-(5-METIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) FENOLA (8)

### Reakcija:



### Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 154 mg (0,65 mmol) spojine **2** (2,3-diacetoxihidroksi benzojska kislina), dodali 177 mg (1,2 mmol) CDI ("coupling" reagent) in vse skupaj raztopili v 5-6 ml DMF. Reakcijsko zmes smo mešali 30 min pri sobni T, da je potekla aktivacija kisline, nato smo dodali še 183 mg (1,2 mmol) 4-hidroksibenzamidoksim (**6**) in reakcijsko zmes segrevali na 160 °C pod refluksam. Po 24 h smo s TLC zaznali konec reakcije in reakcijsko zmes zlili v čašo s 30 ml H<sub>2</sub>O. Nato smo izvedli ekstrakcijo s 3 × 30 ml etilacetata. Združene organske faze smo sprali še s 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in s 30 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nato smo organsko fazo filtrirali, jo prelili v bučko in pod znižanim tlakom odpareli topilo. Surov produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 1/1) in dobili 44 mg spojine **8**.

### Rezultati:

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 19.11 % (44 mg)

**Rf:** 0.35 (MF: heksan/etilacetat = 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 148 – 150 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3340, 3265, 2924, 2231, 1690, 1607, 1576, 1544, 1510, 1474, 1450, 1362, 1277, 1224, 1166, 1104, 1035, 965, 915, 836, 754, 709, 638, 605

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 2.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.91 (d, 3H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.65 (d, 1H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.81 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 10.13 (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 11.93, 115.88, 128.67, 134.22, 160.18, 167.45,

176.78

**MS (ESI):** 177.1 [M+H]<sup>+</sup>

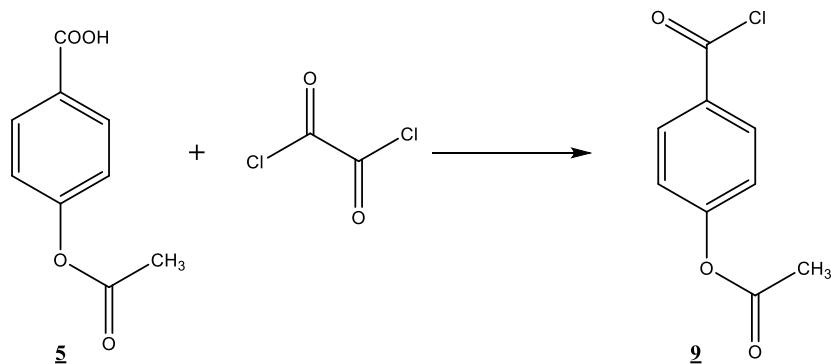
**Mr (izračunana):** 176.17

**HR-MS za C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** 177.0663 (izračunana: 177.0664)

**Elementna sestava:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.10. SINTEZA 4-(KLOROKARBONIL) FENILACETATA (9)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 900 mg (5,0 mmol) spojine **5** (4-acetoksihidroksibenzojska kislina) in jo raztopili v 20 ml diklorometana (DKM). Dodali smo 2 kapljici DMF in reakcijsko zmes ohladili na ledu na 0 °C. V 10 ml DCM smo raztopili 515 µL (6,0 mmol) oksalil klorida. Na bučko z reakcijsko zmesjo, ki je bila v ledeni kopeli, smo namestili kapalnik, da smo lahko počasi po kapljicah v reakcijsko zmes dodali raztopino oksalil klorida. Ko smo dodali vso raztopino oksalil klorida, smo ledeno kopel odstranili in pustili reakcijo potekati nekaj časa pri sobni T nato smo reakcijsko zmes segrevali na 40 °C pod refluksom. Po 24 h smo naredili TLC, ki nam je pokazal, da je v reakcijski zmesi še vedno prisotne nekaj izhodne spojine. Kljub temu smo reakcijo prekinili in DCM ter oksalil klorid ( $T_{vreljšča} = 64 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) odpareli pod znižanim tlakom. Zaostanek smo raztopili v 15 ml etra in eter vsakič odpareli pod znižanim tlakom. Ta korak smo ponovili trikrat. Dobili smo 0,903 g spojine **9**.

##### Rezultati:

**Izgled:** rjava tekočina

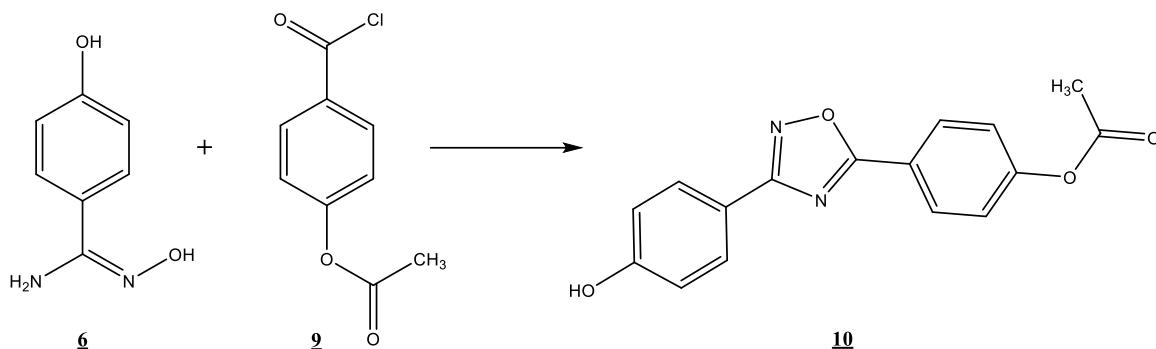
**Izkoristek:** 91.03 % (0,903 g)

**Rf:** 0.55 (MF: petroleter/etilacetat = 2/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ[ppm] = 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.29 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ar-H), 8.19 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Ar-H)

#### **4.11. POSKUS SINTEZE 4-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL) FENILACETATA (10)**

##### **Reakcija:**

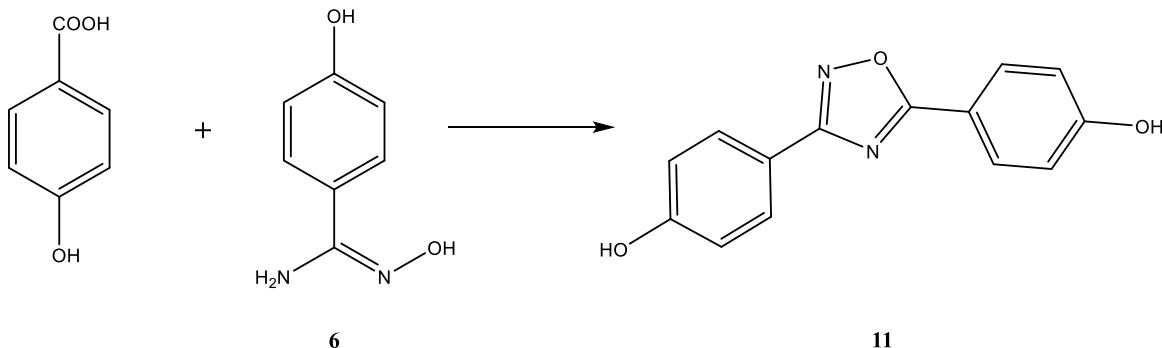


##### **Postopek:**

V 25 ml bučko smo natehtali 199 mg (1,0 mmol) spojine **9** in jo raztopili v 3 ml DKM. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli (0 °C) za približno 15-20 min. Medtem smo v DMF raztopili 152 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzamidoksim (**6**) in raztopini dodali še 139 µL (1,0 mmol) trietilamina (Et<sub>3</sub>N). Tako pripravljeno raztopino smo nato počasi po kapljicah dodajali k reakcijski zmesi na ledeni kopeli. Po dodatku vse raztopine amidoksim smo reakcijsko zmes odmaknili iz ledeni kopeli in s pomočjo TLC ugotovili, da je ves kislinski klorid (**9**) zreagiral. Odpareli smo topilo, dodali 1 kapalko DMF in reakcijsko zmes dali segrevati na 120 °C. Po 24 h smo reakcijsko zmes zlili v 30-40 ml diklorometana in organsko fazo spirali z 2 × 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dobijeno organsko fazo smo še filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1). Dobili smo 70 mg nečiste spojine v obliki rumene tekočine, katere analize niso ustrezale želenemu produktu.

## 4.12. SINTEZA 4,4'-(1,2,4-OKSADIAZOL-3,5-DIIL) DIFENOLA (11)

**Reakcija:**



**Postopek A:** V 25 ml bučko smo natehtali 138 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzozske kisline, dodali 177 mg (1,2 mmol) CDI ("coupling" reagent) in vse skupaj raztopili v 5-6 ml DMF. Reakcijsko zmes smo mešali 30 min pri sobni T, da je potekla aktivacija kisline, nato smo dodali še 183 mg (1,2 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**) in reakcijsko zmes segrevali na 160 °C pod refluksam. Po 24 h smo reakcijo prekinili, ker nismo dobili želenega produkta.

**Postopek B:** V 10 ml bučko smo natehtali 69 mg (0,5 mmol) 4-hidroksibenzozske kisline, 79 mg (0,52 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**) in 161 mg TBTU (skloplitveni reagent) ter vse skupaj raztopili v 2 ml acetonitrila (ACN), 2 ml THF in 2 eq (110 µL) *N*-metilmorfolina (NMM). Reakcijsko zmes smo nato mešali pri sobni T 1 h, da je zreagiral ves amidoksim, nakar smo pod znižanim tlakom odpareli topilo in zaostanek raztopili v 2 ml piridina in 2 ml dioksana. Nato smo reakcijsko zmes segrevali na 120 °C pod refluksam. Po 24 h smo reakcijo prekinili in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Zaostanek smo raztopili v 40 ml etilacetata in organsko fazo spirali z  $2 \times 10$  ml 1M HCl, 10 ml H<sub>2</sub>O,  $2 \times 15$  ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dobljeno organsko fazo smo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: petroleter/etilacetat = 2/1) ter dobili 13 mg spojine **11**.

**Rezultati:**

**Izgled:** umazano beli kristali

**Izkoristek:** 10,23 % (13 mg)

**Rf:** 0.22 (MF: petroleter/etilacetat = 2/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 6.94 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.00 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 8.01 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 10.15 (s, 1H, Ar-OH), 10.55 (s, 1H, Ar-OH)

**Postopek C:** V 25 ml bučko smo natehtali 138 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzojske kisline, dodali 152 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**) in 550 μL N-metilmorfolina ter vse skupaj raztopili v 4 ml THF in 4 ml ACN. Nazadnje smo dodali še 321 mg (1,0 mmol) TBTU in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T. Po 1 h smo naredili TLC, ki je pokazal, da 4-hidroksibenzamidoksim (**6**) še ni v celoti zreagiral, zato smo dodali še 1 kapalko ACN, v katerem se 4-hidroksibenzamidoksim (**6**) dobro topi in počakali še 20 min. Nato smo odpareli topilo in zaostanek raztopili v 6 ml dioksana. Dodali smo še 315 mg (1,0 mmol) tetrabutilamonijevega fluorida trihidrata (TBAF) in 58 mg (1,0 mmol) kalijevega fluorida (KF) ter reakcijsko zmes segrevali na 120 °C pod refluksom. Po 24 h smo reakcijo prekinili, odpareli topilo in zaostanek raztopili v ~30 ml etilacetata. Organsko fazo smo nato spirali z 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dobljeno organsko fazo smo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1) ter dobili 45 mg spojine **11**.

### Rezultati:

**Izgled:** umazano beli kristali

**Izkoristek:** 17.72 % (45 mg)

**Rf:** 0.17 (MF: heksan/etilacetat = 2/1)

**T<sub>tališča:</sub>** 248 – 252 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3170, 2225, 1703, 1608, 1591, 1564, 1508, 1478, 1440, 1361, 1275, 1224, 1180, 1164, 1142, 1107, 1059, 1014, 967, 924, 843, 761, 710, 654, 636, 600, 582, 563

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 6.94 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.00 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 8.01 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 10.15 (s, 1H, Ar-OH), 10.55 (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 114.26, 115.90, 116.25, 117.03, 128.81, 130.00, 160.27, 161.90, 167.88, 175.01

**MS (ESI) za C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** 253.1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 254.24

**HR-MS:** 253.0610 (izračunana: 253.0613)

**Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

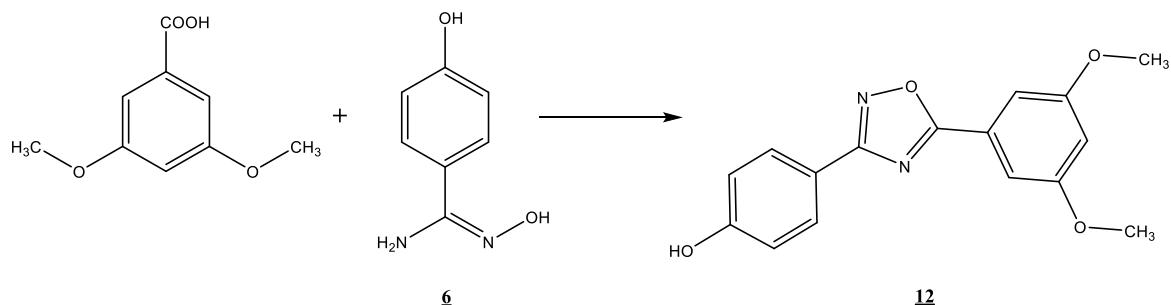
**Elementna analiza za C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave 0.35 H<sub>2</sub>O in 0.30 acetonitrila\* (CH<sub>3</sub>CN).

izračun	meritev	Δ (%)	+ 0,35 H <sub>2</sub> O in + 0,30 CH <sub>3</sub> CN	Δ (%)
%C 66.14	%C 64.13	2.01	%C 64.27	0.14
%H 3.96	%H 3.99	0.03	%H 4.28	0.29
%N 11.02	%N 12.09	1.07	%N 11.81	0.28

\* Reakcijsko topilo

#### **4.13. SINTEZA 4-(5-(3,5-DIMETOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) FENOLA (12)**

**Reakcija:**



**Postopek A (poskus sinteze):** V 25 ml bučko smo natehtali 182 mg (1,0 mmol) 3,5-dimetoksibenzojske kisline, dodali smo 177 mg (1,2 mmol) CDI (sklopitveni reagent) in vse skupaj raztopili v 6 ml DMF. Reakcijsko zmes smo mešali 30 min pri sobni T, da je potekla aktivacija kisline, nato smo dodali še 183 mg (1,2 mmol) 4-hidroksibenzamidoksim (6) in reakcijsko zmes segrevali na 160 °C pod refluxom do naslednjega dne. Po 24 h smo reakcijsko zmes raztopili v 40 ml DKM in organsko fazo spirali z 2 × 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 30 ml H<sub>2</sub>O in 2 × 50 ml raztopine citronske kisline. Nato smo organsko fazo sprali še z 10 ml nasičene raztopine NaCl in posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dobljeno organsko fazo smo filtrirali in odpareli topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo nato očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1).

**Postopek B:** V dve 50 ml bučki smo natehtali po 182 mg (1,0 mmol) 3,5-dimetoksibenzojske

kisline in v obe bučki dodali še po 152 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**), 550 µL (5 mmol) NMM, 321 mg (1,0 mmol) TBTU in vse skupaj raztopili v THF. Po nastanku *O*-acilamidoksim (po 1 h) smo THF odpareli in nadaljevali po dveh različnih poteh:

a) Produkt smo raztopili v dioksanu in piridinu ter reakcijsko zmes segrevali pod vplivom mikrovalov pri 30 W in 130 °C v dveh korakih: 1. korak: 3 min + 15 min in 2. korak: 5 min + 20 min. Sledila je izolacija.

b) Produkt smo raztopili v etanolu in trietilaminu ter reakcijsko zmes segrevali pod vplivom mikrovalov pri 10 W in 110 °C 2min + 20 min. Sledila je izolacija.

Po nobeni poti (a) in b)) reakcija ciklizacije ni potekla do konca, zato smo produkta a) in b) združili in raztopili v mešanici dioksan/piridin. Reakcijsko zmes smo nato segrevali pod refluksom na 120 °C preko noči. Naslednji dan smo reakcijsko topilo odpareli in zaostanek raztopili v 30 ml etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 10 ml 1M HCl, 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dobljeno organsko fazo smo še filtrirali in topilo odpareli pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1). Ker reakcija ni potekla do konca, smo dodali še 158 mg (0,5 mmol) TBAF in vse skupaj raztopili v THF ter reakcijsko zmes segrevali pod refluksom preko vikenda. Po koncu reakcije smo odpareli topilo in zaostanek raztopili v 30 ml etilacetata. Sledilo je spiranje organske faze: 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter sušenje organske faze z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Odpareli smo topilo in dobili čist produkt (spojino **12**), kar smo potrdili najprej s TLC in kasneje tudi z NMR.

**Postopek C:** V 25 ml bučko smo natehtali 182 mg (1,0 mmol) 3,5-dimetoksibenzojske kisline, dodali smo 550 µL (5 mmol) NMM in 321 mg (1,0 mmol) TBTU ter vse skupaj raztopili v 8 ml mešanice topil DKM/THF = 5/1. Reakcijsko zmes smo 45 min mešali pri sobni T, da je potekla aktivacija kisline, nato smo reakcijski zmesi dodali še 152 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**), ki smo ga predhodno raztopili v THF. Po 1 h je nastal *O*-acilamidoksim. Odpareli smo topilo, zaostanku dodali 315 mg (1 mmol) TBAF in vse skupaj raztopili v THF. Reakcijsko zmes smo dali mešati pod refluks za 1 h. Ker po 1 h ni bilo opaznih sprememb, smo spet odpareli topilo, zaostanek raztopili v dioksanu, dodali 58 mg (1,0 mmol) KF in reakcijsko zmes čez noč segrevali na 120 °C pod refluksom. Po 24 h smo odpareli topilo in zaostanek raztopili v 30 ml etilacetata. Sledilo je spiranje organske faze z: 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter

sušenje organske faze z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom in dobili surov produkt, ki smo ga očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2,5/1). Po čiščenju smo dobili 89 mg spojine **12**.

### Rezultati:

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 29.84 % (89 mg)

**Rf:** 0.19 (MF: heksan/etilacetat = 2,5/1)

**Tališča:** 140 – 144 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3129, 2964, 2222, 1736, 1597, 1548, 1512, 1497, 1473, 1427, 1355, 1279, 1227, 1205, 1160, 1133, 1098, 1066, 1046, 927, 915, 860, 833, 761, 666, 639, 618

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 3.88 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ), 6.86 (s, 1H, Ar-H), 6.96 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-H), 7.28 (d, 2H,  $J = 9.2$  Hz, Ar-H), 7.94 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, Ar-H), 10.20 (s, 1H, Ar-OH)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 55.65, 105.10, 105.40, 115.98, 125.05, 128.88, 160.96, 168.16, 174.67

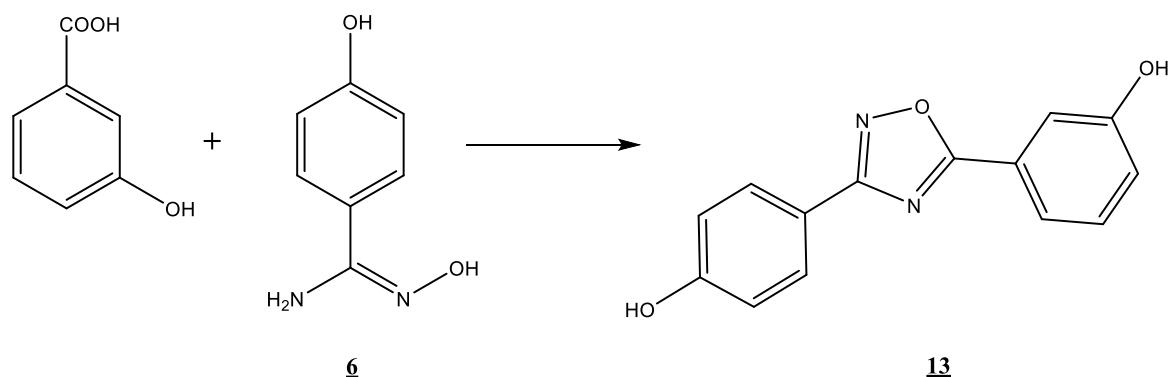
**MS (ESI):** 297.1 [ $\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 298.29

**HR-MS** za  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$ : 297.0866 (izračunana: 297.0875) **Elementna sestava:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$

## 4.14. SINTEZA 3-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL)FENOLA (**13**)

### Reakcija:



### Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 138 mg (1,0 mmol) 3-hidroksibenzojske kisline, dodali smo

152 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**) in 550 µL (5 mmol) NMM ter vse skupaj raztopili v 8 mL mešanice topil THF/ACN. Nato smo reakcijski zmesi dodali še 321 mg (1,0 mmol) TBTU in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1 h, da je potekla aktivacija, kar smo preverili s TLC. Odpareli smo topilo, zaostanek raztopili v 6–7 ml dioksana in dodali 315 mg (1 mmol) TBAF ter 58 mg (1,0 mmol) KF. Reakcijsko zmes smo čez noč segrevali na 120 °C pod refluksom. Po 24 h smo odpareli topilo in zaostanek raztopili v 30 ml etilacetata in dodali še malo H<sub>2</sub>O. Sledilo je spiranje organske faze z: 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter sušenje organske faze z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom in produkt očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1). Dobili smo 68 mg spojine **13**.

### **Rezultati:**

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 26.77 % (68 mg)

**Rf:** 0.25 (MF: heksan/etilacetat = 2/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 250 – 254 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3359, 3201, 2228, 1736, 1613, 1593, 1571, 1508, 1488, 1457, 1434, 1368, 1284, 1251, 1222, 1166, 1135, 1071, 1001, 919, 89, 836, 806, 759, 728, 678, 641, 624

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 6.96 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.47 (t, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.55 (s, 1H, Ar-H), 7.60 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.92 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 10.10 (s, 1H, Ar-OH), 10.19 (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 114.02, 115.97, 116.78, 118.49, 120.31, 124.48, 128.87, 130.80, 157.97, 160.40, 168.07, 174.94

**MS (ESI):** 253.1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 254.24

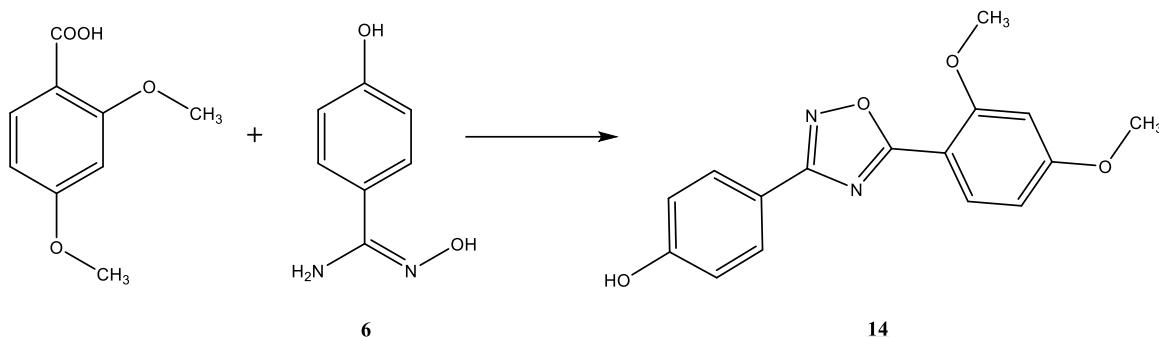
**HR-MS** za C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 253.0609 (izračunana: 253.0613) **Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Elementna analiza za C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave 0.15 H<sub>2</sub>O.

<b>izračun</b>	<b>meritev</b>	<b>Δ (%)</b>	<b>+ 0,15 H<sub>2</sub>O</b>	<b>Δ (%)</b>
%C 66.14	%C 65.72	0.42	%C 65.44	0.28
%H 3.96	%H 4.00	0.04	%H 4.04	0.04
%N 11.02	%N 10.57	0.45	%N 10.90	0.33

## 4.15. SINTEZA 4-(5-(2,4-DIMETOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) FENOLA (14)

### Reakcija:



### Postopek:

V 25 ml bučko smo natehtali 182 mg (1,0 mmol) 2,4-dimetoksibenzojske kisline, dodali smo 152 mg (1,0 mmol) 4-hidroksibenzamidoksima (**6**) in 550  $\mu$ L (5 mmol) NMM ter vse skupaj raztopili v 8 mL mešanice topil THF/ACN. Nato smo reakcijski zmesi dodali še 321 mg (1,0 mmol) TBTU in za konico spatule DMAP. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni T 1 h, da je potekla aktivacija, kar smo preverili s TLC. Nato smo odpareli topilo, zaostanek raztopili v 6-7 ml dioksana in dodali 315 mg (1 mmol) TBAF ter 58 mg (1,0 mmol) KF. Reakcijsko zmes smo čez noč segrevali na 120 °C pod refluksom. Po 24 h smo odpareli topilo in zaostanek raztopili v 40 ml etilacetata. Sledilo je spiranje organske faze z: 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter sušenje organske faze z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odpareli pod znižanim tlakom in produkt očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1). Dobili smo 61 mg spojine **14**.

### Rezultati:

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 20.47 % (61 mg)

**Rf:** 0.20 (MF: heksan/etilacetat = 2/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 132 – 136 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3168, 2937, 2228, 1735, 1594, 1548, 1500, 1455, 1431, 1363, 1333, 1295, 1275, 1242, 1209, 1164, 1131, 1025, 937, 839, 825, 763, 707, 672, 657, 636, 616, 559

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.72-6.81 (m, 3H, Ar-H), 6.94 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.90 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 8.04 (d,

1H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 10.13 (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 55.73, 56.14, 98.98, 105.20, 106.54, 115.87, 117.17, 123.00, 128.78, 132.58, 159.85, 160.17, 164.44, 167.19, 174.47

**MS (ESI):** 297.1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 298.29

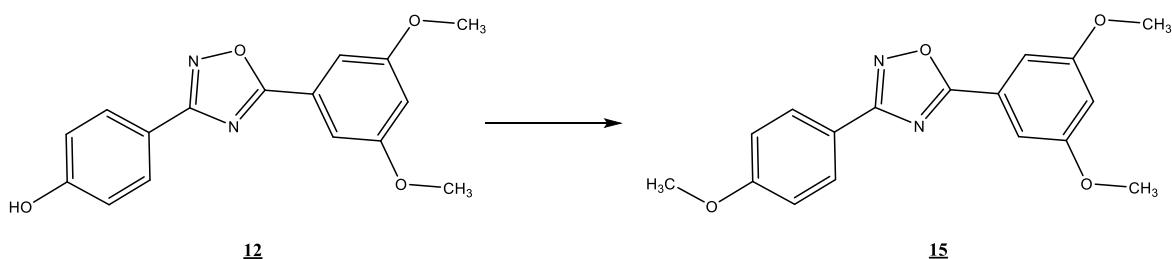
**HR-MS za C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** 297.0873 (izračunana: 297.0875) **Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Elementna analiza za C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:**

izračun	meritev	Δ (%)
%C 64.42	%C 64.25	0.17
%H 4.73	%H 4.64	0.09
%N 9.39	%N 9.81	0.42

#### **4.16. SINTEZA 5-(3,5-DIMETOKSIFENIL)-3-(4-METOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOLA (15)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 25 ml bučko smo natehtali 37 mg 4-(5-(3,5-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenola (12) (0,124 mmol) in 82 mg (2 eq; 0,25 mmol) cezijevega karbonata (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), ju raztopili v približno 4 mL ACN in reakcijsko zmes pustili mešati 15 min pri sobni T. Nato smo reakcijski zmesi dodali še 10 μL (1,3 eq; 0,161 mmol) metil jodida (CH<sub>3</sub>I). Reakcijsko zmes smo nato 1,5 h segrevali pod refluxom na 80 °C. Po 1,5 h smo odpareli reakcijsko topilo in zaostanek raztopili v 30 ml etilacetata. Odfiltrirali smo belo oborino (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) in organsko fazo sprali z 10 ml 1M HCl in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Odpareli smo topilo in dobili 26 mg spojine 15.

**Rezultati:**

**Izgled:** bledo rumeni kristali

**Izkoristek:** 67.18 % (26 mg)

**Rf:** 0.36 (MF: heksan/etilacetat = 2/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 133 – 135 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3018, 2938, 2840, 2224, 1726, 1608, 1562, 1509, 1483, 1460, 1416, 1361, 1304, 1251, 1204, 1169, 1154, 1126, 1111, 1061, 1043, 1019, 996, 964, 914, 860, 830, 796, 760, 671, 619

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 3.87 (s, 9H, 3 × OCH<sub>3</sub>), 6.87 (s, 1H, Ar-H), 7.16 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.29 (d, 2H, J = 2.0 Hz, Ar-H), 8.05 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 55.41, 55.69, 105.22, 105.48, 114.66, 118.27, 125.00, 128.83, 161.00, 161.80, 167.97, 174.91

**MS (ESI):** 313.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 312.32

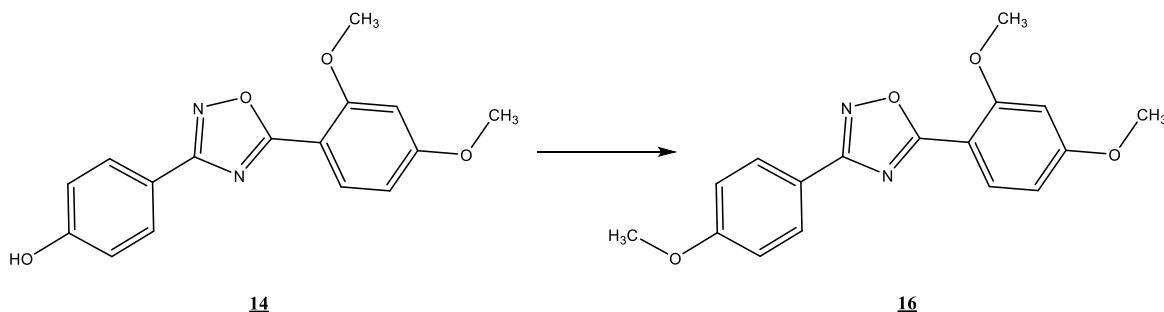
**HR-MS za C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** 313.1185 (izračunana: 313.1188) **Elementna sestava:** C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Elementna analiza za C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave 0.10 H<sub>2</sub>O.

izračun	meritev	Δ (%)	+ 0,1 H <sub>2</sub> O	Δ (%)
%C 65, 38	%C 64.65	0.73	%C 65.00	0.35
%H 5, 16	%H 4.83	0.33	%H 5.20	0.37
%N 8, 97	%N 8.65	0.32	%N 8.92	0.27

#### **4.17. SINTEZA 5-(2,4-DIMETOKSIFENIL)-3-(4-METOKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOLA (16)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 25 ml bučko smo natehtali 30 mg 4-(5-(2,4-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadijazol-3-il)fenola

(**14**) (0,101 mmol) in 66 mg (2 eq; 0,201 mmol) cezijevega karbonata ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ), ju raztopili v približno 4 mL ACN in reakcijsko zmes pustili mešati 15 min pri sobni T. Nato smo reakcijski zmesi dodali še 10  $\mu\text{L}$  (1,6 eq; 0,162 mmol) metil jodida ( $\text{CH}_3\text{I}$ ). Reakcijsko zmes smo nato 1,5 h segrevali pod refluksom na 80 °C. Po 1,5 h smo odpareli reakcijsko topilo in zaostanek raztopili v 30 ml etilacetata. Odfiltrirali smo belo oborino ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) in organsko fazo sprali z 10 ml 1M HCl in 10 ml nasičene raztopine NaCl ter jo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Odpareli smo topilo in dobili 23 mg spojine **16**.

### **Rezultati:**

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 73.25 % (23 mg)

**Rf:** 0.41 (MF: heksan/etilacetat = 2/1)

**Tališča:** 83 – 87 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2937, 2838, 2221, 1736, 1606, 1588, 1544, 1493, 1461, 1419, 1359, 1328, 1296, 1278, 1247, 1208, 1168, 1125, 1021, 969, 937, 912, 836, 765, 709, 670, 642, 609

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 3.84 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.96 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.77 (dd, 1H,  $J_1$  = 8.8 Hz,  $J_2$  = 2.4 Hz, Ar-H), 6.80 (d, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, Ar-H), 7.13 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, Ar-H), 8.00 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, Ar-H), 8.05 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 55.36, 55.76, 56.17, 98.99, 105.11, 106.60, 114.56, 118.78, 128.68, 132.63, 159.89, 161.56, 164.51, 167.00, 174.66

**MS (ESI):** 313.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 312.32

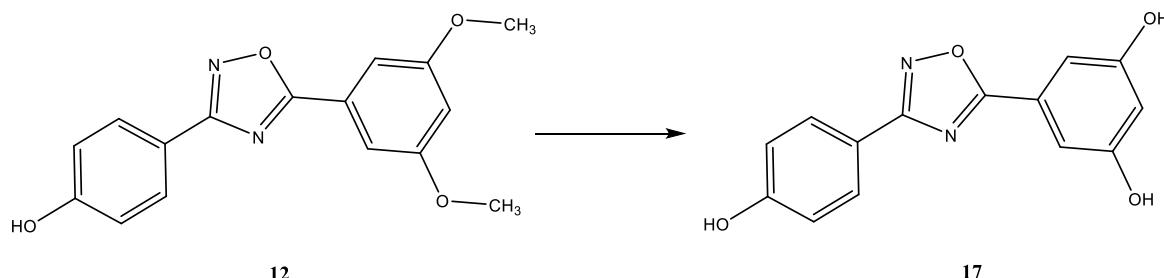
**HR-MS** za  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ : 313.1184 (izračunana: 313.1188) **Elementna sestava:**  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

### **Elementna analiza za $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ :**

<b>izračun</b>	<b>meritev</b>	<b><math>\Delta</math> (%)</b>
%C 65.38	%C 65.53	0.15
%H 5.16	%H 5.02	0.14
%N 8.97	%N 8.90	0.07

## 4.18. SINTEZA 5-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL) BENZEN-1,3-DIOLA (17)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 25 ml bučki smo v DKM raztopili 48 mg 4-(5-(3,5-dimetoksififenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenola (12) (0,161 mmol) in raztopino z zmesjo leda in soli ohladili na -20 °C. Raztopini smo dodali 1 ml (6 eq; 0,966 mmol) 1M raztopine  $\text{BBr}_3$  v DKM in tako pripravljeno reakcijsko zmes še nekaj časa pustili mešati na -20 °C. Nato smo ledeno kopel odstranili, reakcijsko zmes pustili, da se segreje na sobno T in pustili reakcijo potekati čez noč. Naslednji dan smo reakcijski zmesi dodali nekaj metanola, nato smo topilo odpareli in postopek še enkrat ponovili. Zaostanek smo nato raztopili v 30 ml etilacetata in organsko fazo spirali z 10 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  in 10 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo smo še sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odpareli topilo in dobili rahlo nečist produkt, ki smo ga očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1). Po čiščenju smo dobili 21 mg spojine 17.

**Rezultati:**

**Izgled:** umazano beli kristali

**Izkoristek:** 48.26 % (21 mg)

**Rf:** 0.29 (MF: heksan/etilacetat = 1/2)

**Tališča:** 133 – 135 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3300, 2921, 2851, 2226, 1598, 1576, 1524, 1488, 1434, 1400, 1363, 1291, 1231, 1151, 1097, 1015, 997, 968, 923, 859, 848, 832, 759, 667, 635, 595, 562

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 6.51 (t, 1H,  $J$  = 2.0 Hz, Ar-H), 6.95 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, Ar-H), 7.01 (d, 2H,  $J$  = 2.4 Hz, Ar-H), 7.90 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz, Ar-H), 9.92 (s, 2H, 2  $\times$  Ar-OH), 10.18 (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 105.61, 107.09, 115.96, 116.81, 124.73, 128.84, 159.19, 160.37, 168.01, 175.07

**MS (ESI):** 269.1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 270.24

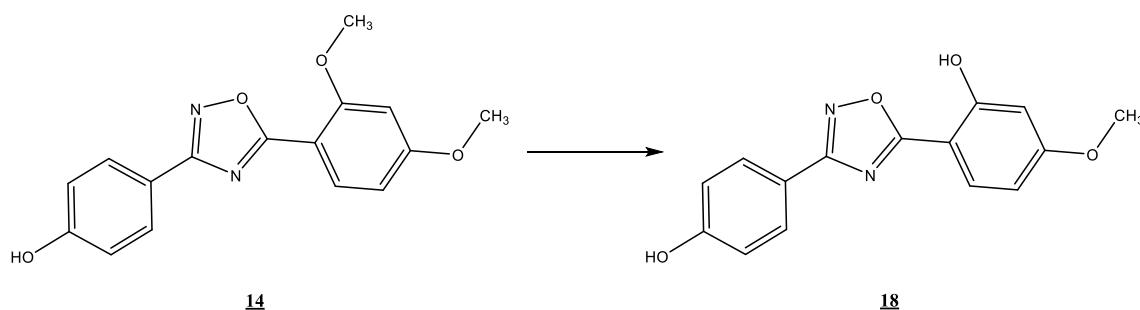
**HR-MS za C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** 269.0566 (izračunana: 269.0562) **Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Elementna analiza za C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave 0.10 H<sub>2</sub>O in 0,50 etanola (EtOH).

izračun	meritev	Δ (%)	+ 0,5 EtOH in + 0,1 H <sub>2</sub> O	Δ (%)
%C 62, 22	%C 61.03	1.19	%C 61.06	0.03
%H 3, 73	%H 4.39	0.66	%H 4.51	0.12
%N 10, 37	%N 9.35	1.02	%N 9.49	0.14

#### **4.19. SINTEZA 4-(3-(4-HIDROKSIFENIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL)-3-METOKSIFENOLA (18)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 25 ml bučki smo v DKM raztopili 34 mg 4-(5-(2,4-dimetoksifenil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenola (14) (0,114 mmol) in raztopino z zmesjo leda in soli ohladili na -20 °C. Raztopini smo dodali 1 ml (8 eq; 0,912 mmol) 1M raztopine BBr<sub>3</sub> v DKM in tako pripravljeno reakcijsko zmes še nekaj časa pustili mešati na -20 °C. Nato smo ledeno kopel odstranili, reakcijsko zmes pustili, da se segreje na sobno T in pustili reakcijo potekati čez noč. Naslednji dan smo reakcijski zmesi dodali nekaj metanola, nato smo topilo odpareli in postopek še enkrat ponovili. Zaostanek smo nato raztopili v 30 ml etilacetata in organsko fazo spirali z 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 5 ml H<sub>2</sub>O in 10 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo še sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odpareli topilo in dobili rahlo nečist

produkt, ki smo ga očistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: heksan/etilacetat = 2/1). Po čiščenju smo dobili 13 mg spojine **18**.

**Rezultati:**

**Izgled:** bež kristali

**Izkoristek:** 40,45 % (13 mg)

**Rf:** 0.27 (MF: heksan/etilacetat = 2/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.67-6.68 (m, 2H, Ar-H), 6.95 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.92-7.95 (m, 3H, Ar-H), 10.17 (s, 1H, Ar-OH), 10.66 (s, 1H, Ar-OH)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 55.57, 101.49, 102.39, 107.54, 115.93, 116.60, 128.96, 130.77, 159.09, 160.36, 164.43, 166.66, 174.10

**MS (ESI):** 313.1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 284.08

**HR-MS za C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** 313.1184 (izračunana: 313.1188) **Elementna sestava:** C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. SINTEZNI POSTOPKI

Pri sintezi 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola smo uporabili najbolj uporabljeno in splošno sprejeto sintezno metodo tvorbe 1,2,4-oksadiazolnega obroča, ciklizacijo *O*-acilamidoksimov. Sinteza je potekala v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo amidoksim, ki smo ga predhodno sintetizirali z adicijo hidroksilamina na nitril, *O*-acilirali z aktivirano karboksilno kislino. V drugi stopnji pa smo z intramolekulske ciklodehidracijo tvorili 1,2,4-oksadiazolni obroč.

#### 5.1.1. Zaščita in odščita OH-skupine hidroksibenzojskih kislin

Pri *O*-aciliranju amidoksimov smo uporabili različno substituirane, aktivirane hidroksibenzojske kisline, katerih OH-skupine smo predhodno zaščitili, da bi zagotovili selektiven potek reakcije. OH-skupine hidroksibenzojskih kislin (2,4-dihidroksibenzojske kisline, 2,3-dihidroksibenzojske kisline, 3,4-dihidroksibenzojske kisline, 3-hidroksibenzojske kisline in 4-hidroksibenzojske kisline) smo zaščitili v obliki estrov tako, da smo tvorili acetate. Za takšno obliko zaščite OH-skupin smo se odločili, ker je sinteza acetatov enostavna, njihovo odščito pa lahko izvedemo pod kislimi ali bazičnimi pogoji ali s hidrogenolizo [39]. Reakcijo *O*-aciliranja smo izvedli z acetanhidridom, kot acilirnim sredstvom, kot topilo pa smo uporabili piridin. Po predpisu, ki so ga objavili Elsinghorst in sodelavci, bi reakcija morala poteči po 1 h mešanja reakcijske zmesi pri sobni temperaturi [40]. Ker tudi po 2 h s TLC še vedno nismo zaznali konca reakcije, smo reakcijski zmesi dodali še acetanhidrid in piridin, da sta bila v prebitku, ter bučko ovili z alufolijo, da smo potek reakcije zaščitili pred svetlobo. Reakcijski zmesi smo po 3 h dodali še katalizator (DMAP) in podaljšali čas poteka reakcije na 24h. Po poteku reakcije je sledila enostavna izolacija. Reakcijsko zmes smo zlili v čašo z ledom. Ledeno zmes smo po predpisu nakisali s 3M HCl do pH ~ 2. Izkazalo se je, da lahko tudi malo bolj nakisamo (pH ~ 1) in na ta način hkrati odstranimo še prisoten piridin. Sledila je še ekstrakcija z etilacetatom, sušenje organske faze, odparevanje topila in sušenje končnega produkta do konstantne mase. Sinteze spojin **1**, **2**, **3**, **4** in **5** so na ta način potekle s precej visokimi izkoristki (88,5 %, 86,4 %, 83,3 %, 92,5 % in 90,1 %).

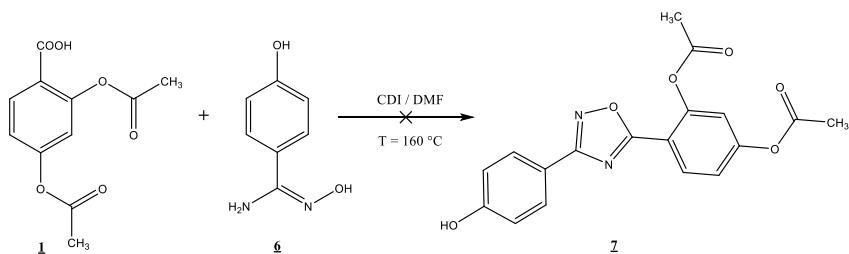
### 5.1.2. Sinteza amidoksimov

4-hidroksibenzamidoksim (spojina **6**), ki smo ga uporabili pri vseh nadaljnjih reakcijah *O*-aciliranja z aktiviranimi benzojskimi kislinami, smo sintetizirali z adicijo hidroksilamina na nitril. Izhajali smo iz 4-cianofenola, ki smo ga raztopili v etanolu. Raztopini smo dodali še kalijev karbonat ( $K_2CO_3$ ), s katerim smo zagotovili alkalne pogoje in hidroksilamin hidroklorid ( $NH_2OH \times HCl$ ).  $NH_2OH \times HCl$  je zelo higroskopen, zato smo ga predhodno dobro posušili v sušilniku. Reakcija je potekla po predpisu ( $T = 90^\circ C$ , 24 h) brez posebnosti. Po izolaciji smo dobili produkt, ki je vseboval še nekaj izhodne spojine (nečistota). Izhodna spojina (4-cianofenol) je bistveno bolj topna v acetonu, kot naš dobljeni produkt (spojina **6**), zato smo produkt 2-krat sprali z acetonom in na ta način skoraj v celoti odstranili izhodno spojino ter dobili skoraj popolnoma čist produkt. S spiranjem pa je prišlo tudi do nekaj izgub produkta. Končni izkoristek reakcije je bil zato 60,6 %.

### 5.1.3. Sinteza 1,2,4-oksadiazolnega obroča

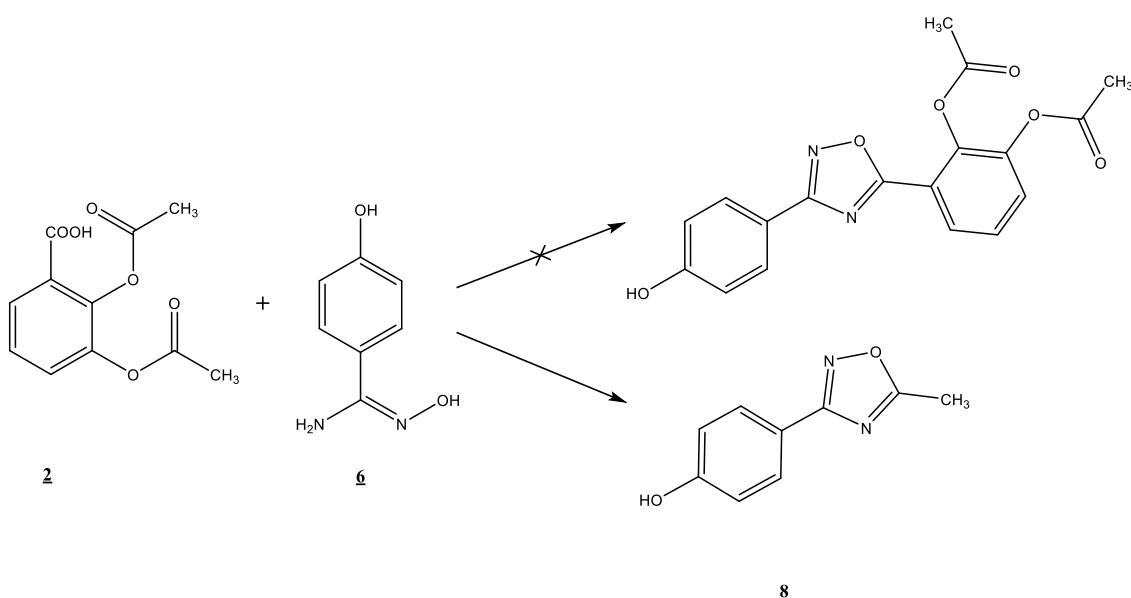
Sintezo 1,2,4-oksadiazolnega obroča smo izvedli s ciklizacijo *O*-acilamidoksimov, za katero smo uporabili različne sintezne pristope.

Pri prvem pristopu, ki smo ga uporabili, smo za aktivacijo zaščitenih hidroksibenzojskih kislin (spojine **1**, **2**, **3**, **4** in **5**) »in situ« uporabili sklopitveni reagent CDI, ki hkrati tudi olajša sledičo ciklodehidracijo, ki smo jo izvedli pri  $T = 160^\circ C$  [34]. Kot reakcijsko topilo smo pri izvedbi teh reakcij uporabili DMF. Po končanih reakcijah smo s pomočjo NMR ugotovili, da dobljeni produkti vsebujejo še DMF in ostale nečistote, zato smo jih očistili s pomočjo kolonske kromatografije. Po čiščenju smo strukturo dobljenih produktov žeeli potrditi s pomočjo NMR. Pri poskusu sinteze spojine **7** nam to ni uspelo, saj smo dobili zelo nečisto zmes, ki je ni bilo dovolj za izvedbo potrebnih analiz, s katerimi bi lahko identificirali dobljeni produkt. Reakcija zato ni bila uspešna.



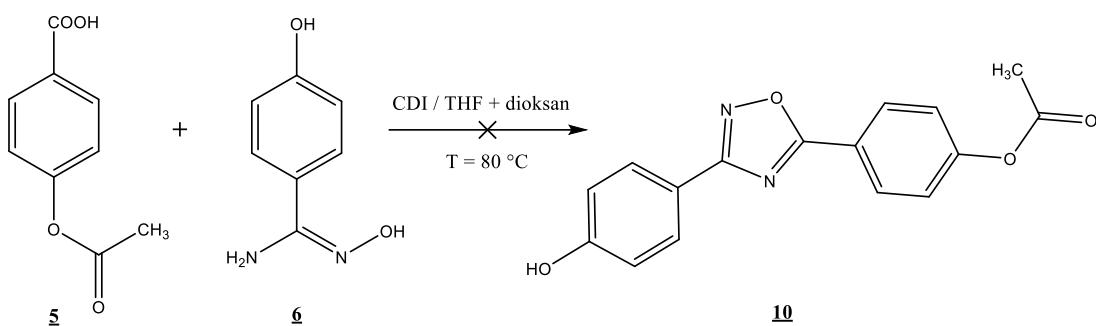
Slika 18: Neuspeli poskus sinteze spojine **7**

V primeru sinteze spojine **8** pa nam je dobljeni produkt uspelo identificirati. S pomočjo NMR smo ugotovili, da je sinteza 1,2,4-oksadiazolnega obroča sicer potekla, vendar je nastal drugačen produkt od pričakovanega. Prišlo je do migracije acetilne skupine, ki se je namesto aktivirane spojine **2** vezala na amidoksim in tvorila 1,2,4-oksadiazolni obroč. Strukturo dobljenega produkta smo potrdili z  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijo, masno spektrometrijo, masno spektrometrijo visoke ločljivosti in IR-ATR spektroskopijo. Reakcija je potekla s slabim izkoristkom (spojina **8**: 19,1 %).



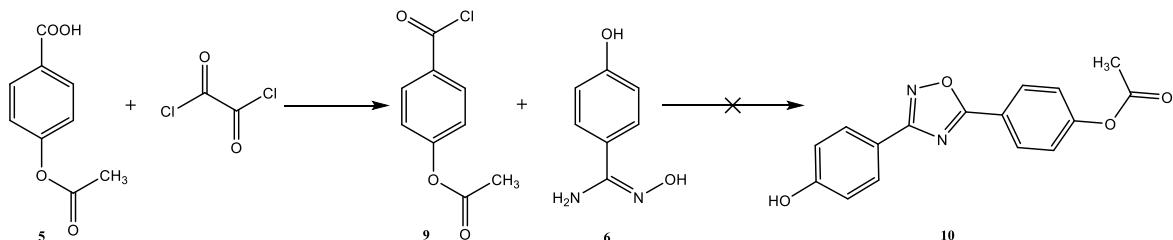
*Slika 19: Sinteza drugačnega produkta od pričakovanega (sinteza spojine **8**)*

Ker bi bil za neuspešno izvedbo sinteze 1,2,4-oksadiazolov pri prvem sinteznem pristopu lahko odgovoren DMF slabše kakovosti, smo pri drugem sinteznem pristopu uporabili drugo reakcijsko topilo in sicer mešanico topil THF in dioksana (poskus sinteze spojine **10**). THF in dioksan sta si po lastnostih podobni topili, zato ju lahko mešamo. Za mešanico smo se odločili zato, da smo z dodatkom dioksanata ( $T_{vreljšča} = 101,1\text{ }^\circ\text{C}$ ) zvišali vrednost THF ( $T_{vreljšča} = 66,0\text{ }^\circ\text{C}$ ) in smo lahko reakcijo ciklodehidracije izvedli pri  $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$ . Tudi v tem primeru smo kot sklopitveni reagent uporabili CDI. Imeli pa smo nekaj težav pri izolaciji produkta. Pri izvedbi ekstrakcije smo organsko fazo preveč spirali z vodnimi raztopinami, predvsem s samo  $\text{H}_2\text{O}$ , rezultat tega pa so bile velike izgube produkta, saj gre produkt vedno tudi v vodno fazo. Da bi izgube produkta omilili, smo izvedli še reekstrakcijo. Reakcija nam vseeno ni uspela, saj nismo dobili želenega produkta.



*Slika 20: Neuspeli poskus sinteze spojine **10** pri katerem smo uporabili mešanico topil THF in dioksan*

Spojino **10** smo poskusili sintetizirati tudi po drugem postopku, pri katerem smo namesto aktivirane karboksilne kisline za *O*-aciliranje amidoksimov uporabili kislinski klorid (4-(klorokarbonil)fenilacetat (**9**)), ki smo ga predhodno sintetizirali po klasičnem sinteznem postopku za sintezo kislinskih kloridov, iz spojine **5** in oksalil klorida. Kot reakcijsko topilo smo pri sintezi kislinskega klorida uporabili DKM, ki smo mu dodali 2 kapljice DMF, ki je služil kot katalizator. Reakcija sinteze kislinskega klorida je potekala brez posebnosti, le po koncu reakcije je bilo v reakcijski zmesi še vedno prisotnega nekaj prebitnega oksalil klorida, ki smo se ga znebili z raztopitvijo zaostanka v etru. Eter in oksalil klorid namreč tvorita azeotropno zmes, ki tako vre pri nižji temperaturi. Tudi z uporabo tako pripravljenega kislinskega klorida, nam sinteza spojine **10** ni uspela, kar smo potrdili z NMR.



*Slika 21: Neuspela reakcija 1,2,4-oksadiazolnega analoga (spojine **10**) z uporabo kislinskega klorida*

Za sintezo spojine **11** smo uporabili različne sintezne pristope, da bi našli najbolj optimalne reakcijske pogoje za reakcijo nezaščitene 4-hidroksibenzojske kisline s 4-hidroksibenzamidoksimom. Pri postopku A so uporabili enake pogoje (CDI, DMF) kot pri prvem pristopu reakcije zaščitenih hidroksibenzojskih kislin s 4-hidroksibenzamidoksimom. Po 24 h smo reakcijo prekinili in s pomočjo TLC ugotovili, da reakcija ni potekla v želeni smeri, zato smo reakcijsko zmes zavrgli. Postopek B je bil poskusna reakcija, zato smo uporabili majhne količine reagentov. V tem primeru smo za aktivacijo karboksilne kisline

uporabili skloplitveni reagent TBTU ob prisotnosti baze, *N*-metilmorfolina (NMM) [35]. Pomembno je bilo, da smo dodali vse reagente hkrati. S tem smo se izognili reakciji karboksilne kisline z bazo (NMM). Kot reakcijsko topilo smo pri sintezi *O*-acilamidoksimu uporabili mešanico topil ACN in THF, kasneje pri ciklodehidraciji pa mešanico topil piridin in dioksan. Reakcija je potekla brez posebnosti in končni rezultat je bil naš želeni produkt, spojina **11**. Pri postopku C smo izvedli še dodatno modifikacijo postopka B. Za aktivacijo karboksilne kisline smo tudi v tem primeru uporabili skloplitveni reagent TBTU s to razliko, da smo ga tokrat dodali nazadnje, vse ostale reagente pa že prej (4-hidroksibenzojsko kislino, 4-hidroksibenzamidoksim in NMM). Poleg tega smo reakcijski zmesi dodali še katalizator reakcije, DMAP. Sintezo *O*-acilamidoksimu smo tudi v tem primeru izvedli v mešanici topil ACN in THF. Kasnejšo ciklodehidracijo pa smo tokrat izvedli samo v dioksanu. Razlika je bila še v tem, da smo tokrat pred segrevanjem reakcijski zmesi dodali še TBAF, ki olajša potek ciklodehidracije [36] in KF. Reakcija je potekala brez težav in tudi tokrat smo dobili naš želeni produkt, spojino **11**. Izkoristek reakcije pa je bil kljub vsemu nizek (17,7 %), vendar boljši kot pri postopku B.

Tudi pri sintezi spojine **12** smo testirali različne sintezne postopke. Pri postopku A smo spojino **12** poskusili sintetizirati z že prej uporabljenim sinteznim postopkom. Za aktivacijo 3,5-dimetoksibenzojske kisline smo ponovno uporabili skloplitni reagent CDI, le da smo tokrat pri izolaciji produkta organsko fazo spirali s citronsko kislino, da bi lažje odstranili še vedno prisoten DMF. Vse ostalo smo naredili tako, kot že pri prej izvedenih sintezah. Reakcija nam tudi tokrat ni najbolje uspela, saj smo dobili zelo slab izkoristek reakcije. Pri postopku B smo za aktivacijo kisline ponovno uporabili skloplitvi reagent TBTU ob prisotnosti NMM, kot topilo za sintezo *O*-acilamidoksimu pa smo uporabili THF. Po nastanku *O*-acilamidoksimu smo s surovim produktom, brez vmesne izolacije, šli v naslednjo stopnjo in ciklodehidracijo poskusili izvesti po dveh različnih poteh pod vplivom mikrovalov. V enem primeru smo kot reakcijsko topilo uporabili mešanico topil dioksan in piridin, v drugem primeru pa etanol z dodanim trietilaminom. V nobenem primeru reakcija ciklizacije ni potekla do konca, zato smo dobljena produkta združili, ju raztopili v mešanici topil dioksan in piridin in segrevali 24 h. Ker reakcija ciklizacije še vedno ni potekla do konca, smo odporeli topilo in zaostanku dodali še TBAF, vse skupaj raztopili v THF in ponovno segrevali 24 h. Tokrat je reakcija ciklizacije potekla do konca in dobili smo čist produkt, kar smo najprej potrdili s TLC in kasneje še z NMR. Tudi pri postopku C smo za aktivacijo kisline uporabili TBTU ob prisotnosti NMM. Reakcijo aktivacije kisline smo

izvedli v mešanici topil DKM in THF. Razlika je bila v tem, da smo tokrat amidoksim, ki smo ga predhodno raztopili v THF, dodali šele po poteku aktivacije kisline. Po nastanku *O*-acilamidoksimu smo topilo odpareli in zaostanku dodali TBAF ter vse skupaj raztopili v THF. Ker po 1 h še ni bilo opaznih sprememb, smo topilo ponovno odpareli, zaostanek raztopili v dioksanu in dodali še KF. Po 24 h je reakcija ciklizacije uspešno potekla in dobili smo želen produkt. Izkoristek reakcije pa je bil po tem postopku najboljši (29,8 %).

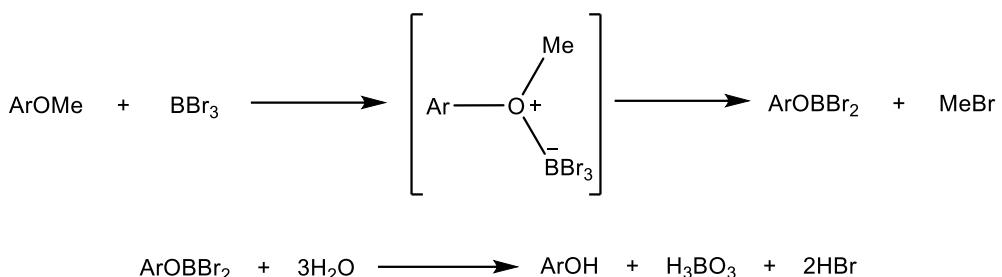
Po vseh modifikacijah sinteznih postopkov za sintezo 1,2,4-oksadiazolnega obroča, smo ugotovili, da najboljše izkoristke reakcije dobimo z uporabo sinteznega postopka, ki ga izvedemo v dveh stopnjah:

- 1) Sinteza *O*-acilamidoksimu: Za aktivacijo kisline uporabimo sklopitveni reagent TBTU ob prisotnosti NMM in reakcijski zmesi dodamo še katalizator reakcije, DMAP. Za topilo, v katerem izvedemo reakcijo, izberemo mešanico topil ACN in THF.
- 2) Ciklodehidracija: Izvedemo jo s surovim produktom (*O*-acilamidoksimom) prejšnje stopnje brez predhodne izolacije produkta. Kot reakcijsko topilo uporabimo dioksan. Da reakcija ciklodehidracije čim bolje poteče, pa je potreben še dodatek TBAF in KF.

#### **5.1.4. Uvedba in odstranitev metilne skupine na fenolno OH-skupino**

Na prosto fenolno OH-skupino nekaterih sintetiziranih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola (spojini **12** in **14**) smo uvedli dodatno metilno skupino. Metiliranje smo izvedli ob prisotnosti cezijevega karbonata ( $Cs_2CO_3$ ), ki je zagotovil alkalne pogoje reakcije. Za uporabo  $Cs_2CO_3$  kot baze smo se odločili, ker je  $Cs_2CO_3$  stabilen, dobro topen v uporabljenem reakcijskem topilu (ACN) in daje boljše izkoristke reakcije v primerjavi s  $K_2CO_3$  [41]. Po 15 min smo dodali še  $CH_3I$ , ki je donor metilne skupine. Reakcija je potekla po 1,5 h brez posebnosti in dobili smo želena produkta (spojini **15** in **16**) z dokaj dobrim izkoristkom (67,2 % in 73,2 %).

Ker so metilni etri ponavadi zelo obstojni, smo se odstranjevanja metilne skupine z metoksi-skupin nekaterih sintetiziranih 1,2,4-oksadiazolnih analogov (spojini **12** in **14**), lotili z zelo agresivnimi pogoji. Uporabili smo močno Lewisovo kislino  $BBr_3$  v nevodnem mediju. Reakcija demetiliranja verjetno poteče preko kompleksa, ki se tvori med reagentom in kisikovim atomom v etru [42].



*Slika 22: Potek reakcije demetiliranja preko kompleksa, ki se tvori med  $\text{BBr}_3$  in kisikovim atomom v metilnem etru [42]*

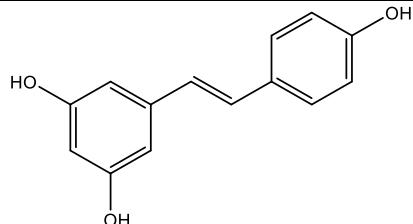
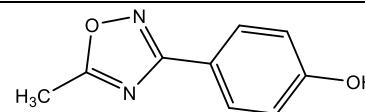
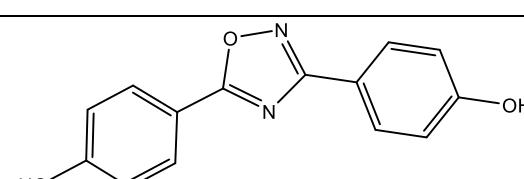
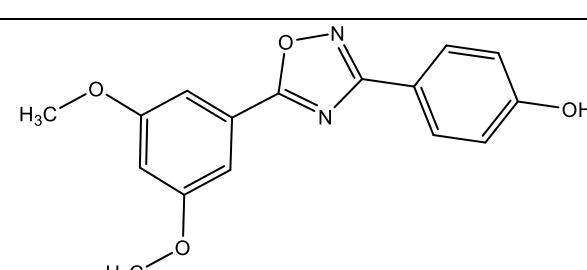
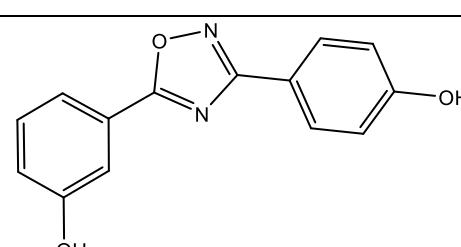
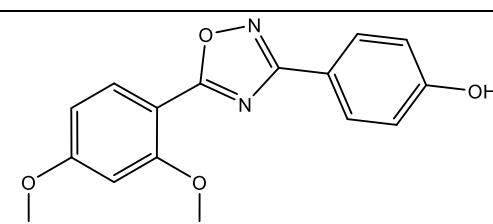
Kot reakcijsko topilo smo uporabili DKM. Pred dodatkom  $\text{BBr}_3$  smo reakcijsko zmes ohladili na  $-20^\circ\text{C}$ , zaradi eksotermnega poteka reakcije.  $\text{BBr}_3$  smo dodali v prebitku, in sicer 3 mol  $\text{BBr}_3$  na eno metoksi skupino. Po poteku reakcije smo reakcijski zmesi dodali metanol s katerim smo odstranili prebitni  $\text{BBr}_3$ . Sledila je še izolacija spojine in čiščenje produkta s pomočjo kolonske kromatografije. Pri sintezi spojine **17** je reakcija potekla brez posebnosti in z 48,3 % izkoristkom. Pri sintezi spojine **18** pa reakcija ni potekla v celoti, odpadla je le ena metilna skupina. Tudi izkoristek reakcije je bil v tem primeru slabši, in sicer le 40,5 %.

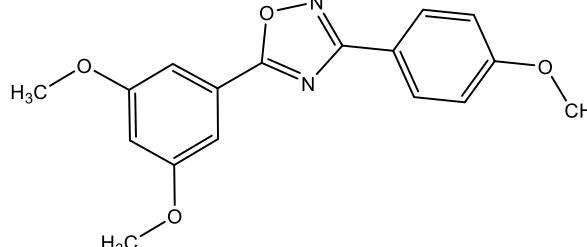
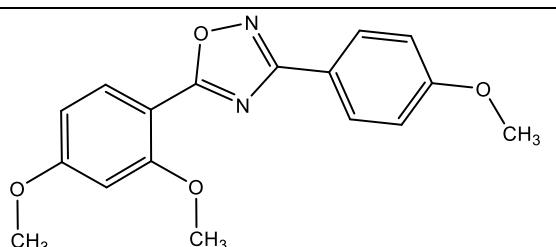
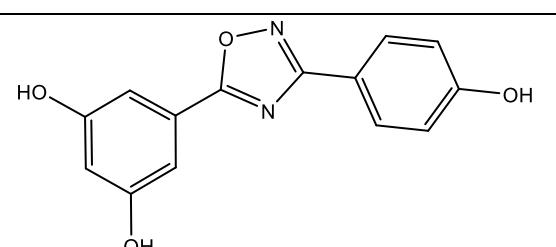
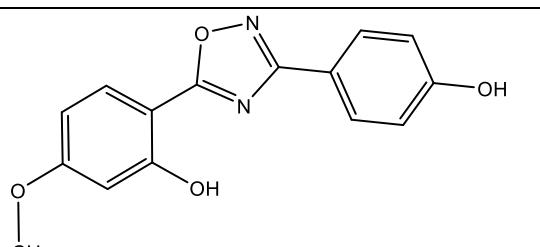
## 5.2. TESTIRANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Resveratrol, iz katerega strukture smo izhajali pri načrtovanju naših spojin, dokazano izkazuje pomembne antioksidativne lastnosti, zato so po celotnem eksperimentalnem delu, v okviru druge magistrske naloge, naše spojine še biološko ovrednotili, in sicer so testirali njihovo antioksidativno delovanje [43].

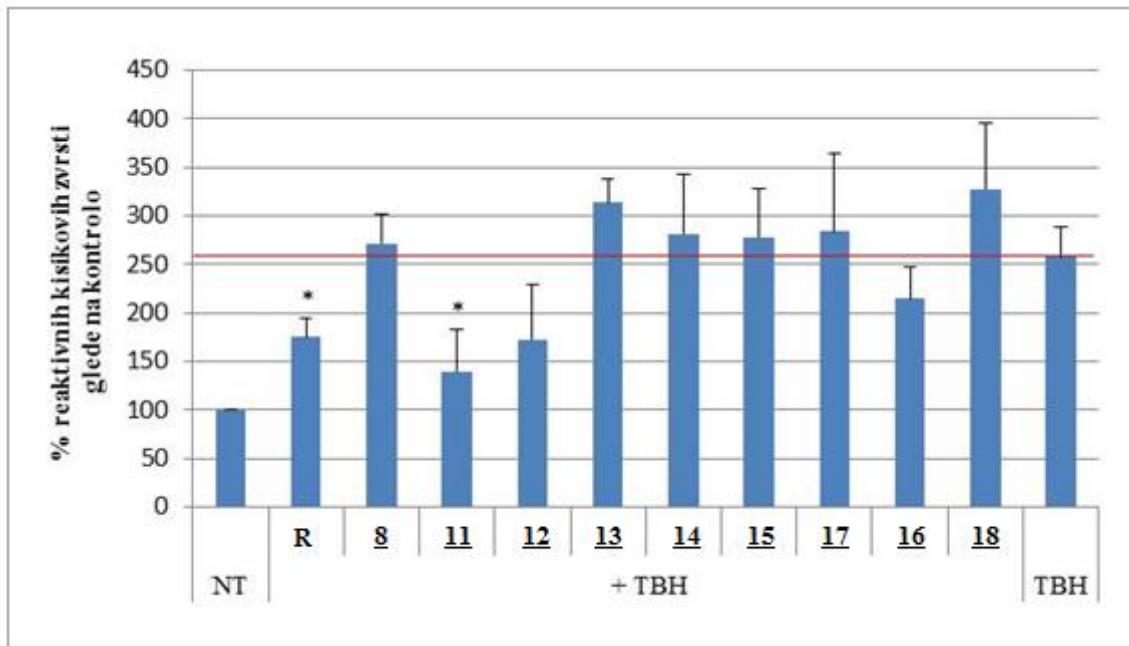
Celicam so dodali TBH (*terc*-butil hidroperoksid), ki je organski peroksid in se pogosto uporablja v različnih oksidacijskih procesih. Z njim so sprožili oksidativni izbruh, s sprožitvijo radikalne polimerizacije (iniciator). Spojine, ki imajo antioksidativne lastnosti, so sposobne zmanjšati nastanek reaktivnih okidativnih spojin v celicah. Nivo zmanjšanja se lahko določi z uporabo barvila  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (2',7'-diklorodihrofluorescein diacetat), ki je kemično reducirana oblika fluoresceina in indikator ROS v celicah. Nefluorescentni  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  se po cepitvi acetatnih skupin z znotrajceličnimi esterazami in po oksidaciji namreč pretvori v visoko fluorescenten 2',7'-diklorofluorescein (DCF), ki ga nato lahko merimo s pretočnim citometrom.

Preglednica I: 1,2,4-oksadiazolni analogi resveratrola testirani na antioksidativno delovanje

<b>OZNAKA SPOJINE</b>	<b>ID SPOJINE</b>	<b>STRUKTURNA FORMULA</b>
R	RESVERATROL	
<u>8</u>	ZMP-9	
<u>11</u>	ZMP-15	
<u>12</u>	ZMP-17	
<u>13</u>	ZMP-20	
<u>14</u>	ZMP-21	

<b><u>15</u></b>	ZMP-23	
<b><u>16</u></b>	ZMP-25	
<b><u>17</u></b>	ZMP-24	
<b><u>18</u></b>	ZMP-26	

Pri testiranju antioksidativnega delovanja naših spojin so dobili naslednje rezultate (slika 22).



Slika 23: Določitev reaktivnih kisikovih zvrsti glede na kontrolo [43]

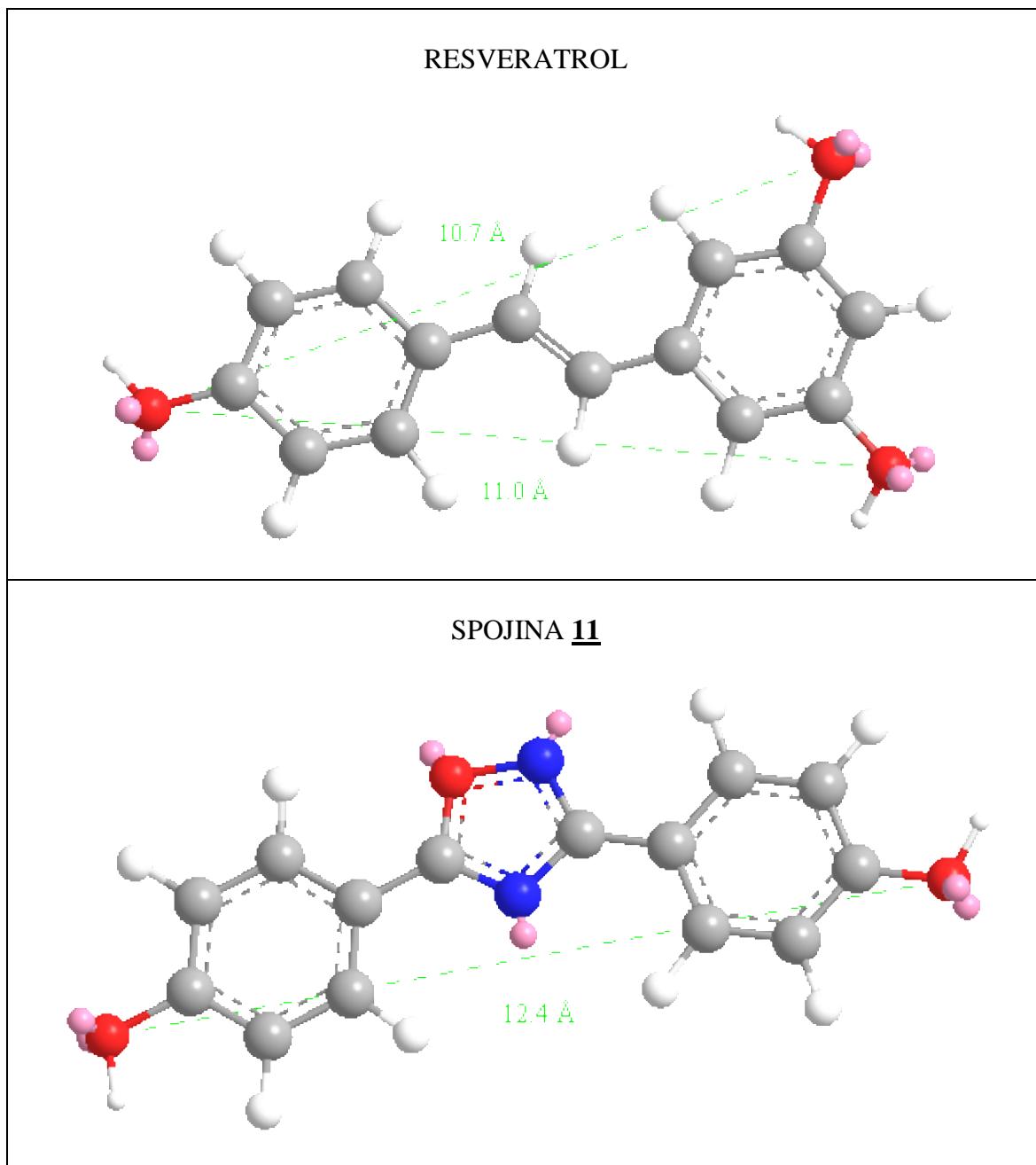
Iz prikazanih rezultatov lahko vidimo, da dodatek TBH poveča prisotnost ROS za približno 2,5-krat v primerjavi z netretiranimi celicami. Spojine **8**, **13**, **14**, **15**, **17** in **18** ne izkazujejo antioksidativnega delovanja, delež ROS je namreč zelo podoben glede na celice, ki so bile tretirane le s TBH. Resveratrol, spojine **11**, **12** in **16** pa izkazujejo antioksidativno delovanje. Pri spojinah **12** in **16** opazimo le rahlo zmanjšanje ROS, spojina **11** ( $4,4'-(1,2,4\text{-oksadiazol}-3,5\text{-diil})$ difenol) pa izkazuje najboljše antioksidativno delovanje. Obseg nastanka ROS se pri njej zmanjša skoraj za 50 %, kar pomeni, da spojina **11** izkazuje celo boljše antioksidativno delovanje kot resveratrol.

Če ugotavljamo povezavo med strukturo in delovanjem vidimo, da je za antioksidativno delovanje pomembna OH skupina vezana na *para* mestu aromatskega obroča, enako kot pri resveratrolu. Poleg tega je za antioksidativno delovanje pomembna tudi vezava substituentov na drugi fenolni obroč. Spojina izkazuje najboljše antioksidativno delovanje v primeru, da je tudi na drugem fenolnem obroču vezana OH skupina na *para* mestu (spojava **11**), šibko antioksidativno delovanje pa imajo tudi spojine, ki imajo na drugem obroču vezani dve metoksi skupini, in sicer na mestih 3 in 5 (spojava **12**) ali na mestih 2 in 4 (spojava **16**).

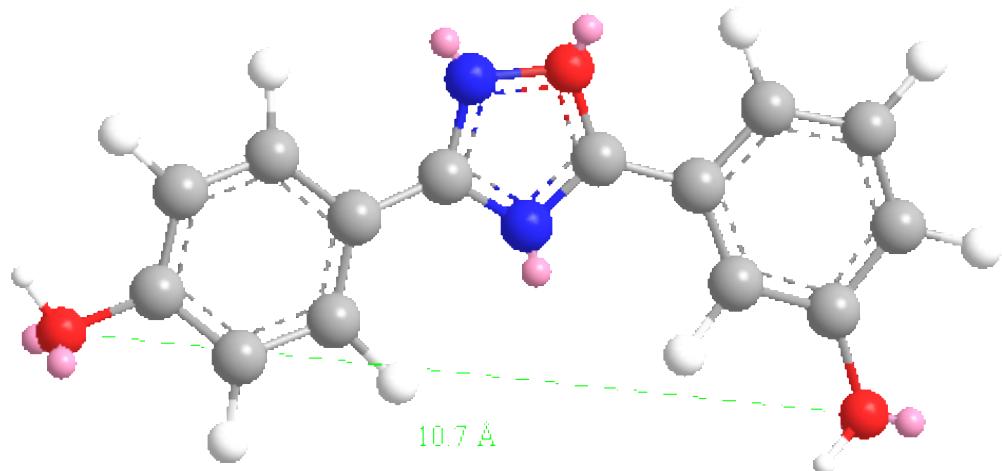
S pomočjo računalniškega programa ChemBioDraw pa smo ugotavljali tudi, kakšen vpliv

na antioksidativno delovanje posameznih spojin, ima razdalja med OH skupinami na obeh fenilnih obročih, v primerjavi z resveratrolom (preglednica II).

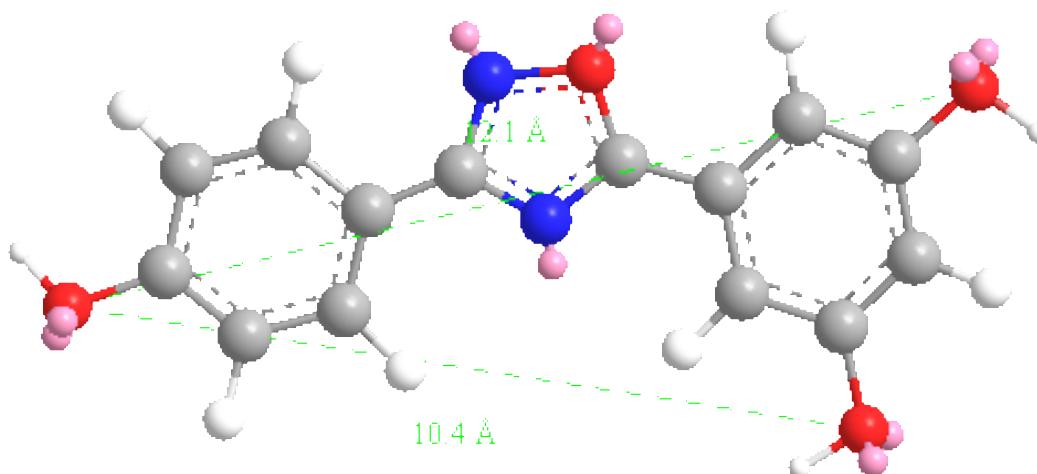
*Preglednica II: Prikaz razdalij med OH skupinami pri resveratrolu in pri nekaterih 1,2,4-oksadiazolnih analogih resveratrola (spojine 11, 13 in 17)*



SPOJINA 13



SPOJINA 17



Kljub temu, da je razdalja med OH skupinami na obih fenilnih obročih pri spojinah 13 in 17 zelo podobna kot pri resveratrolu, ne izkazujeta antioksidativnega delovanja. Pri spojni 11 pa je ta razdalja večja, vendar spojina kljub temu izkazuje celo boljše antioksidativno delovanje od resveratrola.

Za dobro razumevanje mehanizma antioksidativnega delovanja naših na novo sintetiziranih analogov bi bilo potrebno izvesti še dodatna testiranja, lahko pa potrdimo, da ima največji potencial za nadaljnja testiranja in modifikacije predvsem spojina 11.

## 6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali 9 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola. 1,2,4-oksadiazolni obroč smo sintetizirali s sintezno metodo ciklizacije *O*-acilamidoksimov. Za ciklizacijo *O*-acilamidoksimov smo uporabili različne sintezne postopke. Za najbolj optimalnega se izkazal sintezni postopek pri katerem smo za aktivacijo kisline uporabili sklopitevni reagent TBTU ob prisotnosti NMM, reakcijski zmesi smo dodali tudi katalizator reakcije (DMAP), ciklodehidracijo pa smo izvedli v dioksanu ob dodatku TBAF in KF. Kljub vsemu ima izbrani postopek še nekaj pomanjkljivosti. Dobili smo nečiste produkte, ki smo jih morali očistiti s pomočjo kolonske kromatografije, prav tako so bili izkoristki reakcij dokaj nizki.

Sintezni postopek ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{CH}_3\text{I}/\text{ACN}$ ), ki smo ga uporabili za uvedbo metilne skupine na nekatere OH skupine nekaterih 1,2,4-oksadiazolnih analogov resveratrola, se je izkazal za dobrega. Reakciji sta potekli brez večjih posebnosti in s precej dobrima izkoristkoma.

Sintezni postopek ( $\text{BBr}_3/\text{DKM}$ ), ki smo ga uporabili za odstranitev metilne skupine z OH skupin nekaterih 1,2,4-oksadiazolnih analogov, pa se v enem primeru ni izkazal za učinkovitega. Reakcija ni potekla do želenega produkta. Odstranila se je le ena metilna skupina namesto dveh. Za boljši rezultat bi mogoče morali dodati več  $\text{BBr}_3$  ali uporabiti drug postopek odstranitve metilne skupine.

Pri testiranju za antioksidativno delovanje se je za najbolj aktivno izkazala končna spojina **11** (4,4'-(1,2,4-oksadiazol-3,5-diil)difenol), ki izkazuje celo boljše antioksidativno delovanje od resveratrola in zato lahko služi kot osnova za nadaljnje načrtovanje in sinteze novih analogov resveratrola.

V prihodnosti bi lahko za sintezo novih analogov resveratrola namesto 1,2,4-oksadiazolnega obroča uporabili tudi 1,3,4-oksadiazolni obroč. 1,2,4-izomer in 1,3,4-izomer sta si namreč geometrijsko skoraj identična, usmerjata možne substituente v isti prostor, zato je pričakovati, da se tudi na vezavno mesto vežeta na podoben način. Vendar pa ima 1,3,4-izomer boljše lastnosti, saj je bolj metabolno stabilen, manj lipofilen in posledično bolje topen v vodi [29].

## 7. LITERATURA

1. Wu Chun-Fu, Yang Jing-Yu, Wang Fang, Wang Xiao-Xiao: *Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications.* Chinese Journal of Natural Medicines 2013; 11(1): 1-15
2. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T: *Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?.* Mutation Research 2008; 658: 68-94
3. [http://en.wikipedia.org/wiki/Veratrum\\_album](http://en.wikipedia.org/wiki/Veratrum_album) (januar 2014)
4. [http://en.wikipedia.org/wiki/Fallopia\\_japonica](http://en.wikipedia.org/wiki/Fallopia_japonica) (januar 2014)
5. <http://naturigin.com/portfolio-items/grape/> (januar 2014)
6. Borriello A, Cucciolla V, Della Ragione F, Galletti P: *Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis.* Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 2010; 20: 618-625
7. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C: *Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?.* Journal of Controlled Release 2012; 158: 182-193
8. Walle T: *Bioavailability of resveratrol.* Annals of the New York Academy of Sciences 2011; 1215: 9-15
9. Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C: *Antioxidant effect of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases.* Food and Chemical Toxicology 2013; 61: 215-226
10. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, Latruffe N: *Transport, stability and biological activity of resveratrol.* Annals of the New York Academy of Sciences 2011; 1215: 48-59
11. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E: *Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review.* Food Chemistry 2012; 130: 797-813
12. Osredkar J: *Oksidativni stres.* Zdravniški Vestnik 2012; 81: 393–406
13. Katedra za farmacevtsko kemijo: *Antioksidanti, Vaje in seminarji iz farmacevtske kemije 3,* 2010

14. Pandey KB, Rizvi SI: *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2009; 5: 270-278
15. Alarcón de la Lastra C, Villegas I: *Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications*. Biochemical Society Transactions 2007; 35: 1156-1160
16. Ribarič S (urednik): *Temelji patološke fiziologije*. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2009: 47-62;
17. Paul AT, Gohil VM, Bhutani KK: *Modulating TNF- $\alpha$  signaling with natural products*. Drug Discovery Today. 2006; 15-16: 725-732
18. <http://www.amepc.org/tgc/article/view/2860/3778> (februar 2014)
19. Mooren FC (Editor): *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease 2012*: page 88
20. Kreft S, Kočevar Glavač N: *Sodobna fitoterapija*. Slovensko farmacevtsko društvo 2013; 391-397
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Diethylstilbestrol> (februar 2014)
22. <http://www.zdravstvena.info/vsznj/degenerativne-bolezni-zivcevja/#> (februar 2014)
23. Lu J, Li C, Chai YF, Yang DY, Sun CR: *The antioxidant effect of imine resveratrol analogues*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012; 22: 5744-5747
24. Simon C, Britton RG, Cai H, Gescher AJ, Brown K, Jenkins PR: *Novel analogues of resveratrol: metabolism and inhibition of colon cancer cell proliferation*. Tetrahedron 2013; 69: 6203-6212
25. Kucinska M, Piotrowska H, Luczak MW, Mikula-Pietrasik J, Ksiazek K, Wozniak M, Wierzchowski M, Dudka J, Jager W, Murias M: *Effects of hydroxylated resveratrol analogs on oxidative stress and cancer cells death in human acute T cell leukemia cell line, Prooxidative potential of hydroxylated resveratrol analogs*. Chemico-Biological Interactions 2014; 209: 96-110
26. Mayhoub AS, Marler L, Kondratyuk TP, Park EJ, Pezzuto JM, Cushman M: *Optimizing thiadiazole analogues of resveratrol versus three chemopreventive targets*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2012; 20: 510-520
27. Mayhoub AS, Marler L, Kondratyuk TP, Park EJ, Pezzuto JM, Cushman M: *Optimization of thiazole analogues of resveratrol for induction of NAD(P)H: quinone reductase 1 (QR1)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2012; 20: 7030-7039

28. Moreira Lima L, Barreiro EJ: *Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design*. Current Medicinal Chemistry 2005; 12: 23-49
29. Boström J, Hogner A, Llinàs A, Wellner E, Plowright AT: *Oxadiazoles in Medicinal Chemistry*. Journal of Medicinal Chemistry 2012; 55: 1817-1830
30. Pace A, Pierro P: *The new era of 1,2,4-oxadiazoles*. Organic & Biomolecular Chemistry 2009; 7: 4337-4348
31. Zhao C, Liu ZQ: *Diaryl-1,2,4-oxadiazole antioxidants: Synthesis and properties of inhibiting the oxidation of DNA and scavenging radicals*. Biochimie 2013; 95: 842-849
32. Jakopin Ž, Sollner Dolenc M: *Recent advances in the synthesis of 1,2,4- and 1,3,4-oxadiazoles*. Current Organic Chemistry 2008; 12: 850-898
33. Kallikat Augustine J, Akabote V, Ganapati Hegde S, Alagarsamy P: *PTSA – ZnCl<sub>2</sub>: An efficient catalyst for the synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from amidoximes and organic nitriles*. Journal of Organic Chemistry 2009; 74: 5640-5643
34. Deegan TL, Nitz TJ, Cebzanov D, Pufko DE, Porco JA: *Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using CDI activation*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1999; 9: 209-212
35. Poulain RF, Tartar AL, Deprez BP: *Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acids using an improved, uronium-based, activation*. Tetrahedron Letters 2001; 42: 1495-1498
36. Gangloff AR, Litvak J, Shelton EJ, Sperandio D, Wang VR, Rice KD: *Synthesis of 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles using tetrabutylammonium fluoride as a mild and efficient catalyst*. Tetrahedron Letters 2001; 42: 1441-1443
37. Kandre S, Rambhau Bhagat P, Sharma R, Gupte A: *Microwave assisted synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles from substituted amidoximes and benzoyl cyanides*. Tetrahedron Letters 2013; 54: 3526-3529
38. <http://www.theliquidphase.org/index.php?title=Chromatography> (marec 2014)
39. Ramesh C, Mahender G, Ravindranath N, Das B: *A mild, highly selective and remarkably easy procedure for deprotection of aromatic acetates using ammonium acetate as a neutral catalyst in aqueous medium*. Tetrahedron 2003; 59: 1049-1054
40. Elsinghorst PW, Cieslik JS, Mohr K, Tränkle C, Gütschow M: *First gallamine-tacrine hybrid: design and characterization at cholinesterases and the M2 muscarinic receptor*. Journal of Medicinal Chemistry 2007; 50: 5690

41. Lee JC, Yuk JY, Cho SH: *Facile synthesis of alkyl phenyl ethers using cesium carbonate*. Synthetic communications 1995; 25: 1367-1370
42. McOmie JFW, Watts ML, West DE: *Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide*. Tetrahedron 1968; 24: 2289-2292
43. Vrtačnik N: *Vrednotenje protivnetnega in antioksidativnega delovanja 1,2,4-oksadiazolnih derivatov resveratrola*. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, marec 2014