

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA VRHNJAK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE SPINSKO OZNAČENIH
ALKILFOSFOLIPIDOV**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA VRHNJAK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE SPINSKO OZNAČENIH
ALKILFOSFOLIPIDOV**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF SPIN-LABELED
ALKYLPHOSPHOLIPIDS**

Ljubljana, 2014

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Spektroskopske meritve (NMR, IR, MS) so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri magistrskem delu. Zahvaljujem se tudi ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko kemijo za pomoč pri eksperimentalnem delu, še posebej dr. Martini Hrast in asist. dr. Stanetu Pajku. Na koncu bi se zahvalila še svoji družini in prijateljem za pomoč in podporo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Tjaša Vrhnjak

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Mitja Kos

Član komisije: doc. dr. Mojca Lunder

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. RAK IN KANCEROGENEZA.....	1
1.2. ZDRAVLJENJE RAKAVIH OBOLENJ	1
1.3. FOSFOLIPIDNE PROTITUMORNE UČINKOVINE	2
1.3.1. Razvoj fosfolipidnih protitumornih učinkovin	2
1.3.2. Mehanizem delovanja alkilfosfolipidov	4
1.4. ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA RESONANČNA SPEKTROSKOPIJA..	6
2. NAČRT ZA DELO	7
2.1. REAKCIJSKE SCHEME	9
3. MATERIALI IN METODE	12
4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ	15
4.1. SINTEZA SPINSKO OZNAČENIH ALKILFOSFOLIPIDOV	15
4.1.1. Sinteza (<i>E</i>)-4-ciklododecenilmorfolina (1).....	15
4.1.2. Sinteza 2-heksanoilciklododekanona (2).....	16
4.1.3. Sinteza 13-oksooktadekanojske kisline (3)	17
4.1.4. Sinteza metil 13-oksooktadekanoata (4).....	18
4.1.5. Sinteza metil 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanoata (6)	19
4.1.6. Sinteza 2-(12-hidroksidodecil)-4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidina (7)	21
4.1.7. Sinteza 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 1-metil-4-piperidinil hidrogen fosfata (8)	22
4.1.8. Sinteza 4-{{{[12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil]oksi}(oksi)fosforil]oksi-1,1-dimetilpiperidinijeve notranje soli (9).....	23
4.1.9. Sinteza 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-morfolinoetil hidrogen fosfata (11)	24

4.1.10.	Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil (2-(4-metilmorfolin-4-ijev)etil) fosfat notranje soli (12).....	25
4.1.11.	Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-(piperidin-1-il)etil hidrogen fosfata (14).....	26
4.1.12.	Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-(1-metilpiperidinijev-1-il)etil fosfat notranje soli (15)	27
4.1.13.	Sinteza 4-{{[[12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil]oksi}(oksi)fosforil]oksi}- <i>N,N,N</i> -trimetil-1-etanamonjeve notranje soli (17)..	28
4.2.	METILIRANJE NITROKSIDNEGA RADIKALA	30
4.2.1.	Sinteza <i>N</i> -(2,2,6,6-tetrametil-1-metoksipiperidin-4-il)acetamida (18).....	30
4.2.2.	Sinteza <i>N</i> -(2-hidroksi-1,1-metiletil)-12-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanamida (19)	31
4.2.3.	Sinteza <i>N</i> -(2-hidroksi-1,1-dimetiletil)-6-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidin-2-il)heksanamida (20)	32
4.2.4.	Sinteza metil 12-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanoata (21)	34
4.2.5.	Sinteza 2-(12-hidroksidodecil)-4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidina (22).....	35
4.2.6.	Sinteza 2-(6-hidroksiheksil)-4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidina (23).....	36
4.2.7.	Sinteza 4-{{[[6-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidin-2-il)heksil]oksi}(oksi)fosforil]oksi}-1,1-dimetilpiperidinijeve notranje soli (24).....	38
4.3.	EPR SPEKTROSKOPIJA NITROKSIDOV	39
4.3.1.	EPR spektroskopija etanolnih raztopin nitroksidov	39
4.3.2.	EPR spektroskopija vodnih raztopin nitroksidov	39
4.3.3.	EPR spektroskopija spinsko označenega vzorca mleka	40
4.3.4.	EPR spektroskopija spinsko označenih liposomov	40
4.4.	MOLEKULSKO MODELIRANJE	42

5. REZULTATI IN RAZPRAVA	43
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	43
5.1.1. Sinteza SI-APL	43
5.1.2. Metiliranje nitroksidnega radikala – Fentonova reakcija	48
5.2. KOMENTAR NMR ANALIZ	51
5.3. KOMENTAR ANALIZ EPR SPEKTROV	55
5.4. KOMENTAR MOLEKULSKEGA MODELIRANJA.....	58
ZAKLJUČEK	59
LITERATURA	60

POVZETEK

Rak je ena izmed najpogostejših bolezni v razvitem svetu in predstavlja več kot 200 različnih malignih obolenj. Največji problem pri zdravljenju predstavlja dejstvo, da je vsako takšno maligno obolenje zgodba zase in univerzalnega zdravila za zdravljenje ni. Ker so starejše protitumorne učinkovine temeljile predvsem na delovanju na DNA in posledično imele slabo selektivno toksičnost, skušamo z raziskavami odkriti druga tarčna mesta rakavih celic in izboljšati selektivno toksičnost novih protitumornih učinkovin.

Znano je, da alkilfosfolipidi (perifosin, miltefosin, eldefosin) izražajo protitumorno delovanje, s tem ko se vgradijo v membrano rakavih celic in sprožijo njihovo apoptozo. Novejše raziskave pa so pokazale, da tudi njihovi spinsko označeni analogi delujejo protirakavo. Zato smo se v magistrskem delu osredotočili na pripravo spinsko označenih derivatov alkilfosfolipidov z različnimi polarnimi glavami, ki imajo spinski označevalec na 13. C atomu alkilne verige. Tem spojinam smo nato z metodo elektronske paramagnetne resonance posneli še spektre v različnih okoljih (voda, etanol, mleko, liposomi) in iz pridobljenih podatkov sklepali na stopnjo vgrajevanja v liposome in mikropolarnost okolja nitroksidnega radikala.

V drugem delu magistrske naloge smo pripravili diamagnetne derivate spinsko označenim alkilfosfolipidom in njihovim stranskim produktom tako, da smo nitroksidno skupino metilirali. Zaradi te strukturne spremembe produkti teh reakcij nimajo več paramagnetnih centrov, ki širijo spektre pri NMR spektroskopiji. Dobljenim spojinam smo tako lahko z metodo jedrske magnetne resonance pomerili NMR spektre in s tem potrdili strukturo izhodnih spojin.

ABSTRACT

Cancer is one of the most common diseases in the developed world and represents more than 200 different malignant diseases. The major concern is that each malignancy is its own story and therefore no general medicine for the overall treatment of cancer exists. The older anti-tumor agents are primarily based on the disruption of the DNA function and consequently have poor selective toxicity. That's why new researches are trying to find other target sites on cancer cells and improve the selective toxicity of new antitumor agents.

It is known that alkylphospholipids (perifosine, miltefosine, eldefosine) express the anti-tumor action, after being incorporated into the cancer cell's membrane, and cause apoptosis. Recent studies have shown that even their spin-labeled analogues are effective against cancer. Therefore, in our work we focused on the preparation of spin-labeled derivatives of alkylphospholipids with different polar heads and a spin marker on ^{13}C atom of the alkyl chain. Samples were then recorded with electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometer to get EPR signals in different environments (water, ethanol, milk, liposomes). From these data we deduced the degree of spin-labeled alkylphospholipid incorporation into liposomes and the micropolar environment of nitroxide radicals.

In the second part of our work we methylated nitroxide groups of some spin-labeled alkylphospholipids, their secondary and intermediate products. Due to this structural change a lack of paramagnetic centres appeared. That's why the nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum was no longer broadened. The optimised compounds were suitable for NMR spectra recording; consequentially we were able to confirm the structure of the starting compounds.

SEZNAM OKRAJŠAV

$2A_{\max}$	maksimalen hiperfina razcep
$2A_{\min}$	minimalen hiperfina razcep
AFASL (10, 5)	<i>N</i> -(1-hidroksi-2-metilpropan-2-il)-6-(4,4-dimetil-3-oksil-2-undeciloksazolidin-2-il)heksanamid
AFASL (4, 11)	<i>N</i> -(1-hidroksi-2-metilpropan-2-il)-12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentiloksazolidin-2-il)dodekanamid
a_N	izotropna ^{14}N -hiperfina sklopitvena konstanta
APL	alkilfosfolipidi
ATL	fosfolipidne protitumorne učinkovine
bs	široki singlet
CMC	kritična micelna koncentracija
CPK	Corey-Pauling-Koltun (model)
CT	fosfoholin citidiltransferaza
CTP	holin fosfat citidiltransferaza
d	dublet
DAG	diacilglicerol
dd	dublet dubleta
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO- <i>d</i>	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
ESI	elektrosprej ionizacija
Fas/CD95	apoptotični receptor tipa 1

GM-SCF	granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor
HMBC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation
HMQC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple- <u>Q</u> uantum <u>C</u> orrelation
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
IF gama	interferon gama
IL-1	interlevkin 1
IR	infrardeča spektroskopija
IUPAC	mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
LysoPC	lizofosfatidilholin
m	multiplet
MAPK/ERK	z mitogenom aktivirana protein kinaza; zunajcelično signalno regulirana kinaza
mCPBA	meta-kloroperoksibenzojska kislina
MeFASL (4,11)	metil 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentiloksazolidin-2-il)dodekanoat
MLV	večslojni liposomi
mol. ekv.	molarni ekvivalent
MTBE	metil- <i>terc</i> -butil eter
NMR	jedrska magnetna resonanca
PA	fosfatidna kislina
PC	fosfatidilholin
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PKB	protein kinaza B

PLC	fosfolipaza C
PLD	fosfolipaza D
q	kvartet
R_f	retencijski faktor
ROS	reaktivne kisikove snovi
s	singlet
SAPK/JNK	s stresom aktivirana protein kinaza/c-Jun NH(2)-terminalna kinaza
S_{eff}	ureditveni parameter
SI-APL	spinsko označeni alkilfosfolipidi
SM	sfingomielin
t	triplet
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TNF α	tumorje nekrotizirajoči faktor alfa
TsOH·H ₂ O	para-toluensulfonska kislina
TsOMe	metiltozilat
δ	kemijski premik

1. UVOD

1.1. RAK IN KANCEROGENEZA

Rak je bolezen nenadzorovane celične rasti, ki je odraz številnih pridobljenih napak v DNA celice. Za nastanek je najprej potrebna mutacija v protoonkogenih (geni, ki spodbujajo razmnoževanje celic) in nastanek onkogenov (geni, ki lahko sprožijo nastanek rakave celice). Kancerogeni, ki povzročijo nadaljnje mutacije onkogenov in tumorje zavirajočih genov (geni, ki zavirajo celično razmnoževanje) posledično privedejo do deregulacije procesa celične rasti. Pri tem se normalna celica preoblikuje v maligno, ki se na regulatorne signale ne odziva več. Celica se zato začne nenadzorovano deliti, nastanejo kloni in s časoma se razvije tumor. Ko se maligni tumor razširi v sosednja tkiva (metastazira) bolezen poimenujemo rak. Takšen izid okvare DNA je najmanj pogost. Večinoma se pri celicah s poškodovano DNA le ta popravi ali pa se v celici sproži programirana celična smrt (1, 2, 3).

1.2. ZDRAVLJENJE RAKAVIH OBOLENJ

Zdravljenje raka temelji na treh različnih pristopih: operativnem, radioterapevtskem in farmakoterapevtskem pristopu, ki se med seboj pogosto kombinirajo. Da bi bila kemoterapija čim bolj učinkovita, zdravimo s kombinacijo dveh ali več učinkovin, ki imajo protitumorno delovanje. Razvoj protitumornih učinkovin se je pričel v štiridesetih letih prejšnjega stoletja in se je tekom let precej spremenil. Starejše protitumorne učinkovine (ciklofosamid, doksorubicin, 5-fluorouracil, cisplatin, metotreksat, citarabin) so temeljile predvsem na izkoriščanju hitre rasti in proliferacije rakavih celic z neposrednim delovanjem na DNA ali posrednim delovanjem preko encimov, ki sodelujejo pri sintezi DNA. Slabost teh spojin je, da so zelo nespecifične in vplivajo tudi na normalne hitrorastoče celice, kot so na primer celice kostnega mozga. Pomanjkljivost pa se kaže tudi v dejstvu, da nekatere rakave celice ne rastejo tako hitro, zato je učinkovitost zdravljenja takšnih vrst raka nizka. Kemoterapija raka dandanes že vstopa v novo dobo zdravljenja - molekulskega tarčnega zdravljenja, kjer visoko selektivne učinkovine (učinkovine sinteznega izvora npr. imatinib, gefitinib ter monoklonska protitelesa npr. bevacizumab, cetuksimab, panitumumab, trastuzumab) ciljajo na točno določeno molekulsko mesto, ki je nenormalno ali pa v večji meri izraženo v rakastih celicah (2, 4, 5, 6).

1.3. FOSFOLIPIDNE PROTITUMORNE UČINKOVINE

Fosfolipidne protitumorne učinkovine (ATL) so heterogena skupina sinteznih lipidov, ki imajo protirakavo delovanje in v primerjavi s starejšimi protitumornimi učinkovinami ne delujejo na DNA, ampak na membrano rakave celice. Princip selektivne toksičnosti temelji na spoznanju, da se v večji meri vgradijo v membrano rakavih celic kakor v membrano normalnih celic. ATL se vgrajujejo na notranjo stran specifičnega dela membrane, imenovanega lipidni raft. Lipidni rafti so mikrodomene v celični membrani, ki vsebujejo večje količine holesterola in sfingolipidov ter proteine, ki so udeleženi pri celični signalizaciji. Količina sestavin v lipidnih raftih je med različnimi tipi celic različna. V primerjavi s preostalim delom membrane, najdemo v lipidnih raftih več holesterola, sfingolipidov in nasičenih maščobnih kislin, zaradi česar je ta del membrane manj fluiden, proteini pa imajo manjšo možnost proste difuzije po membrani. Ker vsebujejo rafti proteinske receptorje, bo vsakršna motnja v tem delu membrane povzročila nepopoln prenos celičnega signala, kar pa lahko v končni fazi vodi tudi do apoptoze celice (7, 8, 9).

1.3.1. Razvoj fosfolipidnih protitumornih učinkovin

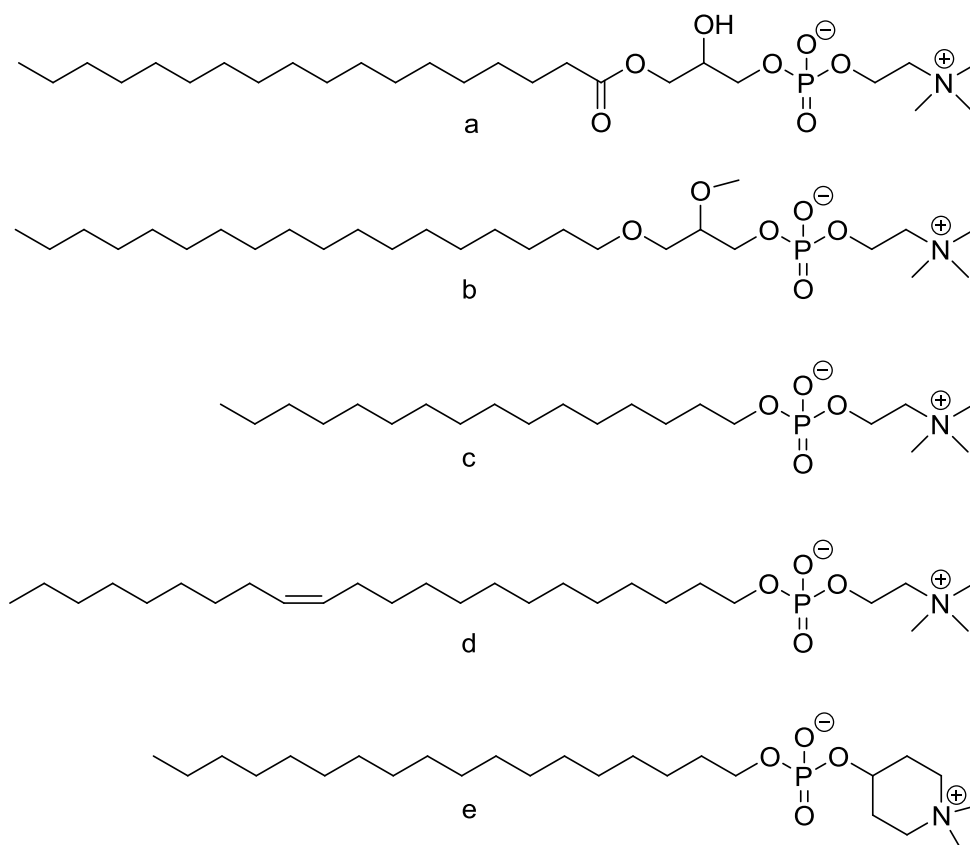
Razvoj ATL se je pričel v šestdesetih letih prejšnjega stoletja s sintezo metabolično stabilnih derivatov lizofosfatidilholina (1-acil-*sn*-glicero-3-fosfoholin, LysoPC). Z zamenjavo estrske vezi z metabolično bolj stabilno etrsko vezjo in uvedbo metila na prosto hidroksilno skupino so sintetizirali edelfosin. Spojina je izkazala protitumorno delovanje v predkliničnih študijah, v kliničnih pa dosti manjše. Edelfosin se danes v praksi uporablja le pri presaditvah kostnega mozga. Pri tem selektivno uniči levkemične celice, vendar pa ne prizadene normalnih celic kostnega mozga.

Odstranitev glicerolnega ogrodja iz edelfosina je pripeljala do odkritja miltefosina, prvega alkilfosfolipida (APL), ki se je uspešno uvedel v klinično prakso kot protitumorna učinkovina. Ker ima izrazito hemolitično delovanje, se ne sme aplicirati intravensko. Kljub temu se še danes uporablja topikalno za zdravljenje metastaz raka dojk in kožnega raka. Leta 2006 je bil v nekaterih državah tudi registriran za peroralno uporabo pri okužbah z *Leishmania sp.*

Hemolitični aktivnosti miltefosina so se izognili tako, da so na molekuli podaljšali lipofilni rep na 22 ogljikovih atomov ter na mestu 13,14 uvedli *cis*-dvojno vez. Novo molekulo so poimenovali erucilfosfoholin. Takšna strukturna sprememba je zvečala lipofilnost

molekule in ji omogočila tvorbo lamelarnih struktur, ki niso izzvale hemolize. Erucilfosfoholin je izražal tudi večjo citotoksičnost tako *in vitro* kot *in vivo* kakor njegov predhodnik miltefosin.

Zamenjava holinskega fragmenta s piperidinskim v molekuli miltefosina je pripeljala do odkritja nove generacije APL, katere predstavnik je perifosin. Ta izraža manj neželenih učinkov na gastrointestinalni sistem in manjšo hemolitično aktivnost, še posebej če se nahaja v obliki liposomskih pripravkov. Žal pa ima v takšni obliki tudi manjše protitumorno delovanje kakor prosti perifosin. Učinkovina je že v drugi in tretji fazi kliničnih preizkušanj določenih tipov rakavih obolenj (rak prostate, rak dojke, rak glave in vratu, kolorektalni rak, rak trebušne slinavke, možganski tumorji, hepatocelularni rak, multipli mielom in Waldenstromova makroglobulinemija) in bi v prihodnosti morda lahko prišla v klinično uporabo. Strukturne formule APL so prikazane na sliki 1 (5, 9, 10, 11, 12).



Slika 1: Strukturne formule APL: LysoPC (a), edelfosin (b), miltefosin (c), erucilfosfoholin (d) in perifosin (e)

1.3.2. Mehanizem delovanja alkilfosfolipidov

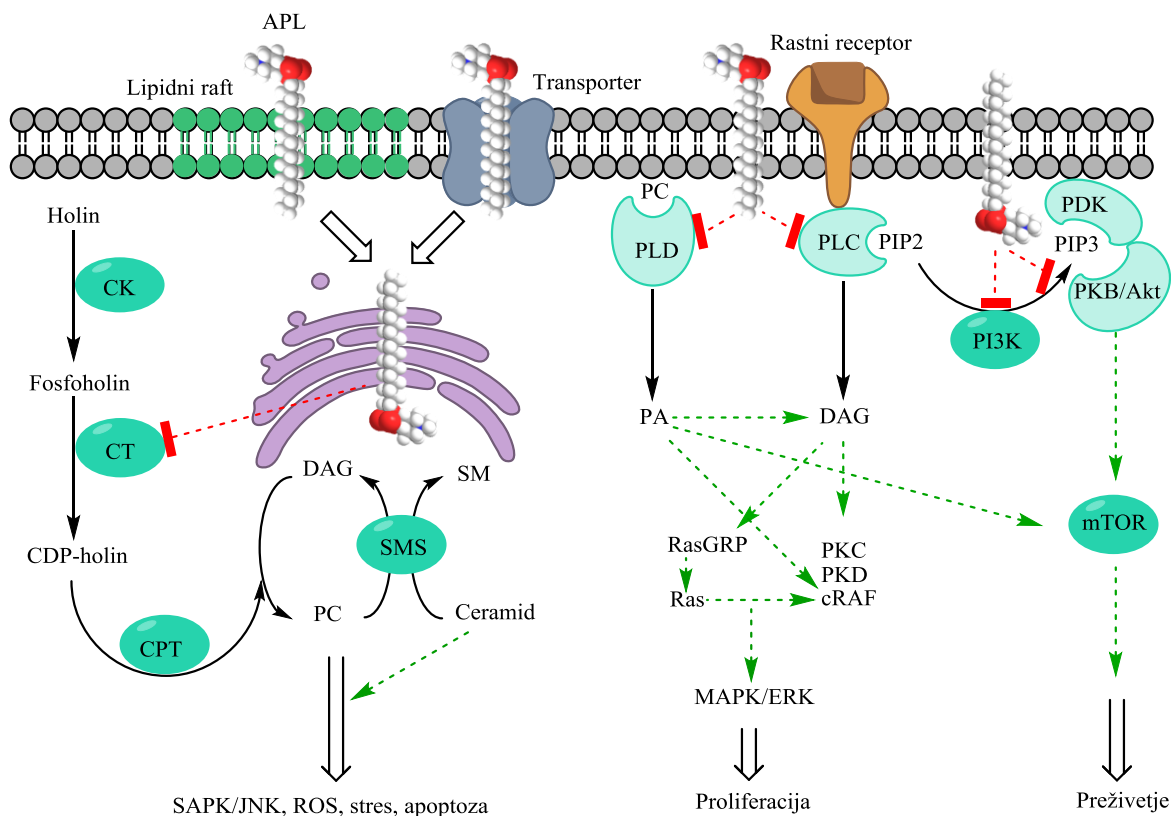
Mehanizem protitumornega delovanja APL v celoti še vedno ni pojasnjen. Zaradi svoje amfifilne strukture (detergentom podobne lastnosti) imajo pri višjih koncentracijah nespecifično delovanje na celice. Pri nižjih, klinično pomembnih koncentracijah pa je znano, da se te spojine vključujejo v metabolizem lipidov ter celične signalne poti rakavih celic, delujejo pa tudi na limfocite T in makrofage (10, 11).

APL posredujejo najpomembnejše učinke prek biosinteze fosfolipidov, ki je prikazana na sliki 2. Zaradi svoje amfifilne narave se zlahka vgradijo v celično membrano rakavih celic, v področja lipidnih raftov in nato preidejo v notranjost celice. V nasprotju z večino ostalih celic, v človeških epidermalnih rakavih celicah (KB celice) prehod APL ne poteka prek vgraditve v membrano in endocitoze v celico, ampak s pomočjo od ATP odvisnega prenašalca. Po prehodu v celico v endoplazemskem retikulumu zavirajo delovanje encima CTP:fosfoholin citidiltransferaze (CT). Zaradi inhibicije je v nadaljevanju omejena biosinteza fosfatidilholina (PC), ki je glavni membranski lipid in hkrati tudi prekurzor sekundarnih prenašalcev (DAG, PA), sfingomielina (SM) ter gradnik membranskih domen. Razmerje sfingomielin/holesterol se tako poruši, kar pa vodi v zmanjšanje integritete membrane (10, 13, 14).

Vpliv APL na celične signalne poti se kaže tudi v zaviranju proliferativne MAPK/ERK poti, zaviranju PI3K/PKB/Akt antiapoptotične poti ter stimulaciji proapoptotične SAPK/JNK poti (slika 2). Kljub temu, da APL zavrejo biosintezo PC, hkrati tudi preprečijo njegovo fosforilacijo do fosfatidne kisline (PA) s tem ko inhibirajo fosfolipazo D (PLD). APL pa inhibirajo tudi fosfolipazo C (PLC), posledica inhibicije teh dveh encimov pa je preprečena sinteza DAG in PA, ki sta sekundarna prenašalca v MAPK/ERK signalni poti. Učinek zaviranja PLC in PLD pa se kaže tudi na PKB/Akt antiapoptotični poti.

Poleg tega imajo APL tudi sposobnost, da neposredno vplivajo na PKB/Akt signalno pot, s tem ko zavrejo encima PI3K in PKB/Akt. Delovanje APL na SAPK/JNK proapoptozno pot je posredovano preko že prej omenjenega opisa zaviranja biosinteze PC. Ceramid je prekurzor sfingomielina in s tem ko le-ta zaradi inhibiranega encima ne more nastajati, se v celici kopiči ceramid. Ta stimulira SAPK/JNK pot in s tem inducira apoptozo celice. Poleg ceramida to pot stimulirajo tudi vnetni citokini (TNF α , IL-1), Fas/CD95 in zunanji

dejavniki kot so UV, toplota, reaktivne kisikove zvrsti (ROS) in ionizirajoča sevanja (5, 10, 12, 15, 16).

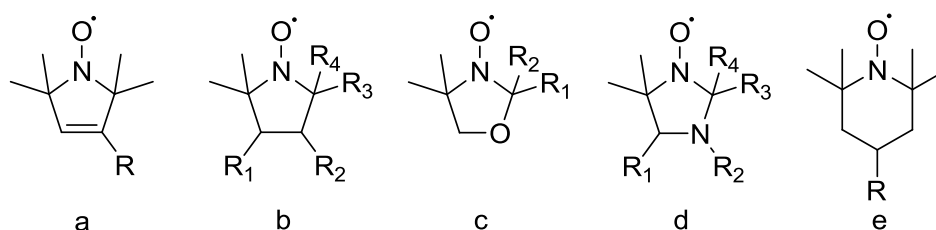


Slika 2: Tarče APL v metabolizmu lipidov in celični signalizaciji (10)

Poleg omenjenih učinkov na celične signalne poti, APL stimulirajo makrofage in limfocite T, da začnejo v večji meri sintetizirati in sproščati kemokine GM-SCF, IF gama in dušikov oksid. Ta učinek je celo večji, če se jih uporabi v obliki liposomov. Žal pa je njihov imunostimulatorni potencial nizek, saj se pri tem ne sprosti zadostna količina kemokinov, ki bi preprečila proliferacijo tumorskih celic (11).

1.4. ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANČNA SPEKTROSKOPIJA

Elektronska paramagnetna resonančna (EPR) spektroskopija je pomembna metoda za spremljanje biofizikalnih lastnosti plazemskih membran, njihovih interakcij s spinsko označenimi spojinami ter dinamike teh spojin v membranah. Z elektromagnetnim valovanjem v območju mikrovalov v zunanjem magnetnem polju povzročimo prehode med energijskimi nivoji elektronskih spinov v molekulah z nesparjenimi elektroni, prehode pa potem detektiramo z EPR. Najpogosteje uporabljeni spinski označevalci v EPR spektroskopiji so stabilni nitroksidni radikali, ki poleg nitroksida vsebujejo tudi heterociklični obroč (slika 3) (9).



Slika 3: Najpogostejši nitroksidni radikali pirolinskega (a), pirolidinskega (b), oksazolinkega (c), imidazolidinskega (d) in piperidinskega (e) tipa.

Poleg interakcije neveznega elektronskega para z zunanjim magnetnim poljem, se pri nitroksidnih radikalih pojavi tudi interakcija z magnetnim momentom jedra dušikovega atoma z jedrskim spinom $I(^{14}\text{N}) = 1$. To povzroči dodatni hiperfinski razcep, zaradi česar je EPR spekter sestavljen iz značilnih treh absorpcijskih črt. Razdaljo med sosednjima vrhovoma v spektru predstavlja hiperfina sklopitvena konstanta a_{N} in je merilo polarnosti neposredne okolice nitroksidnega radikala. Ker membranski spekter nitroksidnega radikala vsebuje poleg izotropnega tudi anizotropni del, moramo to konstanto izračunati (enačba 1). V membranskem spektru $2A_{\text{max}}$ in $2A_{\text{min}}$ predstavljata maksimalni in minimalni hiperfinski razcep absorpcijskih črt na EPR spektru. Iz podatkov o minimalnem in maksimalnem hiperfinem razcepu pa lahko izračunamo tudi vrednost ureditvenega parametra S_{eff} (enačba 2) (9, 14).

$$a_{\text{N}}' = ((A_{\text{max}} + 2A_{\text{min}}) / 3) \cdot 10^{-4} \text{ T}$$

Enačba 1

$$S_{\text{eff}} = (A_{\text{max}} - A_{\text{min}}) \cdot 0,5407 / ((A_{\text{max}} + 2A_{\text{min}}) / 3)$$

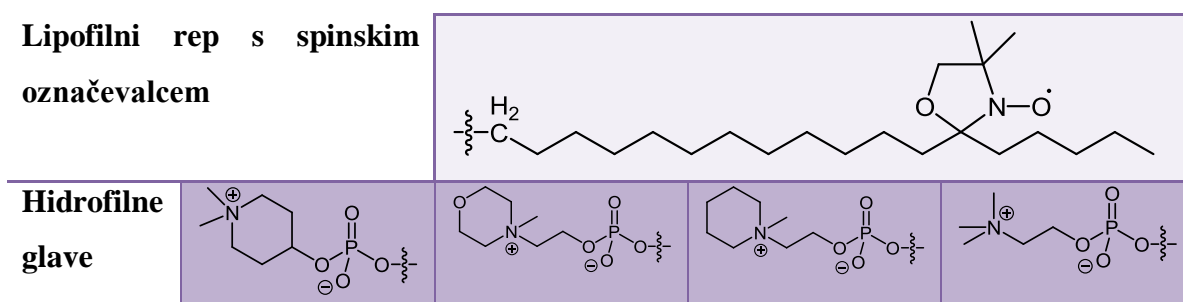
Enačba 2

2. NAČRT ZA DELO

Študije citotoksičnega delovanja spinsko označenih alkilfosfolipidov (SI-APL) so pokazale, da imajo spojine, kjer se doksilna skupina nahaja na koncu lipofine verige, primerljivo biološko delovanje kot neoznačene učinkovine. V predhodnih študijah so odkrili, da je SI-APL z doksilno skupino na 14. C atomu alkilne verige celo aktivnejši na rakavi celični liniji MCF-7 kakor neoznačen analog perifosin in kljub temu izraža zanemarljivo hemolitično aktivnost. Na podlagi teh raziskav smo se odločili, da bomo pripravili takšne SI-APL, ki bodo imeli na 13. C atomu alkilne verige pripet oksazolidinski nitroksidni radikal, medtem ko bodo polarne glave molekul različne (17).

Namen našega dela je priprava analogov SI-APL z doksilno skupino na 13. C atomu alkilne verige ter različnimi polarnimi glavami. Kot osnovna APL nam bosta služila miltefosin in perifosin. Sintetizirane spinske označevalce bomo okarakterizirali z določitvijo R_f v primerni mobilni fazi ter merjenjem IR in masnih spektrov. Vmesnim produktom, brez nitroksidnega radikala bomo poleg omenjenih analiz posneli še $^1\text{H-NMR}$ in $^{13}\text{C-NMR}$ spektre. Spojinam z doksilno skupino bomo posneli tudi EPR spektre, iz česar bomo lahko sklepali o polarnosti neposredne okolice nitroksidnega radikala in o vgrajevanju spojin v lipidni dvosloj.

Preglednica I: Strukturne formule fragmentov načrtovanih končnih spojin



Paramagnetnim spojinam ne bomo posneli NMR spektrov, ker paramagnetni centri širijo črte v NMR spektru. Da bi tem spojinam kljub temu lahko določili strukturo z NMR, bomo v nadaljevanju nitrokside prek reakcije metiliranja pretvorili v produkte, ki ne bodo vsebovali nesparjenih elektronov. Takšnim spojinam bomo nato pomerili NMR spektre, ki nam bodo služili za potrditev strukture predhodnega nitroksida. Spojine bomo poleg $^1\text{H-}$

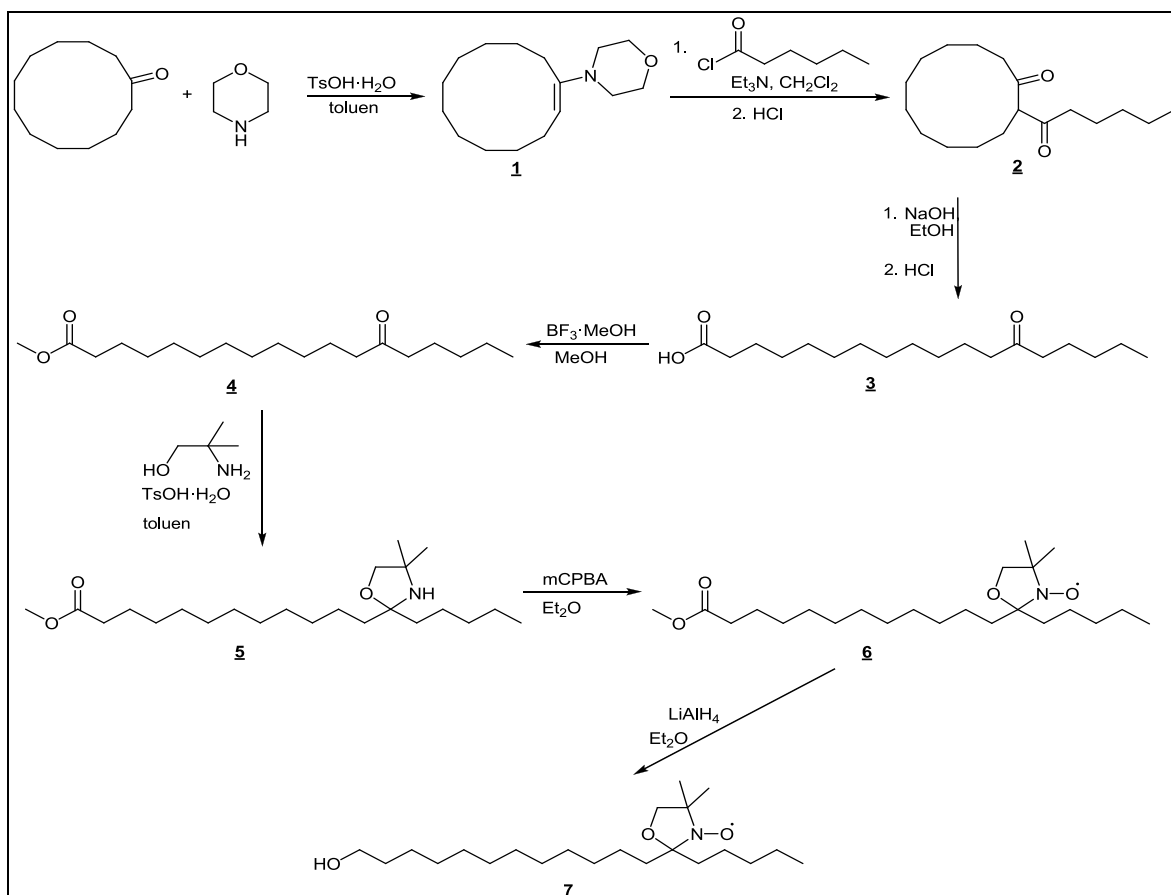
NMR in ^{13}C -NMR okarakterizirali še z meritvijo IR in masnih spektrov ter določitvijo temperature tališča in R_f v primerni mobilni fazi.

Delo bo potekalo po naslednjem sinteznem načrtu (reakcijske sheme 1-4):

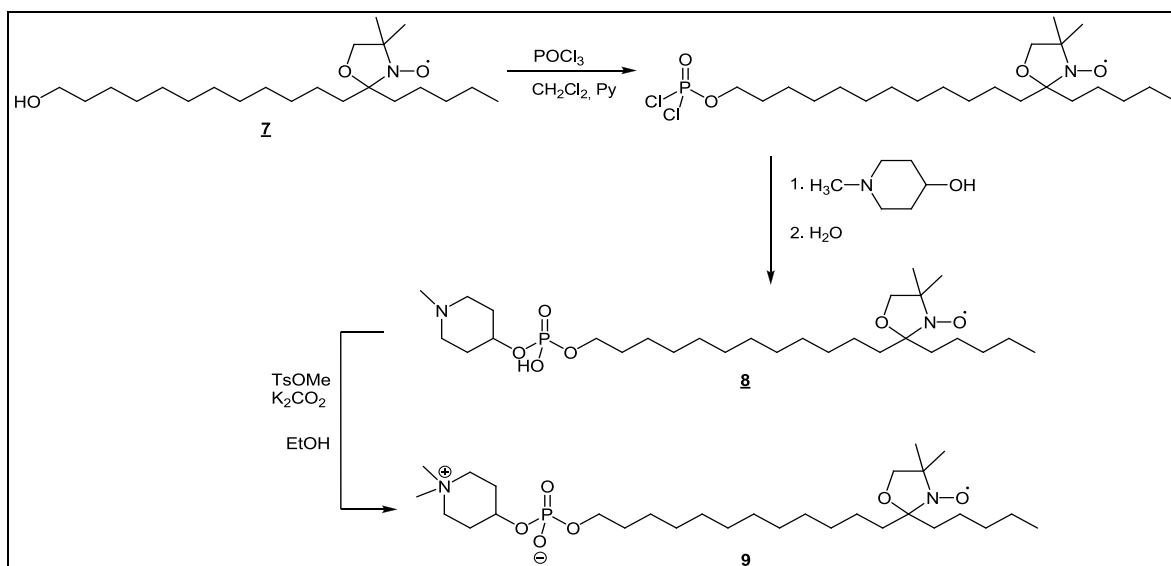
1. V prvi stopnji bomo izvedli kondenzacijo med ciklododekanonom in morfolinom, pri čemer bo nastal enamin **1** iz katerega bomo pripravili 2-heksanoilciklododekanon (**2**) tako, da bomo izvedli reakcijo acetiliranja s heksanoil kloridom. Na sintetiziranem diketonu bomo izvedli alkalno hidrolizo do 13-oksooktadekanojske kisline (**3**). Iz te ketokisline bomo nato z uporabo BF_3 -metanolnega kompleksa pripravili metilni ester **4**. Sledila bo sinteza 1,3-oksazolidinskega fragmenta (**5**) z uvedbo 2-amino-2-metilpropanola na karbonilno skupino ketoestra. Amino skupino bomo oksidirali do nitroksida **6**, nato pa estrsko skupino reducirali do alkohola **7**, ki bo služil kot izhodna spojina za nadaljnje reakcije.
2. Na pripravljen alkohol **7** bomo preko fosfata pripeli 4-hidroksi-*N*-metilpiperidin (do spojine **8**). Sledilo bo metiliranje terciarnega amina do notranje soli **9**.
3. Na primarno alkoholno skupino spojine **7** bomo uvedli 2-okso-1,3,2-dioksafosfolan, in tako dobili ciklični triester fosforjeve(V) kisline (**10**, **13**, **16**). Temu bo takoj sledilo odpiranje dioksafosfolanskega obroča s pripenjanjem morfolina (do spojine **11**), piperidina (do spojine **14**) ali trimetilamina (do spojine **17**). Na spojinah **11** in **14** bomo na koncu izvedli metiliranje terciarnega amina do kvarterne amonijeve soli (**12**, **15**).
4. Z namenom preizkusa reakcije metiliranja nitroksidnega radikala, bomo le-to najprej preizkusili na modelni spojin. Radikalska reakcija metiliranja bo potekala z H_2O_2 , ob prisotnosti katalizatorja $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ter DMSO kot topila in reagenta, pri čemer bomo dobili diamagnetni produkt (**18**).
5. Metiliranje nitroksidov bomo preizkusili na spojinah, ki v svoji strukturi vsebujejo alkilno verigo dolgo 18 ogljikovih atomov ter oksazolidinski tip nitroksidnega radikala. Reakcija bo potekala po istem principu kot je opisano v točki 4. do neradikalnih spojin (**19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**), ki jim bomo lahko posneli ^1H -NMR in ^{13}C -NMR spektre.

2.1. REAKCIJSKE SCHEME

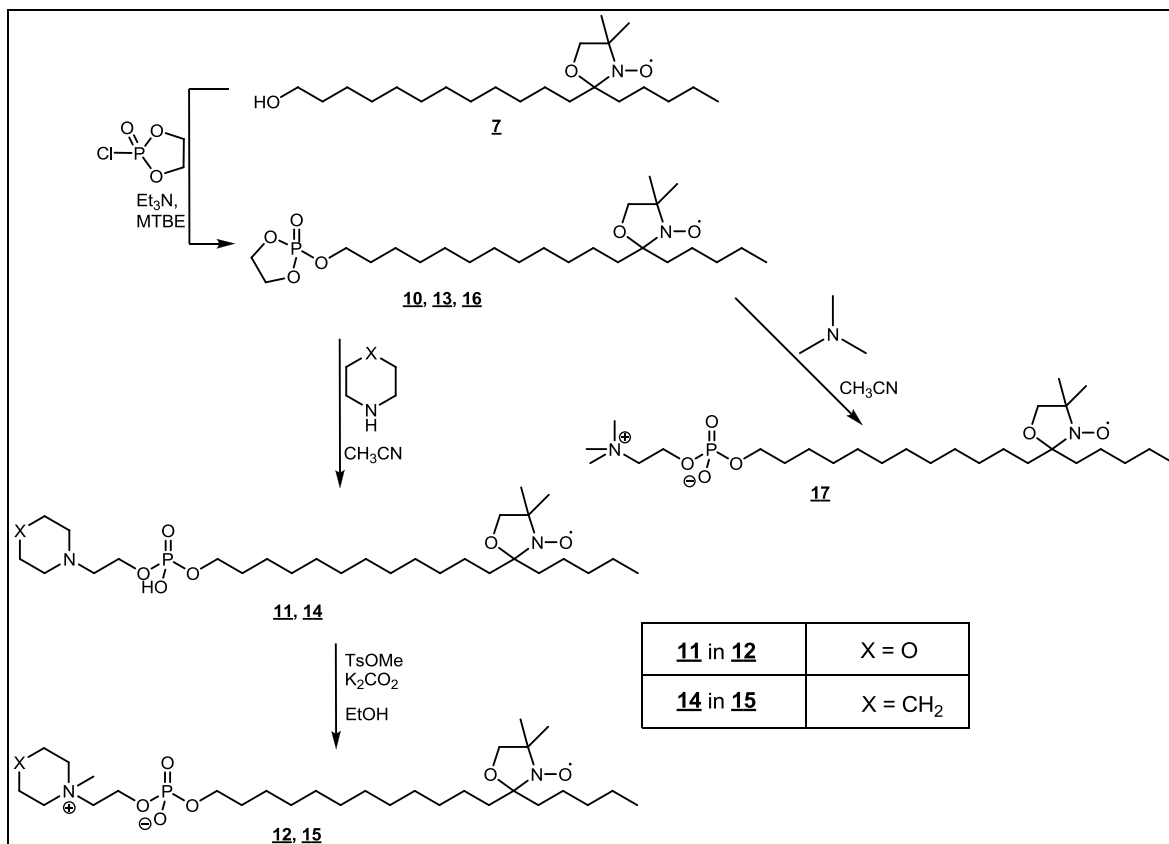
Shema 1: Sinteza 2-(12-hidroksidodecil)-4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidina (7)



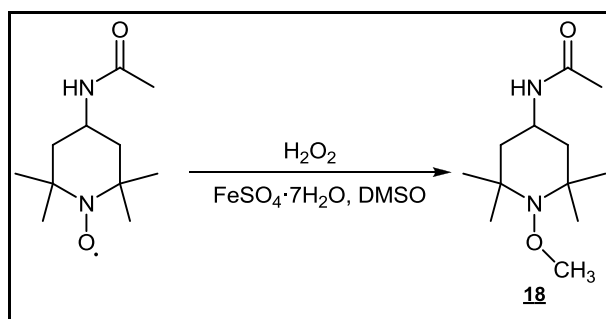
Shema 2: Sinteza 4-[[[12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil]oksi}(oksi)fosforil]oksi-1,1-dimetilpiperidinijeve notranje soli (9)



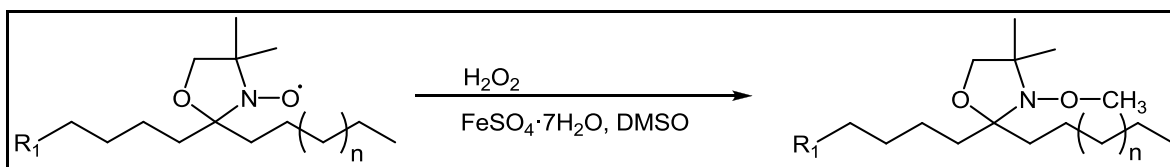
Shema 3: Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil (2-(4-metilmorfolin-4-ijev)etil) fosfat notranje soli (**12**), 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-(1-metilpiperidinijev-1-il)etil fosfat notranje soli (**15**) in 4-[[[12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil]oksi}(oksi)fosforil]oksi]-N,N,N-trimetil-1-etanamonjeve notranje soli (**17**)



Shema 4: Sinteza N-(2,2,6,6-tetrametil-1-metoksipiperidin-4-il)acetamida (**18**)



Shema 5: Sinteza *N*-(2-hidroksi-1,1-dimetil-12-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanamida (**19**), *N*-(2-hidroksi-1,1-dimetil-6-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidin-2-il)heksanamida (**20**), metil 12-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanoata (**21**), 2-(12-hidroksidodecil)-4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidina (**22**), 2-(6-hidroksiheksil)-4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidina (**23**) in 4-[[[6-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidin-2-il)heksil]oksi}(oksi)fosforil]oksi}-1,1-dimetilpiperidinijeve notranje soli (**24**)



Preglednica II: Strukturni fragmenti spojin **19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**

Spojine:	R ₁ :	n:
19		1
20		7
21		1
22		1
23		7
24		7

3. MATERIALI IN METODE

REAGENTI IN TOPILA

Pri sintezi spojin v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros, Sigma, Fluka, Apollo Scientific in Merck, brez predhodne obdelave. Brezvodni CH_2Cl_2 smo pripravili tik pred uporabo topila z destilacijo ob prisotnosti CaH_2 v argonovi atmosferi. Za pripravo liposomov in snemanje EPR spektrov smo prav tako uporabili topila omenjenih proizvajalcev, trajno mleko z 1,6 % mlečne maščobe, proizvajalca Mercator (Ljubljanske mlekarne d.d.) ter hidrogeniran sojin lecitin (Emulmetic® 320) iz Lucas Mayer (Hamburg, Nemčija).

KROMATOGRFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija

S TLC smo spremljali potek kemijskih reakcij, izolacije ter čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili plošče TLC Silica gel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijskem nosilcu. Mobilne faze so bile različne in so navedene v poglavju 4. pri sintezi posamezne spojine. Detekcija spojin na TLC ploščicah je potekala pod UV svetlobo ($\lambda = 254 \text{ nm}$ in $\lambda = 366 \text{ nm}$), poleg tega pa smo uporabljali tudi različne orositvene reagente (bromkrezolno zeleno, fosfomolibdenova kislina, ninhidrin, FeCl_3 , rodamin 6G, 2,4-dinitrofenilhidrazin), ki so bili pripravljani po standardnem postopku.

Kolonska kromatografija

Produkte spojin smo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo, kjer smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04–0,063 mm proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so navedene v poglavju 4 pri sintezi posamezne spojine.

SPEKTROSKOPSKE METODE

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre smo posneli na NMR spektrofotometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani ali na Bruker Avance DPX₃₀₀ spektrometru pri 300,15 MHz v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na

Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo posneli v devteriranih topilih CDCl_3 ali $\text{DMSO-}d_6$ z dodanim TMS kot internim standardom pri 302 K. Spektre smo procesirali z računalniškim programom NMRnotebook Version 2.70 build 0.9 proizvajalca NMRtec.

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)

EPR spektre smo posneli na spektrofotometru MiniScope MS400 na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Meritve so bile opravljene pri frekvenci mikrovalov 9,3-9,55 GHz, atenuaciji mikrovalov 10 dB, modulacijski frekvenci 100 kHz in modulacijski amplitudi 1000 mG. Časovni obseg meritve je bil 60 s/posnetek, vsak spekter pa smo trikrat sešteli ter tako izboljšali razmerje med signalom in šumom. Priprava vzorcev za snemanje EPR spektrov je opisana v poglavju 4.

Infrardeča spektroskopija

IR spektre v obliki tablet s KBr ali med ploščicami NaCl smo posneli na spektrometru Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Masna spektrometrija

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q proizvajalca Micromass (Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

DOLOČEVANJE TALIŠČ

Spojnam, ki so bile pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, smo določili temperaturo tališča s pomočjo Kofflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Tališča niso korigirana.

NOMENKLATURA, RISANJE SPOJIN IN MOLEKULSKO MODELIRANJE

Za risanje strukturnih formul spojin, reakcij ter poimenovanje po IUPAC nomenklaturi smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 ter ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft. Za simulacijo molekulske dinamike SI-APL smo uporabili program Chem3D Pro, proizvajalca CambridgeSoft. V programu smo minimizirali

potencialno energijo strukturnih formul SI-APL v vakuumu, nato pa izmerili razdalje med posameznimi deli teh molekul.

REAKCIJE V BREZVODNIH POGOJIH

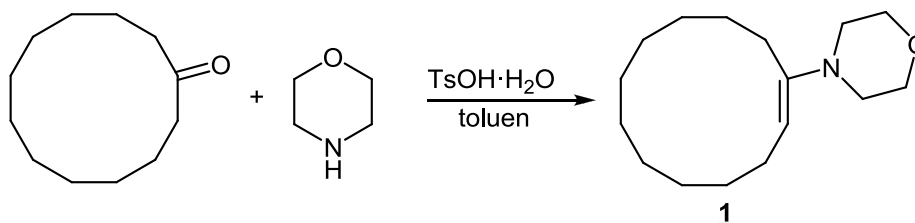
Pri sintezi nekaterih spojin smo izvajali reakcije v brezvodnih pogojih. To pomeni, da smo predhodno vso steklovino, brizge, igle, magnetke in septume sprali z acetonom ter sušili v sušilniku pri 50 °C 60 minut. Bučke in kapalnike smo nato prepihali z argonom, samo reakcijo pa prav tako izvajali v argonovi atmosferi, ki smo jo zagotovili z uporabo septumov in balonov z argonom.

4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

4.1. SINTEZA SPINSKO OZNAČENIH ALKILFOSFOLIPIDOV

4.1.1. Sinteza (*E*)-4-ciklododecenilmorfolina (**1**)

REAKCIJA:

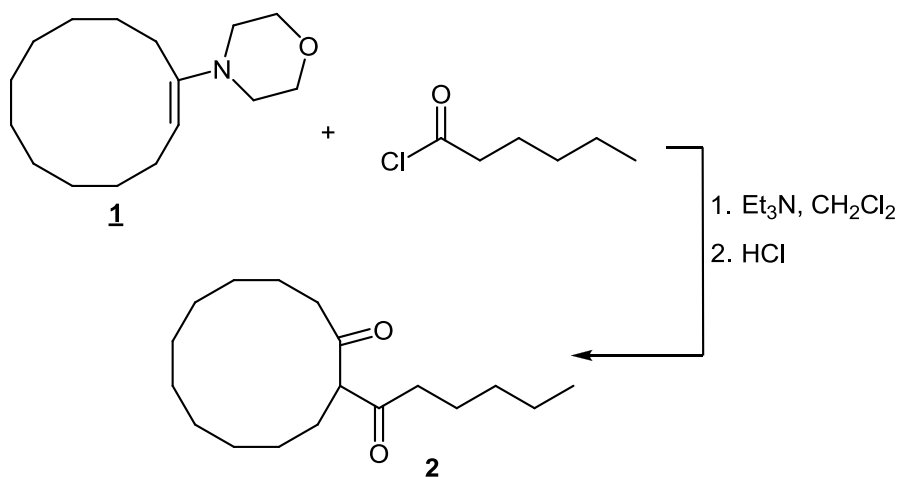


POSTOPEK:

Ciklododekanon (50 g, 274,3 mmol, 1 mol. ekv.) smo raztopili v toluenu (130 mL) ter dodali morfolin (47 g, 539,5 mmol, 2,0 mol. ekv.) in TsOH·H₂O (4,1 g, 21,6 mmol, 0,08 mol. ekv.). Bučko smo opremili z Dean-Starkovo pastjo, povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter tako odstranjevali vodo, ki je nastajala tekom destilacije, ki smo jo izvajali 1 teden pri 155 °C. Reakcijsko zmes smo nato ohladili na 0 °C, sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (3 × 400 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (1 × 400 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄ in zmes filtrirali. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, zaostanek pa smo vakuumsko destilirali pri temperaturi 110 – 120 °C (37,88 g, 55 %). Spojino smo takoj uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

4.1.2. Sinteza 2-heksanoilciklododekanona (**2**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

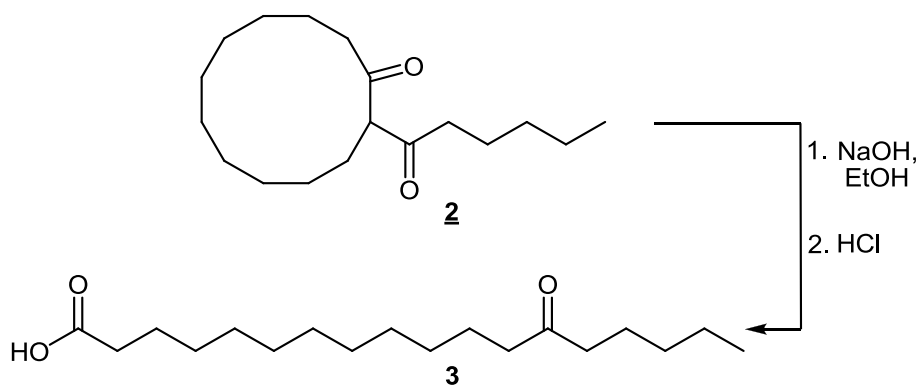
Spojino **1** (37,88 g; 150,75 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v CH₂Cl₂ (140 mL) in Et₃N (18,30 g, 180,90 mmol, 25 mL, 1,2 mol. ekv.), ohladili na 0 °C ter med mešanjem dodajali po kapljicah s pomočjo kapalnika raztopino heksanoil klorida (20,29 g, 150,75 mmol, 21,36 mL, 1,0 mol. ekv.) v brezvodnem CH₂Cl₂ (130 mL) tekom dveh ur. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi še 20 ur, nato dodali vodno raztopino HCl (2,5 M; 115 mL) in mešali pri sobni temperaturi še 2 dni. Po koncu mešanja smo organsko fazo ločili od vodne, jo sprali s prečiščeno vodo (4 × 200 mL) in nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (1 × 200 mL), sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Zaostalo rumeno-oranžno olje smo sušili z membransko črpalko (44,49 g, 100 %). Spojina **2** je bila dovolj čista, da smo jo lahko uporabili kot izhodno spojino pri nadaljnji sintezi.

REZULTATI ANALIZ:

 2	Izgled: rumeno-oranžno olje Izkoristek: 100 % R_f (petroleter/EtOAc = 20/1) = 0,36
¹H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ [ppm] = 0,89 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, -CH ₃), 1,15-1,38 (m, 18H, 9 × -CH ₂ -), 1,57-1,72 (m, 4H, -CO-CH ₂ -CH ₂ - in -CO ^{ciklo} -CH ₂ -CH ₂ -), 1,78-1,86 (q, 2H, <i>J</i> = 6,8 Hz, -CO ^{ciklo} -CH-(CO)-CH ₂), 2,38-2,49 (m, 4H, -CO-CH ₂ -CH ₂ - in -CO ^{ciklo} -CH ₂ -CH ₂ -), 3,62 (t, 1H, <i>J</i> = 7,2 Hz, -CO ^{ciklo} -CH ₂ -(CO)-CH ₂ -)

4.1.3. Sinteza 13-oksooktadekanojske kisline (**3**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Diketon **2** (44,00 g, 156,96 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v EtOH (96 %, 130 mL) ter segreli na 100 °C. K tej raztopini smo dolili vrelo raztopino NaOH (18,83 g, 470,63 mmol, 3,0 mol. ekv.) v EtOH (96 %, 250 mL). Reakcija umiljenja (saponifikacije) je potekla v eni minuti. Reakcijsko zmes smo ohladili na 0 °C ter suspendirali v Et₂O (250 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 20 ur, nato pa nastalo oborino odfiltrirali s presesavanjem skozi Büchnerjev lij in sprali z nekaj mL Et₂O. Oborini smo dodali vrelo prečiščeno vodo (600 mL), pri čemer se je skoraj vsa raztopila. Nato smo jo ohladili na 0 °C in nakisali z vodno raztopino HCl (37 %, 39 mL). Produkt smo ekstrahirali s segretim CH₂Cl₂ (6 × 300 mL) ter združenim organskim fazam odparili topilo pod znižanim tlakom. Bel zaostanek smo 24 ur sušili na membranski črpalki, dokler nismo dobili belih kristalov spojine **3** (37,853 g, 81 %).

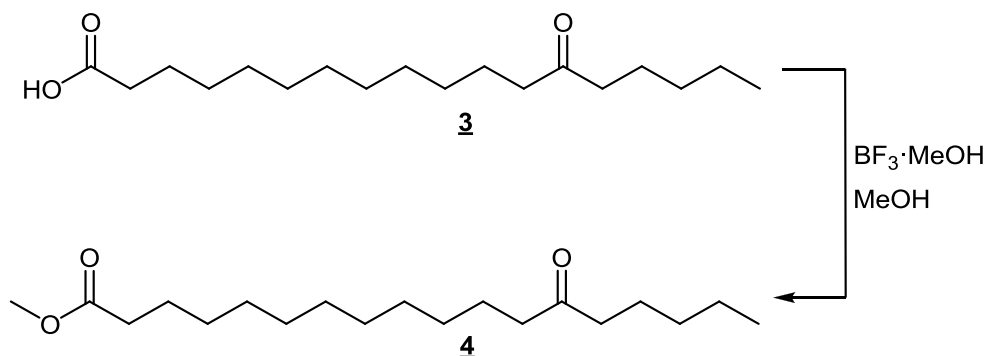
REZULTATI ANALIZ:

	Izgled: bel prah Izkoristek: 81 % R_f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 10/1) = 0,46 Tališče: 82-83 °C
¹H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, <i>J</i> = 6,89 Hz, -CH ₃), 1,25-1,37 (m, 18H, 9 × -CH ₂ -), 1,56-1,67 (m, 6H, HOOC-CH ₂ -CH ₂ -, -CH ₂ - in CH ₂ -CO-CH ₂ -CH ₂ -), 2,34-2,42 (m, 6H, HOOC-CH ₂ - in -CH ₂ -CO-CH ₂ -)

¹³C-NMR (CDCl ₃ , 100 MHz)	δ [ppm] = 13,95 (-CH ₂ -CH ₃), 22,51 (-CH ₂ -CH ₃), 23,56 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 23,82 (2 × -CH ₂ -CH ₂ -CO), 24,83 (-CH ₂ -CH ₂ -COOH), 29,18 (6 × -CH ₂ -), 31,59 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 34,24 (-CH ₂ -COOH), 42,93 (2 × -CH ₂ -CO-), 180,21 (-COOH), 212,22 (-CO-)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2916, 2849, 1670, 1471, 1420, 1380, 1318, 1290, 1266, 1235, 1214, 1128, 1036, 990, 969, 879, 720	
MS (ESI+)	m/z = 297 [M-H] ⁻	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₃₃ O ₃ [M-H] ⁻	297,2430
	Izmerjena vrednost	297,2425

4.1.4. Sinteza metil 13-oksooktadekanoata (**4**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

Ketokislini **3** (20,0 g, 67,02 mmol) smo previdno dodali BF₃·MeOH (12 %, 108,8 mL) ter mešali pri temperaturi refluxa (60 °C) 30 minut. Zmes smo nato ohlajali na ledeni kopeli, dokler se ni strdila, potem pa jo raztopili v EtOAc (100 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 150 mL), sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom, pri čemer je izpadel svetlo rjav produkt (20,1 g, 96 %).

REZULTATI ANALIZ:

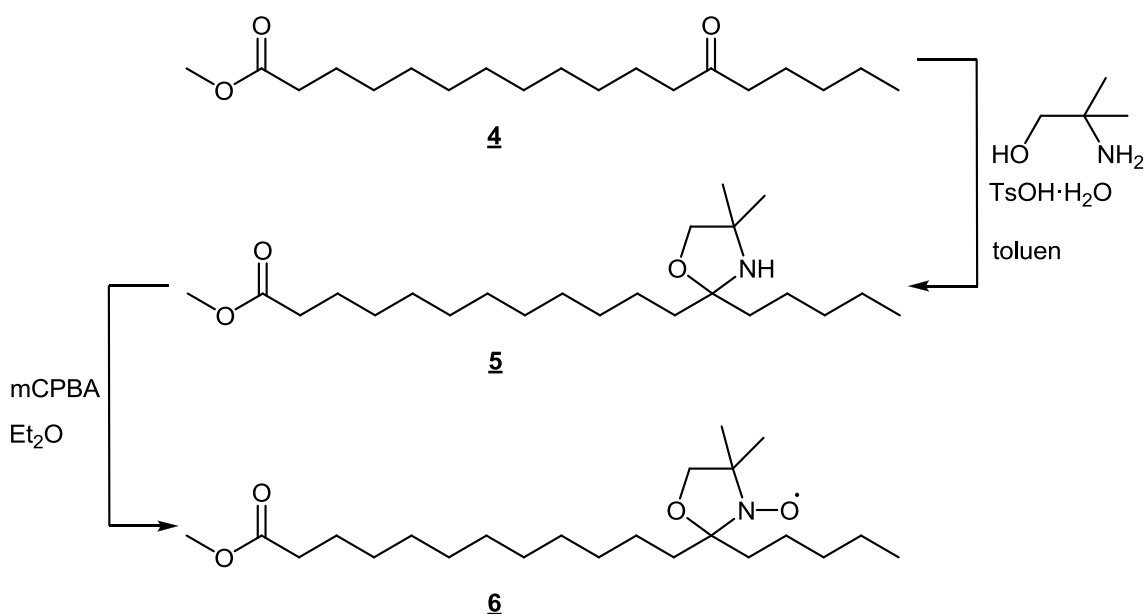
	Izgled: svetlo rjava oborina Izkoristek: 96 % R_f (Et ₂ O/petroleter = 3/1) = 0,68 Tališče: 45-46 °C
--	--

¹H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, <i>J</i> = 6,84 Hz, -CH ₂ -CH ₃), 1,25-1,34 (m, 18H, 9 × -CH ₂ -), 1,53-1,66 (m, 6H, -CH ₂ -CH ₂ -CO-CH ₂ -CH ₂ - in -CH ₂ -CH ₂ -COOCH ₃), 2,32 (t, 2H, <i>J</i> = 7,5 Hz, -CH ₂ -COOCH ₃), 2,40 (t, 4H, <i>J</i> = 7,40 Hz, CH ₂ -CO-CH ₂ -), 3,68 (s, 3H, O-CH ₃)	
¹³C-NMR (CDCl ₃ , 100 MHz)	δ [ppm] = 13,96 (-CH ₂ -CH ₃), 22,50 (-CH ₂ -CH ₃), 23,60 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 23,90 (-CH ₂ -CH ₂ -CO), 24,97 (-CH ₂ -CH ₂ -COOCH ₃), 29,16 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CO-), 29,27 (2 × -CH ₂ -), 29,53 (3 × -CH ₂ -), 31,47 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 34,13 (-CH ₂ -COOCH ₃), 42,83 (2 × -CH ₂ -CO-), 51,47 (-COOCH ₃), 174,37 (-COOCH ₃) 211,80 (-CO-)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3401, 2918, 2850, 2361, 1739, 1710, 1472, 1438, 1418, 1381, 1322, 1288, 1260, 1229, 1204, 1178, 1127, 1038, 981, 887, 862, 729	
MS (ESI+)	<i>m/z</i> = 313 [MH] ⁺ , 335 [MNa] ⁺ , 351[MK] ⁺	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₁₉ H ₃₇ O ₃ [MH] ⁺	313,2743
	Izmerjena vrednost	313,2746

4.1.5. Sinteza metil 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanoata

(6)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

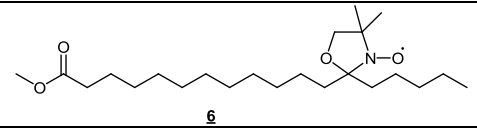
Ketoester **4** (20,1 g, 64,3 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v toluenu (335 mL) in dodali 2-amino-2-metilpropan-1-ol (67 mL, 702,0 mmol, 10,9 mol. ekv.) in TsOH·H₂O (67 mg,

0,35 mmol, 0,005 mol. ekv.). Bučko smo opremili z Dean-Starkovo pastjo, povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko tako, da smo lahko sprti odstranjevali vodo, ki je nastajala tekom reakcije. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi refluxa (146 °C) 1 teden. Zmes smo nato ohladili na 0 °C, prenesli v lij ločnik ter ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (5 × 200 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (1 × 200 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali ter topilo uparili pod znižanim tlakom. Zaostali produkt smo takoj uporabili v naslednji reakcijski stopnji.

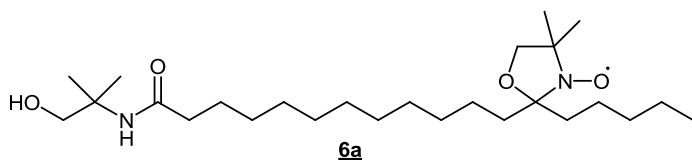
Spojino **5** (23,352 g nečistega produkta, 60,9 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v Et₂O (200 mL) ter med mešanjem pri 0 °C počasi po kapljicah s pomočjo kapalnika dodajali mCPBA (17,153 g, 77 %, 99,4 mmol, 1,6 mol. ekv.) v Et₂O (350 mL), dokler nismo opazili prehoda barve raztopine iz rumene v rahlo zeleno. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na ledeni kopeli, nato pa jo prelili v lij ločnik, sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (10 × 200 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaCl (1 × 200 mL). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali ter topilo uparili pod znižanim tlakom. Pri reakciji je poleg glavnega produkta **6** (MeFASL (4, 11)) nastal še stranski produkt **6a** (AFASL (4, 11)), hkrati pa je bilo prisotne še tudi nekaj izhodne spojine **5**, zato smo zmes čistili s pomočjo kolonske kromatografije z gradientom mobilnih faz (Et₂O:petroleter = 1:3 → Et₂O:petroleter = 1:1 → Et₂O), tako da smo kot glavni produkt dobili rumenkasto olje (4,37 g; 18 %).

REZULTATI ANALIZ:

Glavni produkt:

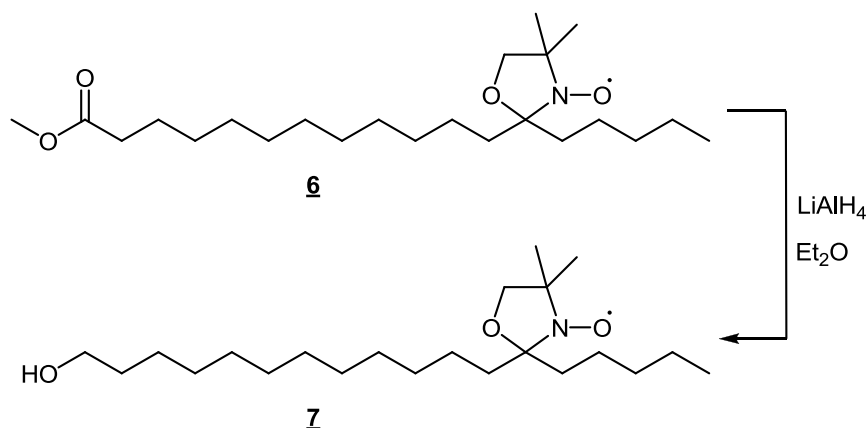
		Izgled: rumeno olje Izkoristek: 18 % R_f (Et ₂ O/petroleter = 1/3) = 0,33	
IR (NaCl)	v [cm ⁻¹] = 3444, 2923, 2855, 1738, 1463, 1363, 1249, 1173, 1034, 946, 838, 725		
MS (ESI+)	<i>m/z</i> = 400 [M+2] ⁺		
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₄₆ NO ₄ : [M+2] ⁺	400,3427	
	Izmerjena vrednost	400,3420	

Stranski produkt:



4.1.6. Sinteza 2-(12-hidroksidodecil)-4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidina (7)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

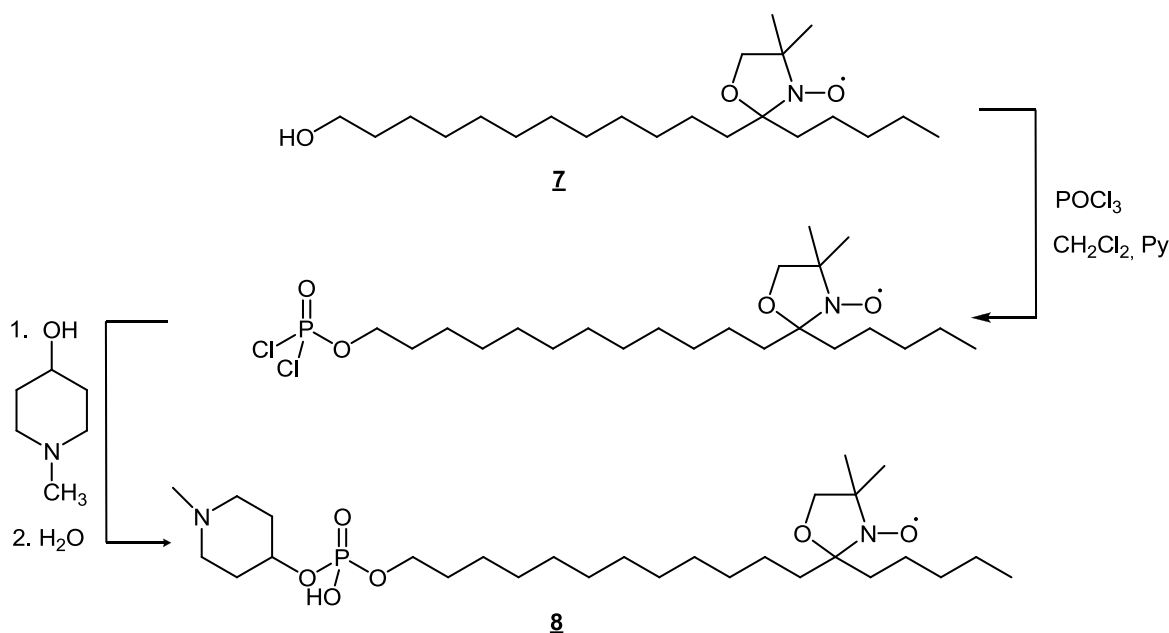
V suspenzijo LiAlH_4 (0,580 g, 15,3 mmol, 1,4 mol. ekv.) v brezvodnem Et_2O (30 mL) smo ob intenzivnem mešanju s pomočjo kapalnika po kapljicah dodali raztopino nitroksida **6** (4,37 g, 11,0 mmol, 1,0 mol. ekv.) v brezvodnem Et_2O (60 mL). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in mešali 4 ure pri sobni temperaturi. Po pretečenem času smo dodali toliko EtOAc , da je reagiral prebitek LiAlH_4 , nato pa smo dodali vodo (1,5 mL). Zmes smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Rumenkast zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc /heksan = 1/2), tako da smo dobili oranžno-rumeno olje (1,982 g; 49 %).

REZULTATI ANALIZ:

 7	Izgled: oranžno-rumeno olje Izkoristek: 49 % R_f (EtOAc /heksan = 1/2) = 0,27
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3436, 2927, 2854, 1734, 1460, 1380, 1363, 1316, 1247, 1185, 1129, 1054, 944, 836, 724
MS (ESI+)	m/z = 372 [$\text{M}+2$] ⁺

4.1.7. Sinteza 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 1-metil-4-piperidinil hidrogen fosfata (**8**)

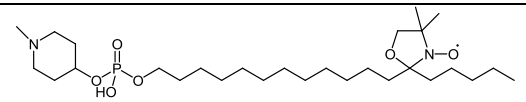
REAKCIJA:



POSTOPEK:

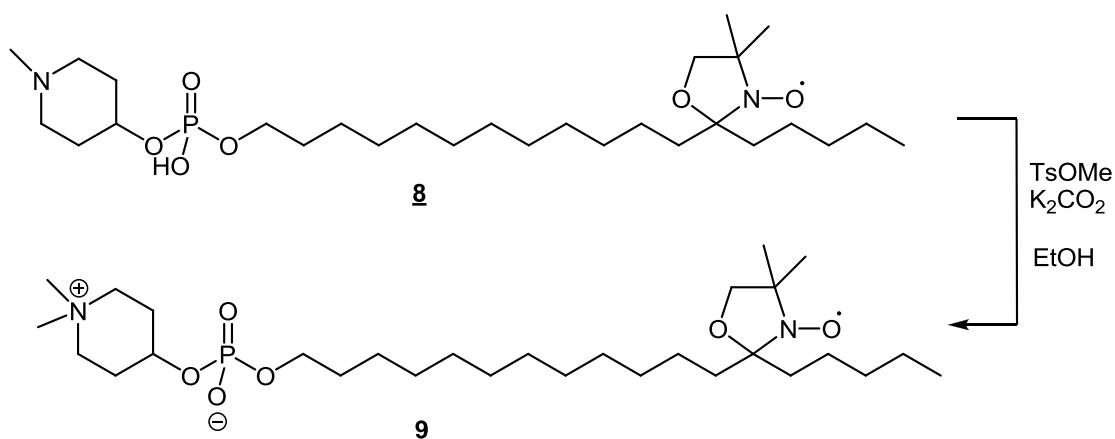
Prvi dve reakcijski stopnji smo izvedli v atmosferi argona (brezvodni pogoji). Nitroksid **7** (500 mg, 1,35 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v brezvodnem CH₂Cl₂ (3 mL) in brezvodnem piridinu (0,34 mL), prenesli v kapalnik ter počasi ob mešanju dodali po kapljicah v raztopino brezvodnega CH₂Cl₂ (0,76 mL) in sveže destiliranega POCl₃ (198 μL, 326 mg, 2,12 mmol, 1,6 mol. ekv.) pri temperaturi med 5 in 10 °C. Reakcijsko zmes smo mešali še 45 minut, nato pa po kapljicah dodali raztopino 4-hidroksi-*N*-metilpiperidina (251 mg, 2,18 mmol, 1,6 mol. ekv.) v piridinu (0,34 mL) ter nadaljevali z mešanjem pri 10 °C. Po treh urah mešanja smo dodali vodo (0,34 mL) ter reakcijsko zmes pustili mešati 16 ur na sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik ter zaporedoma spirali najprej s prečiščeno vodo in MeOH v razmerju 1:1 (4 mL), nato z 10 % raztopino citronske kisline in MeOH v razmerju 1:1 (4 mL) in na koncu še s prečiščeno vodo in MeOH v razmerju 1:1 (4 mL). Organski fazi smo odparili topilo pod znižanim tlakom ter zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂/MeOH/NH_{3(aq)} = 78/30/4,7), pri čemer smo dobili rumenkasto olje (158 mg, 21 %). Produkt **8** je dokaj nestabilna spojina, zato smo jo morali takoj prenesti v naslednjo reakcijsko stopnjo.

REZULTATI ANALIZ:

	Izgled: rumeno olje Izkoristek: 21 % R_f (CHCl ₃ /MeOH/NH _{3(aq)} = 78/30/4,7) = 0,09
---	--

4.1.8. Sinteza 4-[[[12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil]oksi}(oksi)fosforil]oksi-1,1-dimetilpiperidinijeve notranje soli (**9**)

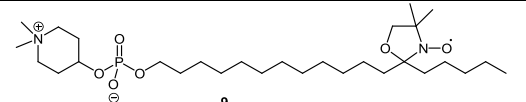
REAKCIJA:



POSTOPEK:

Nitroksid **8** (158 mg, 0,288 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v EtOH (100 %, 6 mL) in med mešanjem pri temperaturi 60 °C izmenično dodajali TsOMe (82 mg, 0,440 mmol, 1,5 mol. ekv.) in K₂CO₃ (44 mg, 0,318 mmol, 1,1 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo nato mešali pri temperaturi 60 °C, dokler s TLC nismo detektirali konca poteka reakcije. K reakcijski zmesi smo dodali EtOH (96 %, 2 mL) filtrirali ter uparili topilo pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: CH₂Cl₂/MeOH/NH_{3(aq)} = 78/30/4,7). Izolirali smo rumeno olje (98 mg, 61 %).

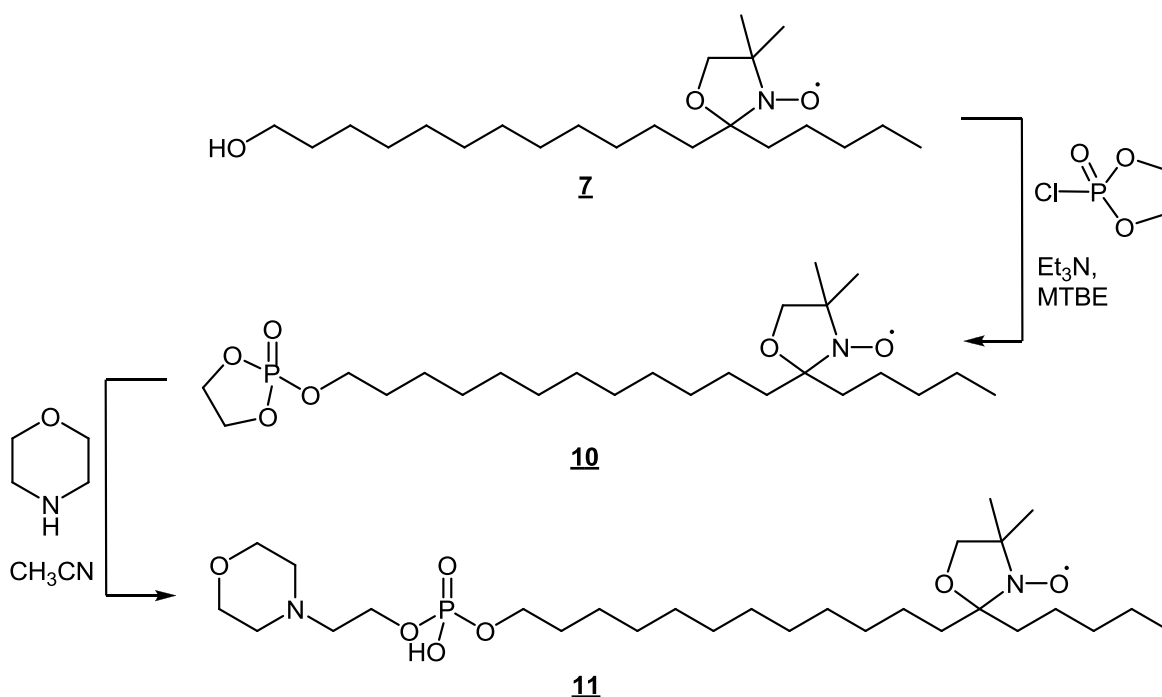
REZULTATI ANALIZ:

	Izgled: rumeno olje Izkoristek: 61 % R_f (CHCl ₃ /MeOH/NH _{3(aq)} = 78/30/4,7) = 0,05
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3054, 2987, 2306, 1421, 1265, 896, 748
MS (ESI+)	m/z = 562 [MH] ⁺

HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₉ H ₅₉ N ₂ O ₆ P ⁺ [MH] ⁺	562,4111
	Izmerjena vrednost	562,4127

4.1.9. Sinteza 12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-morfolinoetil hidrogen fosfata (**11**)

REAKCIJA:



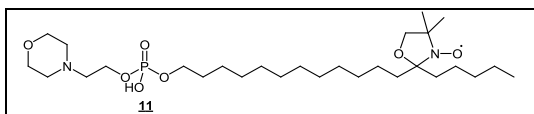
POSTOPEK:

Nitroksid **7** (370 mg; 1,00 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v MTBE (14 mL), dodali Et₃N (0,8 mL) ter med mešanjem pri 0 °C po kapljicah dodali 2-kloro-2-okso-1,3,2-dioksafosfolan (0,46 mL, 5,00 mmol, 5,0 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 15 minut pri 0°C, nato pa še 1,5 ure pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ker je bil produkt reakcije dokaj nestabilen, smo takoj nadaljevali z naslednjo reakcijsko stopnjo.

Nitroksid **10** (590 mg, 1,24 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v acetonitrilu (5 mL), dodali morfolin (0,7 mL, 8,09 mmol, 6,5 mol. ekv.) ter segrevali pri temperaturi refluxa (65 °C) 4 dni. Po končani reakciji smo uparili topilo pri znižanem tlaku ter zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂/MeOH = 10/1 + 0,03 % Et₃N), tako da smo dobili

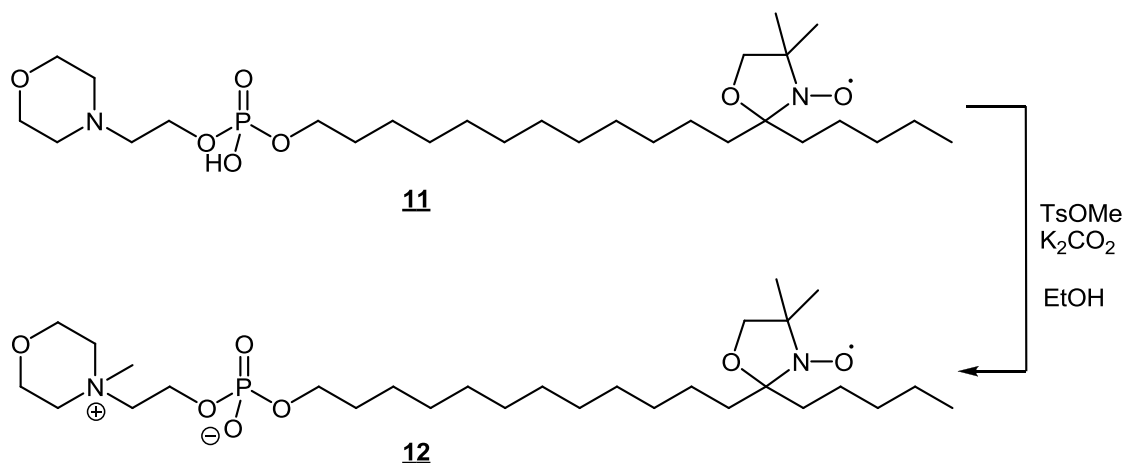
oranžno olje (555 mg, 79 %). Produkt je bil dokaj neobstoje, zato smo ga takoj prenesli v naslednjo stopnjo.

REZULTATI ANALIZ:

	<p>Izgled: oranžno olje Izkoristek: 79 % R_f (CHCl₃/MeOH = 10/1 + 0,03 % Et₃N) = 0,17</p>
---	--

4.1.10. Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil (2-(4-metilmorfolin-4-ijev)etil) fosfat notranje soli (12)

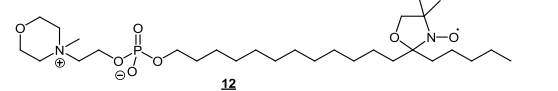
REAKCIJA:



POSTOPEK:

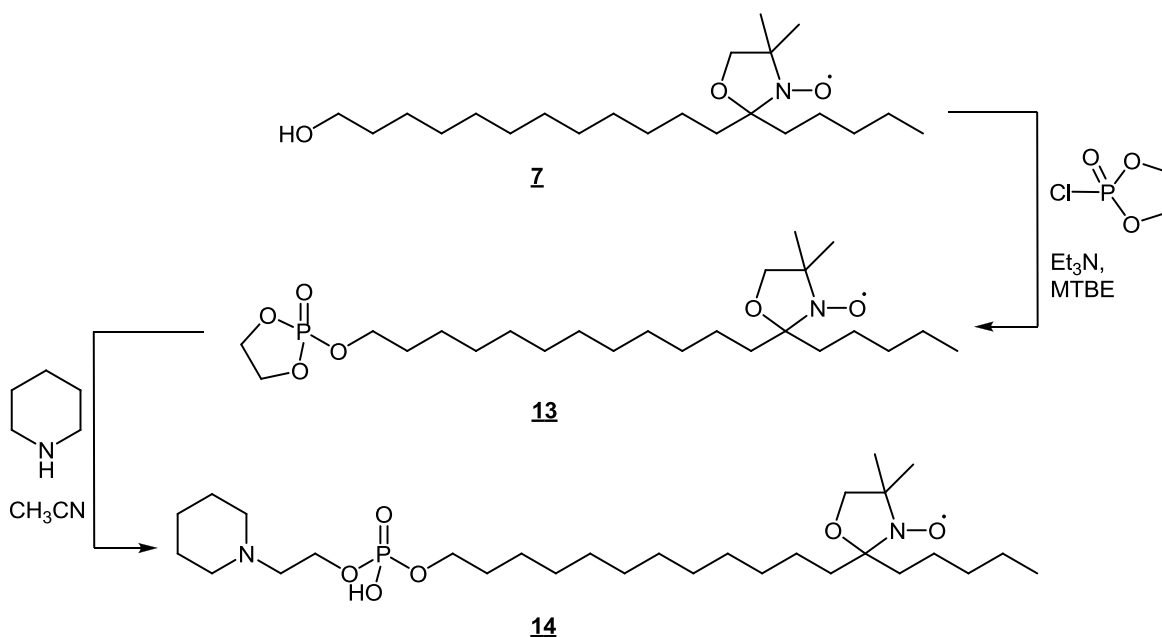
Nitroksid 11 (555 mg, 0,985 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v EtOH (100 %, 4 mL) in ob mešanju pri temperaturi refluxa (100 °C) izmenično dodajali TsOMe (442 mg, 2,37 mmol, 2,4 mol. ekv.) in K₂CO₃ (206 mg, 1,49 mmol, 1,5 mol. ekv.) ter mešali pri temperaturi 100°C še dve uri. Reakcijski zmesi smo nato dodali nekaj mL MeOH, filtrirali ter uparili topilo pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂/MeOH/NH_{3(aq)} = 78/30/4,7). Izolirali smo rumeno olje (137 mg, 24 %).

REZULTATI ANALIZ:

 12	Izgled: rumeno olje Izkoristek: 24 % R_f (CHCl ₃ /MeOH/NH _{3(aq)}) = 78/30/4,7) = 0,04
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3944, 3054, 2987, 2305, 1421, 1265, 1047, 896, 748
MS (ESI+)	m/z = 564 [MH] ⁺ , 562 [MH] ⁻

4.1.11. Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-(piperidin-1-il)etil hidrogen fosfata (14)

REAKCIJA:

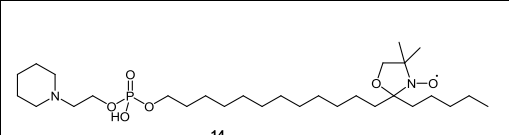


POSTOPEK:

Nitroksid **7** (0,450 g, 1,21 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v MTBE (20 mL), dodali Et₃N (0,9 mL) ter med mešanjem pri 0 °C dodali po kapljicah 2-kloro-2-okso-1,3,2-dioksafosfolan (0,50 mL, 5,44 mmol, 4,5 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 15 minut pri 0 °C, nato pa še 1,5 ure pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ker je bil produkt reakcije dokaj reaktiven, smo takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo.

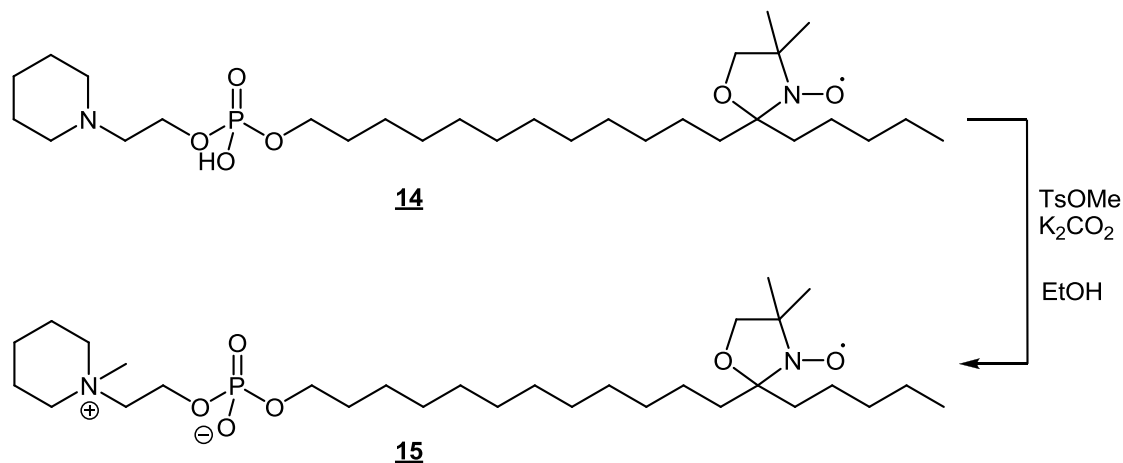
Nitroksid **13** (590 mg, 1,24 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v acetonitrilu (6 mL), dodali piperidin (0,7 mL, 7,09 mmol, 5,7 mol. ekv.) ter segrevali pri temperaturi refluxa (65 °C) 4 dni. Po končani reakciji smo uparili topilo pod znižanim tlakom ter zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂/MeOH = 10/1 + 0,03 % Et₃N), tako da smo dobili oranžno olje (70 mg, 10 %). Produkt je bil dokaj reaktiven, zato smo takoj nadaljevali z naslednjo reakcijsko stopnjo.

REZULTATI ANALIZ:

 <p style="text-align: center;">14</p>	<p>Izgled: oranžno olje Izkoristek: 10 % R_f (CH₂Cl₂/MeOH = 10/1 + 0,03 % Et₃N) = 0,16</p>
--	--

4.1.12. Sinteza 12-(2-pentil-3-oksil-4,4-dimetil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil 2-(1-metilpiperidinijev-1-il)etil fosfat notranje soli (**15**)

REAKCIJA:

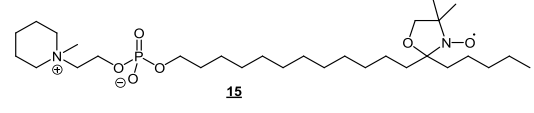


POSTOPEK:

Nitroksid **14** (70 mg, 0,125 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v etanolu (100 %, 2 mL) in ob mešanju pri temperaturi refluxa (100 °C) izmenično dodajali TsOMe (70 mg, 0,376 mmol, 3,0 mol. ekv.) in K₂CO₃ (30 mg, 0,283 mmol, 2,3 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali pri temperaturi 100°C še 2 uri, nato pa dodali nekaj mL MeOH, filtrirali ter uparili

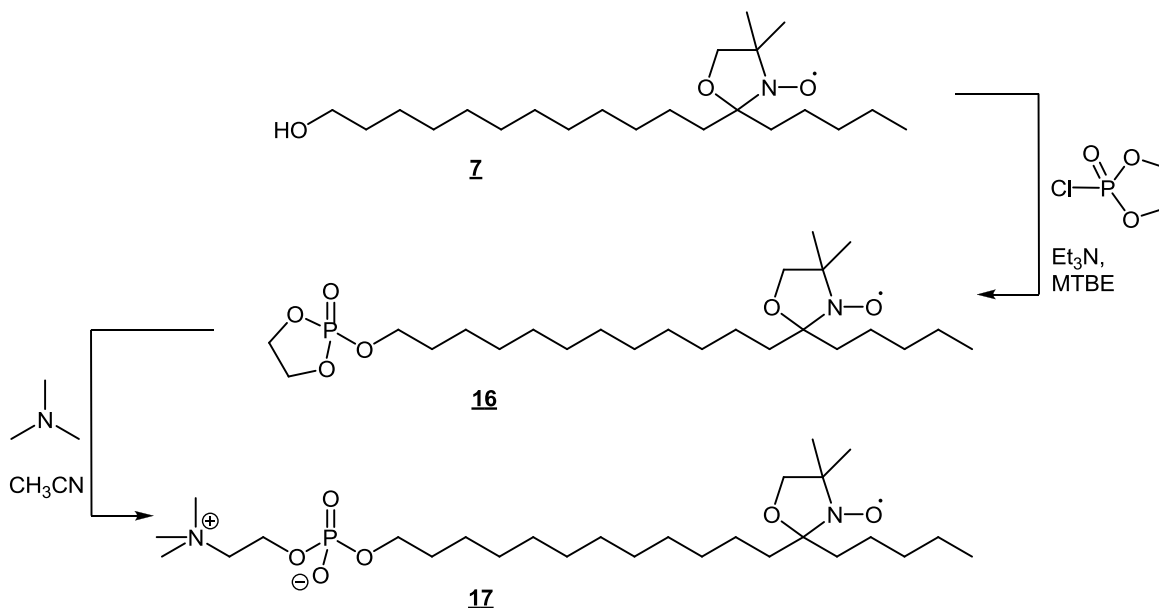
topilo pod znižanim tlakom. Rjavo oborino smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂/MeOH/NH_{3(aq)} = 78/30/4,7). Izolirali smo oranžno olje (60 mg, 83 %).

REZULTATI ANALIZ:

		Izgleed: oranžno olje Izkoristek: 83 % R_f (CHCl ₃ /MeOH/NH _{3(aq)} = 78/30/4,7) = 0,10	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3945, 3691, 3054, 2987, 2856, 2686, 2411, 2306, 1422, 1266, 1079, 896, 739		
MS (ESI+)	m/z = 376 [MH] ⁺		
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₃₀ H ₆₁ N ₂ O ₆ P ⁺ [MH] ⁺	376,4267	
	Izmerjena vrednost	376,4253	

4.1.13. Sinteza 4-[[[12-(4,4-dimetil-3-oksil-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodecil]oksi](oksi)fosforil]oksi}-N,N,N-trimetil-1-etanamonjeve notranje soli (17)

REAKCIJA:

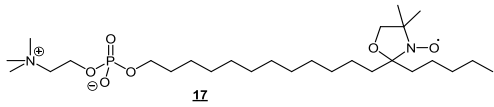


POSTOPEK:

Nitroksid **7** (0,361 g, 0,97 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v MTBE (14 mL), dodali Et₃N (0,73 mL) ter med mešanjem pri 0 °C dodali po kapljicah s pomočjo kapalnika 2-kloro-2-okso-1,3,2-dioksafosfolan (0,432 mL, 4,70 mmol, 4,8 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 15 minut pri 0 °C, potem pa še 1,5 ure pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ker je bil produkt reakcije dokaj nestabilen, smo takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo.

Nitroksid **16** (465 mg, 0,976 mmol) smo raztopili v acetonitrilu (6 mL) ter pri temperaturi 0 °C v reakcijsko zmes 10 minut vpihovali plinasti Me₃N. Nato smo zmes prenesli v avtoklav in segrevali najprej pri temperaturi 55°C 2 dni, kasneje pa smo ga še 4 dni pustili na sobni temperaturi. Po končani reakciji smo uparili topilo pod znižanim tlakom ter zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo z gradientom mobilnih faz (MF₁: CH₂Cl₂/MeOH/NH_{3(aq)} = 0,76/0,21/0,03; MF₂: CH₂Cl₂/MeOH/NH_{3(aq)} = 0,61/0,37/0,02), pri čemer smo izolirali oranžen produkt (75 mg, 14 %).

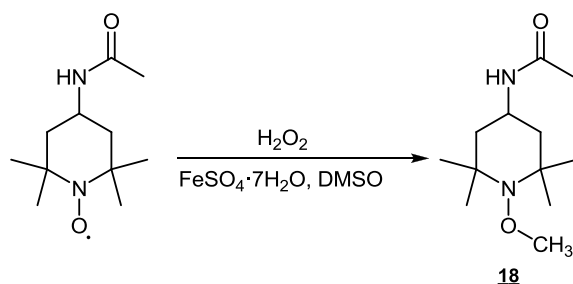
REZULTATI ANALIZ:

 17	Izgled: oranžno olje Izkoristek: 14 % R_f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 10/1 + 0,03 % Et ₃ N) = 0,10	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3945, 3691, 3055, 2987, 2930, 2856, 2686, 2411, 2306, 1422, 1263, 1087, 1052, 947, 896, 736	
MS (ESI+)	m/z = 536 [MH] ⁺	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₇ H ₅₇ N ₂ O ₆ P ⁺ [MH] ⁺	536,3954
	Izmerjena vrednost	536,3961

4.2. METILIRANJE NITROKSIDNEGA RADIKALA

4.2.1. Sinteza *N*-(2,2,6,6-tetrametil-1-metoksipiperidin-4-il)acetamida (**18**)

REAKCIJA:



POSTOPEK:

N-(1-oksil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il)acetamid (100 mg, 0,47 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (5 mL), ter med mešanjem dodali $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (282 mg, 0,39 mmol, 0,8 mol. ekv.) in 30 % vodno raztopino H_2O_2 (500 μL , 17,01 mmol, 36,2 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa dodali bidestilirano vodo (25 mL) in produkt ekstrahirali z Et_2O (3×25 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom, pri čemer so izpadli beli kristali (26 mg, 24 %).

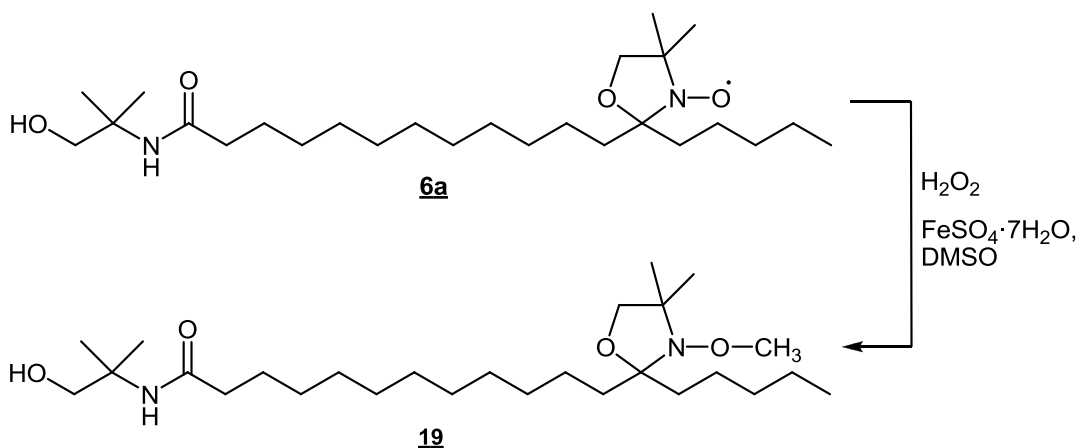
REZULTATI ANALIZ:

<p style="text-align: center;">18</p>	Izgled: beli kristali Izkoristek: 24 % Tališče: 116-121 °C
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3277, 2975, 2932, 2363, 1647, 1560, 1376, 1317, 1249, 1176, 1136, 1042, 976, 935, 762, 720
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, 400 MHz)	δ [ppm] = 1,18 in 1,19 (2 \times s, 12H, cis-, trans-2,6- CH_3), 1,28-1,35 (m, 2H, cis-3,5-H, - CH_2 -), 1,77 (dd, 2H, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 12,3$ Hz, cis-3,5-H, - CH_2 -), 1,95 (s, 3H, CO- CH_3), 3,60 (s, 3H, -O- CH_3), 4,07-4,17 (m, 1H, -NH- $\underline{\text{C}}\text{H}$ -), 5,38 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, -NH-)

¹³C-NMR (CDCl ₃ , 100 MHz)	δ [ppm] = 20,51 (2 × -(CH ₃) ₂), 23,50 (-CO-CH ₃), 32,92 (-CH-NH-), 42,69 (2 × -CH ₂ -), 45,61 (2 × C-(CH ₃) ₂), 59,83 (N-O-CH ₃), 169,46 (-CO-)	
MS (ESI+)	<i>m/z</i> = 229 [MH] ⁺	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₁₂ H ₂₅ N ₂ O ₂ [M+H] ⁺	229,1916
	Izmerjena vrednost	229,1911

4.2.2. Sinteza *N*-(2-hidroksi-1,1-metiletil)-12-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanamida (**19**)

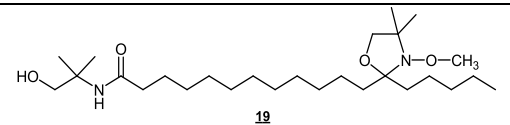
REAKCIJA:



POSTOPEK:

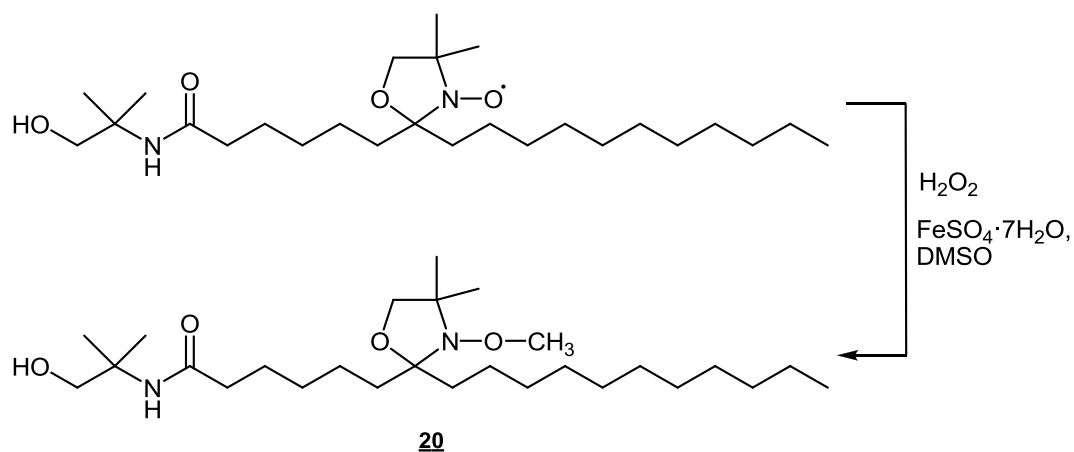
Stranski produkt **6a** (AFASL (4, 11)) (100 mg, 0,219 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (4 mL), ter med mešanjem dodali FeSO₄·7H₂O (64 mg, 0,229 mmol, 1,0 mol. ekv.) in 30 % vodno raztopino H₂O₂ (58 μL, 1,935 mmol, 8,8 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa dodali vodno raztopino NaOH (1 M, 20 mL) ter izpadli produkt ekstrahirali z Et₂O (3 × 20 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Ostalo je brezbarvno olje (23 mg, 21 %).

REZULTATI ANALIZ:

		Izgled: brezbarvno olje Izkoristek: 21 % R_f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,44
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3945, 3688, 3055, 2987, 2686, 2411, 2306, 1652, 1422, 1265, 896, 733	
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)	δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, $J = 6,09$ Hz, -CH ₂ -CH ₃), 1,24 (s, 6H, C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 1,29-1,40 (m, 28H, 11 × -CH ₂ - in -CO-NH-C-(CH ₃) ₂), 1,60-1,76 (m, 6H, -CH ₂ -C ^{alk} -CH ₂ - in -CH ₂ -CH ₂ -CO-), 2,17 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, -CO-CH ₂ -), 3,53 (s, 2H, O ^{doks} -CH ₂ -C ^{doks}), 3,55 (s, 3H, N ^{doks} -O ^{doks} -CH ₃), 3,59 (s, 2H, -CH ₂ -OH), 5,06 (s, 1H, -OH), 5,55 (s, 1H, -NH-)	
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)	δ [ppm] = 14,14 (-CH ₂ -CH ₃), 22,69 (C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 23,69 (-CH ₂ -CH ₃), 24,00 (C ^{alk} -CH ₂ -CH ₂ -), 24,83 (CO-NH-C-(CH ₃) ₂), 25,85 (C ^{alk} -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -), 29,18 (-CH ₂ -CH ₂ -C ^{alk}), 29,39 (-CH ₂ -CH ₂ -CO-NH-), 29,50 (C ^{alk} -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -), 29,65 (6 × -CH ₂ -), 30,31 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 31,46 (-CH ₂ -C ^{alk} -CH ₂ -), 32,50 (-CH ₂ -C ^{alk} -CH ₂ -), 37,31 (-CH ₂ -CO-NH-), 56,19 (-CO-NH-C-(CH ₃) ₂), 63,46 (N ^{doks} -O ^{doks} -CH ₃), 63,70 (-CH ₂ -OH), 70,96 (N-C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 74,56 (O ^{doks} -CH ₂ -C ^{doks}), 101,81 (N-C ^{doks} -O), 174,42 (-CO-NH-)	
MS (ESI+)	$m/z = 471$ [M+H] ⁺	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₇ H ₅₅ N ₂ O ₄ [M+H] ⁺	471,4162
	Izmerjena vrednost	471,4164

4.2.3. Sinteza *N*-(2-hidroksi-1,1-dimetiletil)-6-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidin-2-il)heksanamida (**20**)

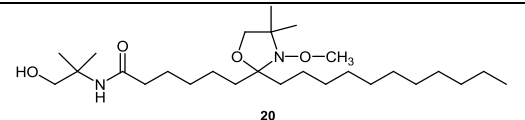
REAKCIJA:



POSTOPEK:

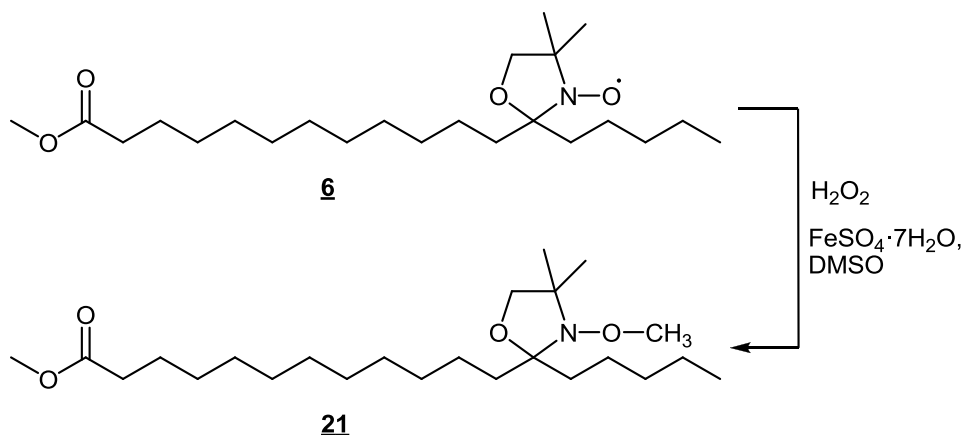
AFASL (10, 5) (100 mg, 0,219 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (4 mL) in med mešanjem dodali $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (68 mg, 0,244 mmol, 1,1 mol. ekv.) in 30 % vodno raztopino H_2O_2 (58 μL , 1,935 mmol, 8,8 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa dodali bidestilirano vodo (20 mL) in produkt ekstrahirali z Et_2O (3×25 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc /heksan = 1/1), pri čemer smo izolirali brezbarvno olje (27 mg, 26 %).

REZULTATI ANALIZ:

 20	Izgled: brezbarvno olje Izkoristek: 26 % R_f (EtOAc /heksan = 1/1) = 0,32	
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3944, 3054, 2987, 2686, 2306, 1421, 1265, 896, 748	
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)	δ [ppm] = 0,88 (t, 3H, J = 6,88 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,22 (s, 6H, $\text{C}^{\text{doks}}-(\text{CH}_3)_2$), 1,26 (s, 6H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 1,29-1,34 (m, 22H, $11 \times -\text{CH}_2-$), 1,58-1,62 (m, 6H, in $-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-$ in $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 2,17 (t, 2H, J = 7,6 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 3,51 (s, 2H, $\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{doks}}$), 3,53 (s, 3H, $\text{N}^{\text{doks}}-\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 3,57 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$), 5,12 (s, 1H, $-\text{OH}$), 5,63 (s, 1H, $-\text{NH}-$)	
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)	δ [ppm] = 14,16 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 22,72 ($\text{C}^{\text{doks}}-(\text{CH}_3)_2$), 23,72 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 24,02 ($\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 24,88 ($\text{CO}-\text{NH}-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 25,83 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 29,38 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}$ in $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 29,70 ($6 \times -\text{CH}_2-$), 30,28 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 31,94 ($-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-$), 37,29 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 56,24 ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}-(\text{CH}_3)_2$), 63,49 ($\text{N}^{\text{doks}}-\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 63,63 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), 70,92 ($\text{N}-\text{C}^{\text{doks}}-(\text{CH}_3)_2$), 74,64 ($\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{doks}}$), 101,58 ($\text{N}-\text{C}^{\text{doks}}-\text{O}$), 174,33 ($-\text{CO}-\text{NH}-$)	
MS (ESI+)	m/z = 471 $[\text{M}+\text{H}]^+$	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	471,4162
	Izmerjena vrednost	471,4163

4.2.4. Sinteza metil 12-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidin-2-il)dodekanoata (21)

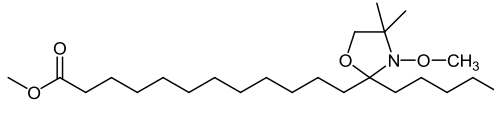
REAKCIJA:



POSTOPEK:

Nitroksid **6** (320 mg, 0,803 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (13 mL), in med mešanjem dodali FeSO₄·7H₂O (217 mg, 0,778 mmol, 1,0 mol. ekv.) in 30 % vodno raztopino H₂O₂ (185 µL, 6,173 mmol, 7,7 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato dodali prečiščeno vodo (20 mL) in produkt ekstrahirali z Et₂O (3 × 25 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom, pri čemer smo izolirali brezbarvno olje (170 mg, 51 %).

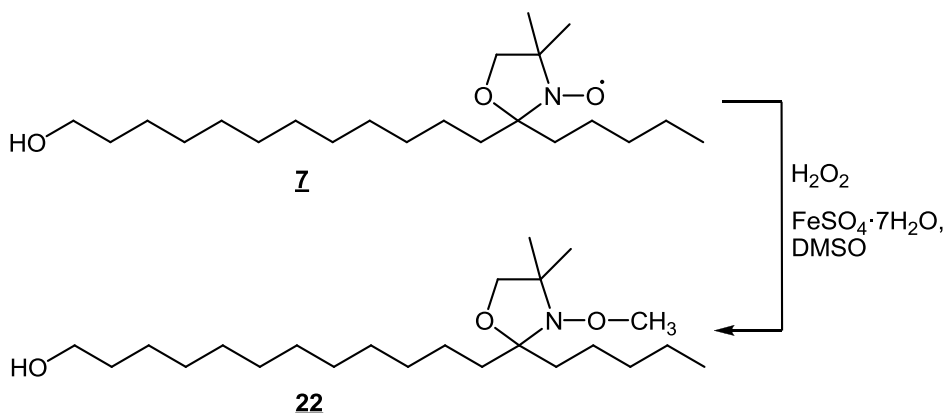
REZULTATI ANALIZ:

 21	Izgled: brezbarvno olje Izkoristek: 51 % R_f (EtOAc/heksan = 1/6) = 0,60
IR (NaCl)	v [cm ⁻¹] = 3307, 2945, 2522, 2362, 2228, 2045, 1450, 1115, 1032
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)	δ [ppm] = 0,92 (t, 3H, J = 7,06 Hz, -CH ₂ -CH ₃), 1,25 (s, 6H, C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 1,27-1,40 (m, 22H, 11 × -CH ₂ -), 1,56-1,65 (m, 6H, -CH ₂ -C ^{alk} -CH ₂ - in -CH ₂ -CH ₂ -CO-), 2,33 (t, 2H, J = 7,30 Hz, -CH ₂ -CH ₂ -CO-), 3,54 (s, 2H, O ^{doks} -CH ₂ -C ^{doks}), 3,56 (s, 3H, N ^{doks} -O ^{doks} -CH ₃), 3,69 (s, 3H, CO-O-CH ₃)

¹³C-NMR (CDCl ₃ , 100 MHz)	δ [ppm] = 14,15 (-CH ₂ -CH ₃), 21,01 (C ^{doks} -CH ₃), 22,71 (-CH ₂ -CH ₃), 23,68 (C ^{alk} -CH ₂ -CH ₂), 24,00 (CH ₂ -CH ₂ -C ^{alk}), 25,00 (CH ₂ -CH ₂ -COO-CH ₃), 28,11 (C ^{doks} -CH ₃), 29,19 (2 × -CH ₂ -C ^{alk} -CH ₂ -), 29,30 (-CH ₂ -), 29,50 (-CH ₂ -), 29,66 (4 × -CH ₂ -), 30,30 (-CH ₂ -), 32,50 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 34,16 (-CH ₂ -COO-CH ₃), 51,50 (-COOCH ₃), 63,46 (N ^{doks} -O ^{doks} -CH ₃), 63,70 (N-C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 74,58 (O ^{doks} -CH ₂ -C ^{doks}), 101,80 (N-C ^{doks} -O), 174,39 (-CO-)	
MS (ESI+)	<i>m/z</i> = 414 [M+H] ⁺	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₄ H ₄₈ NO ₄ [M+H] ⁺	414,3583
	Izmerjena vrednost	414,3581

4.2.5. Sinteza 2-(12-hidroksidodecil)-4,4-dimetil-3-metoksi-2-pentil-1,3-oksazolidina (22)

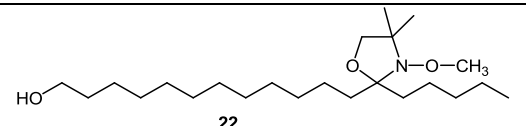
REAKCIJA:



POSTOPEK:

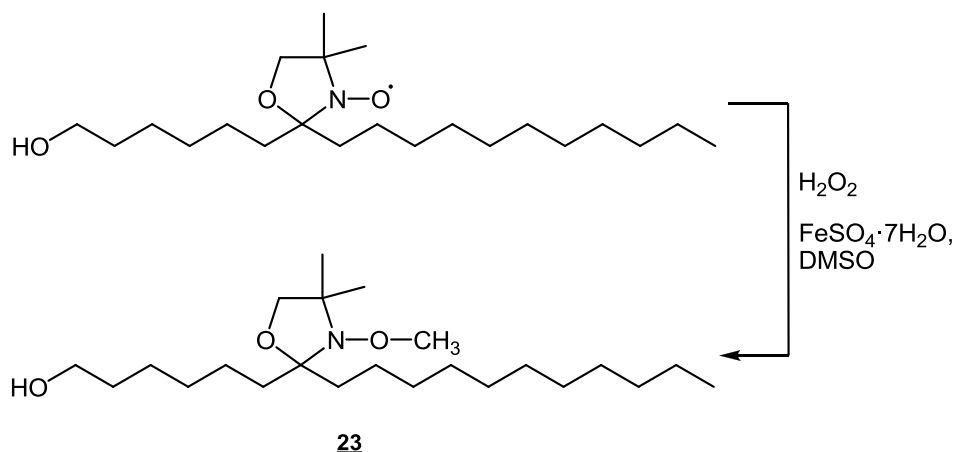
Nitroksid **7** (460 mg, 1,24 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (17 mL), in med mešanjem dodali FeSO₄·7H₂O (282 mg, 1,01 mmol, 0,8 mol. ekv.) in 30 % vodno raztopino H₂O₂ (230 μL, 7,68 mmol, 6,2 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa dodali prečiščeno vodo (40 mL) in produkt ekstrahirali z Et₂O (3 × 20 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/heksan = 1/6) tako, da smo izolirali brezbarvno olje (242 mg, 51 %).

REZULTATI ANALIZ:

		Izgled: brezbarvno olje Izkoristek: 51 % R_f (EtOAc/heksan = 1/6) = 0,13
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3368, 2942, 2523, 2228, 2045, 1450, 1115, 1034, 720	
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)	δ [ppm] = 0,91 (t, 3H, J = 7,02 Hz, -CH ₂ -CH ₃), 1,24 (s, 6H, C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 1,28-1,40 (m, 24H, 12 × -CH ₂ -), 1,56-1,64 (m, 6H, -CH ₂ -C ^{alk} -CH ₂ - in -CH ₂ -CH ₂ -OH), 3,53 (s, 2H, O ^{doks} -CH ₂ -C ^{doks}), 3,55 (s, 3H, N ^{doks} -O ^{doks} -CH ₃), 3,64-3,67 (m, 2H, -CH ₂ -OH)	
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)	δ [ppm] = 14,13 (-CH ₂ -CH ₃), 20,97 (C ^{doks} -CH ₃), 22,69 (-CH ₂ -CH ₃), 23,67 (C ^{alk} -CH ₂ -CH ₂), 24,00 (CH ₂ -CH ₂ -C ^{alk}), 25,77 (CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH), 28,14 (C ^{doks} -CH ₃), 29,46 (-CH ₂ -), 29,66 (6 × -CH ₂ -), 30,28 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃) 32,49 (-CH ₂ -CH ₂ -OH), 32,84 (2 × -CH ₂ -C ^{doks} -CH ₂ -), 63,09 (-CH ₂ -OH), 63,45 (N ^{doks} -O ^{doks} -CH ₃), 63,70 (N-C ^{doks} -(CH ₃) ₂), 74,56 (O ^{doks} -CH ₂ -C ^{doks}), 101,82 (N-C ^{doks} -O)	
MS (ESI+)	m/z = 386 [M+H] ⁺	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₄₈ NO ₃ [M+H] ⁺	386,3634
	Izmerjena vrednost	386,3645

4.2.6. Sinteza 2-(6-hidroksiheksil)-4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidina (23)

REAKCIJA:

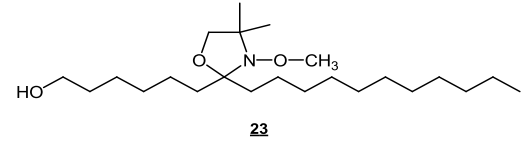


POSTOPEK:

Sočasno s sintezo SI-APL (11, 4), smo sintetizirali tudi analoge SI-APL (5, 10), ki pa so že opisani v literaturi (17).

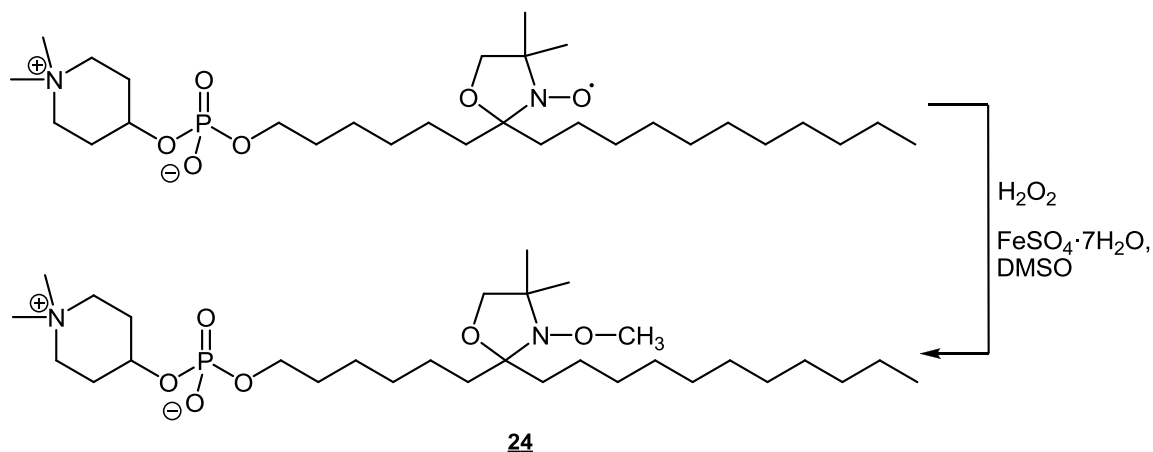
Alkohol (5, 10) (300 mg, 0,810 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (13 mL), in med mešanjem dodali $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (220 mg, 0,788 mmol, 1,0 mol. ekv.) in 30 % vodno raztopino H_2O_2 (180 μL , 6,006 mmol, 7,4 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa dodali bidestilirano vodo (25 mL) in produkt ekstrahirali z Et_2O (3×15 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/heksan = 1/2) tako, da smo dobili brezbarvno olje (119 mg, 38 %).

REZULTATI ANALIZ:

 23	Izgled: brezbarvno olje Izkoristek: 38 % R_f (EtOAc/heksan = 1/2) = 0,23
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3944, 3620, 3055, 2930, 2856, 2686, 2306, 1422, 1265, 1049, 896, 737
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)	δ [ppm] = 0,90 (t, 3H, $J = 6,89$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,24 (s, 6H, $\text{C}^{\text{doks}}-(\text{CH}_3)_2$), 1,27-1,41 (m, 24H, $12 \times -\text{CH}_2-$), 1,58-1,63 (m, 6H, $-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-$ in $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3,53 (s, 2H, $\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{doks}}$), 3,55 (s, 3H, $\text{N}^{\text{doks}}-\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 3,65-3,67 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$)
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)	δ [ppm] = 14,16 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 20,98 ($\text{N}-\text{C}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 22,73 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 24,00 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 25,76 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 28,14 ($\text{N}-\text{C}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 29,39 ($-\text{CH}_2-$), 29,70 ($7 \times -\text{CH}_2-$), 31,95 ($-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-$), 32,84 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 63,08 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), 63,47 ($\text{N}^{\text{doks}}-\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 63,68 ($\text{N}-\text{C}^{\text{doks}}-(\text{CH}_3)_2$), 74,59 ($\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{doks}}$), 101,72 ($\text{N}-\text{C}^{\text{doks}}-\text{O}$)
MS (ESI+)	$m/z = 386$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.2.7. Sinteza 4-[[[6-(4,4-dimetil-3-metoksi-2-undecil-1,3-oksazolidin-2-il)heksil]oksi}(oksi)fosforil]oksi]-1,1-dimetilpiperidinijeve notranje soli (24)

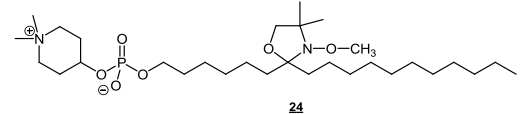
REAKCIJA:



POSTOPEK:

SI-APL (10, 5) (38 mg, 0,068 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo raztopili v DMSO (2 mL), in med mešanjem dodali $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (19 mg, 0,068 mmol, 1,0 mol. ekv.), in 30 % vodno raztopino H_2O_2 (15 μL , 0,501 mmol, 7,4 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali še 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa topilo uparili pod znižanim tlakom. Zaostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq}) = 78/30/4,7$), pri čemer smo dobili rahlo rumenkasto olje (36 mg, 92 %). Iz tega smo lahko sklepali, da se izhodna spojina in produkt nista dobro ločila na koloni silikagela. Produkt namreč ne bi smel biti obarvan.

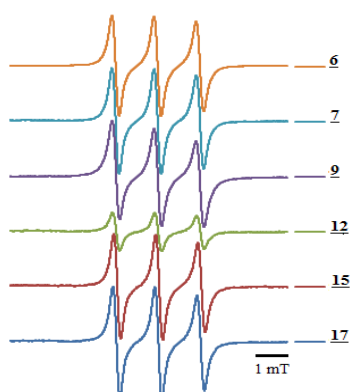
REZULTATI ANALIZ:

 <p style="text-align: center;">24</p>		<p>Izgled: rumenkasto olje</p> <p>Izkoristek: 92 %</p> <p>R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq}) = 78/30/4,7$) = 0,05</p>
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3436, 2252, 2124, 1996, 1662, 1210, 823, 761	
¹H-NMR (DMSO, 400 MHz)	δ [ppm] = 0,86 (bs, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,16 (s, 6H, $\text{C}^{\text{doks}}-(\text{CH}_3)_2$), 1,20-1,36 (m, 24H, $12 \times -\text{CH}_2-$), 1,47-1,52 (m, 6H, $-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{alk}}-\text{CH}_2-$ in $\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,85-1,92 (m, 4H, $2 \times -\text{CH}_2^{\text{piperidin}}$), 2,01-2,08 (m, 4H, $2 \times -\text{CH}_2^{\text{piperidin}}$), 2,33 (s, 6H, $-(\text{CH}_3)_2^{\text{piperidin}}$), 3,08 (s, 2H, $\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_2-\text{C}^{\text{doks}}$), 3,12 (s, 3H, $\text{N}^{\text{doks}}-\text{O}^{\text{doks}}-\text{CH}_3$), 3,43-3,47 (m, 1H, $-\text{CH}^{\text{piperidin}}$), 4,16 (bs, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}$)	
MS (ESI+)	$m/z = 562$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za $\text{C}_{29}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	562,4111
	Izmerjena vrednost	562,4124

4.3. EPR SPEKTROSKOPIJA NITROKSIDOV

4.3.1. EPR spektroskopija etanolnih raztopin nitroksidov

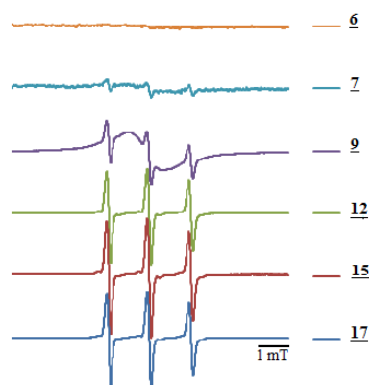
Pripravili smo 10^{-4} M raztopine nitroksidov 6, 7, 9, 12, 15, 17 v EtOH. Približno natančno smo na analitski tehtnici zatehtali po 2 mg posameznega nitroksida ter z avtomatsko pipeto dodali toliko EtOH, da smo dobili 1 mM osnovne raztopine. Te smo nato še 10-krat redčili ter jim pri temperaturi 305-307 K izmerili EPR spektre.



Slika 4. EPR spektri nitroksidov 6, 7, 9, 12, 15 in 17 v etanolu

4.3.2. EPR spektroskopija vodnih raztopin nitroksidov

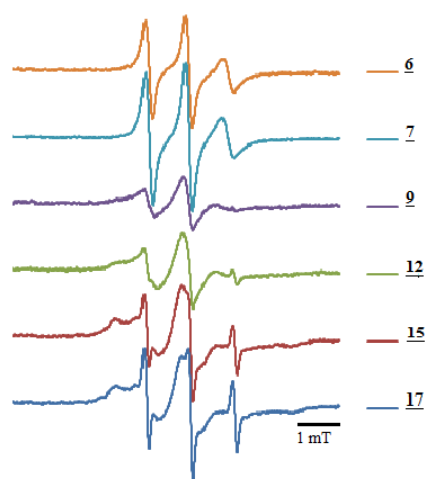
Osnovnim 10^{-3} M raztopinam, pripravljenih v prejšnji točki, smo pod znižanim tlakom uparili etanol ter k suhemu zaostanku v epruveti dodali takšno količino prečiščene vode, da bi dobili 10^{-4} M vodne raztopine spojin 6, 7, 9, 12, 15 in 17 (če bi se v vodi raztopila vsa spojina), ki smo jim nato izmerili EPR spektre pri 305-307 K.



Slika 5. EPR spektri nitroksidov 6, 7, 9, 12, 15 in 17 v vodi

4.3.3. EPR spektroskopija spinsko označenega vzorca mleka

Osnovnim 10^{-3} M etanolnim raztopinam nitroksidov smo pod znižanim tlakom uparili etanol ter k suhemu zaostanku v epruveti dodali takšno količino mleka, da je bila koncentracija nitroksida v emulziji mleka 10^{-4} M. Spojinam **6**, **7**, **9**, **12**, **15** in **17** v mleku smo nato izmerili EPR spektre pri 305-307 K.



Slika 6. EPR spektri nitroksidov **6**, **7**, **9**, **12**, **15** in **17** v mleku

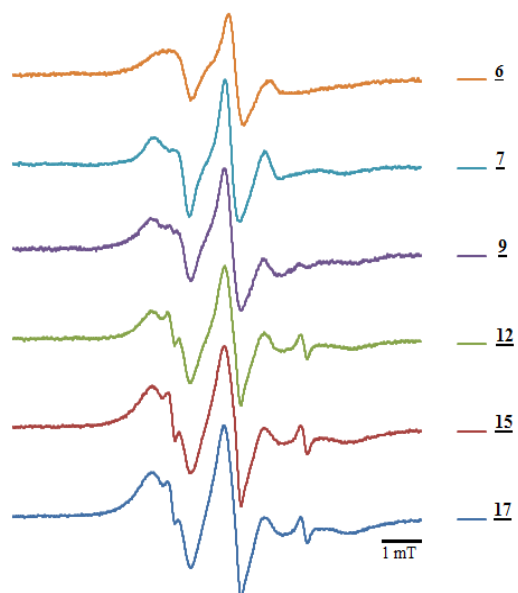
4.3.4. EPR spektroskopija spinsko označenih liposomov

Priprava liposomov

Z metodo tankih filmov smo pripravili večslojne liposome (MLV). 70 mg emulmetika 320 in 30 mg holesterola smo raztopili v zmesi $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ v razmerju 7:3 ter uparili topilo pod znižanim tlakom. K zaostalemu lipidnemu filmu smo dodali 2 mL raztopine fosfatnega pufra s $\text{pH} = 6,8$ pri temperaturi $45\text{ }^\circ\text{C}$ ter nastalo suspenzijo sonicirali 30 minut v ultrazvočni kadički (18).

Spinsko označevanje liposomov

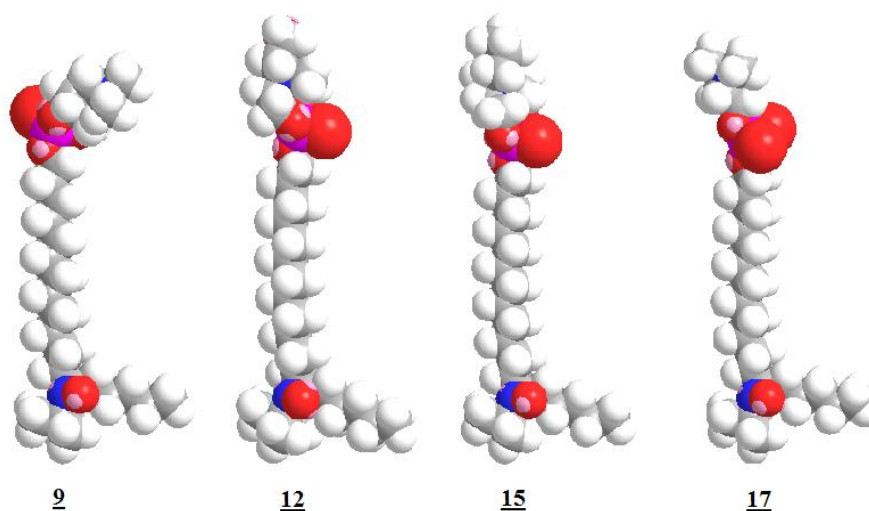
Spojine **6**, **7**, **9**, **12**, **15** in **17** smo nato vgradili v liposome. V manjšo epruveto smo odmerili $80\text{ }\mu\text{L}$ 10^{-3} M etanolne raztopine posameznega spinskega označevalca ter uparili topilo pod znižanim tlakom. Nato smo k filmu na steni epruvete dodali $200\text{ }\mu\text{L}$ liposomov, mešali pri sobni temperaturi na rotavaporju 15 minut ter izmerili EPR spektre pri 305-307 K.



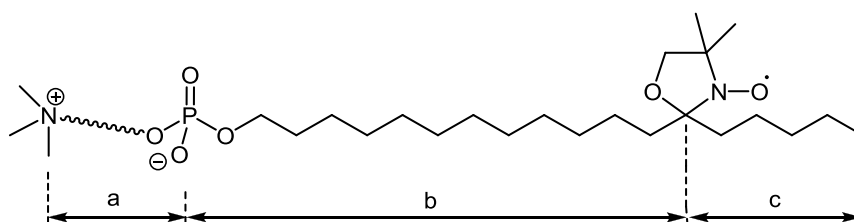
Slika 7. EPR spektri nitroksidov **6**, **7**, **9**, **12**, **15** in **17** vgrajenih v liposome, posneto v fosfatnem pufru pH = 6,8

4.4. MOLEKULSKO MODELIRANJE

SI-APL smo v programu Chem3D Pro minimizirali potencialno energijo ter izmerili dolžine razdalj med dušikom, fosforjem in zadnjim C atomom alkilne verige (slika 9). Slika 8 prikazuje CPK modele molekul z minimizirano potencialno energijo, vrednosti dolžin posameznih delov SI-APL pa so podane v preglednici III.



Slika 8: CPK modeli SI-APL z minimalno potencialno energijo



Slika 9: Splošna formula molekul SI-APL

Preglednica III: Dolžine posameznih delov molekul SI-APL

Spojina	a [Å]	b [Å]	c [Å]	a + b + c [Å]
<u>9</u>	1,500	17,550	6,412	25,462
<u>12</u>	3,570	17,790	6,453	27,813
<u>15</u>	3,602	17,869	6,440	27,911
<u>17</u>	5,072	17,714	6,435	29,221

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

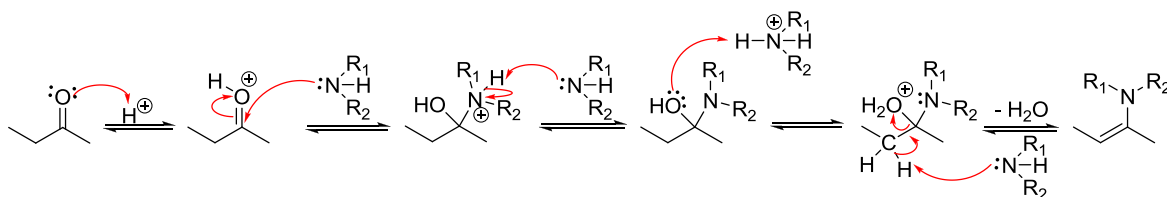
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1. Sinteza SI-APL

SI-APL smo pripravili po že znanih postopkih opisanih v literaturi (17, 19, 20, 21, 22, 23).

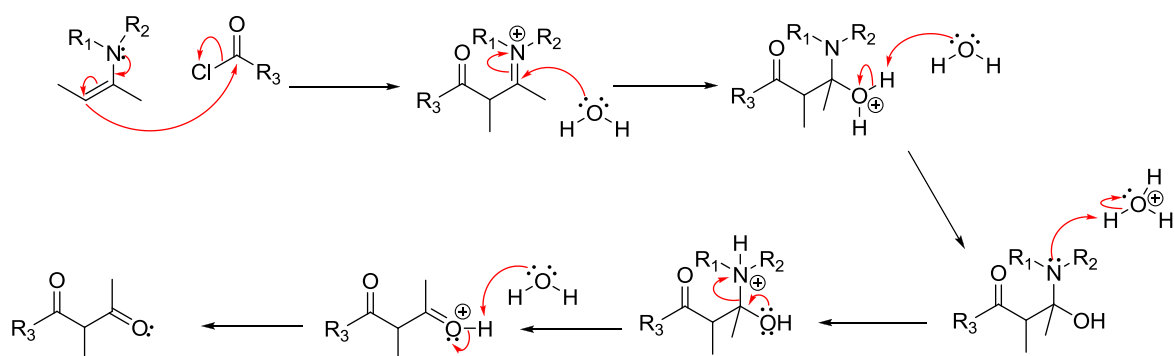
Enamin **1** smo sintetizirali s Storkovo kondenzacijo morfolina in komercialno dostopnega ciklododekanona. Gre za reverzibilno reakcijo, ki jo pomikamo v smer nastajanja produktov, s tem ko iz reakcijske zmesi odstranjujemo vodo (uporaba Dean-Starkove pasti in klorkalcijeve cevke). Shema 6 prikazuje mehanizem reakcije. Para-toluensulfonska kislina je kislinski katalizator, ki protonira kisik karbonilne skupine in s tem poveča njeno elektrofilnost. Nukleofilni dušik amina napade ogljikov atom v tej karbonilni skupini, pri tem pa se tvori C-N vez. Druga molekula sekundarnega amina deluje kot baza, ki sprejme proton, pri čemer nastane karbinolaminskegi intermediat. Sledi protoniranje hidroksilne skupine, baza, ki odstrani vodik iz α -metilenske skupine pa omogoči eliminacijo vode in nastanek enamina (19, 24).

Shema 6: Mehanizem nastanka enamina iz ketona in sekundarnega amina



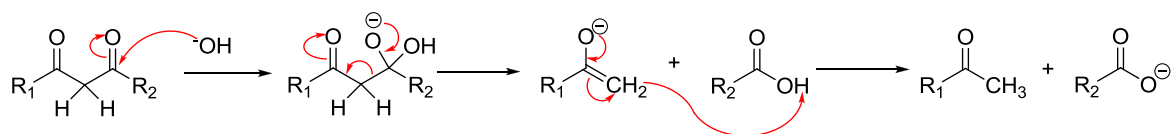
Nastali enamin **1** smo takoj prenesli v reakcijo aciliranja enaminov po Storku. Kot reagent za aciliranje smo uporabili heksanoil klorid, ki smo ga zaradi selektivnosti reakcije počasi dodajali po kapljicah v reakcijsko zmes, ohlajeno na 0 °C. Mehanizem reakcije je prikazan na shemi 7. Pri reakciji pride do izstopa molekule HCl, ki se nevtralizira s trietilaminom, sledi hidroliza imina in nastanek 1,3-diketona **2** (20, 25).

Shema 7: Mehanizem Storkove reakcije aciliranja enamina



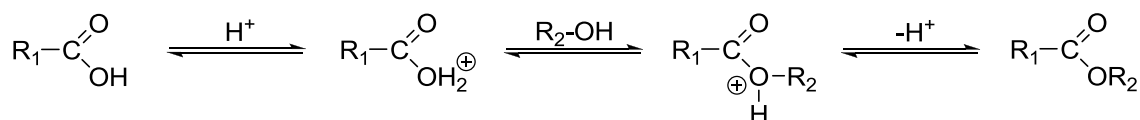
Sledila je alkalna hidroliza diketona **2** z uporabo NaOH v etanolu. Pri reakciji je nastala natrijeva sol ketokislina, ki smo ji nato dodali HCl, pri čemer smo dobili končni produkt **3**. Mehanizem reakcije prikazuje shema 8. Po nukleofilnem napadu hidroksida na karbonylni skupino pride do cepitve vezi na α mestu ter nastanka ketona in karboksilne kisline. V našem primeru reakcija prednostno poteče na karbonylni skupini v obročnem sistemu do nastanka glavnega produkta **3**. V manjši meri poteče tudi reakcija na karbonylni skupini na alkilni verigi, ki je pripeta na obroč, pri tem pa nastaneta stranska produkta ciklododekanon in heksanojska kislina (26, 27).

Shema 8: Alkalna hidroliza 1,3 diketona



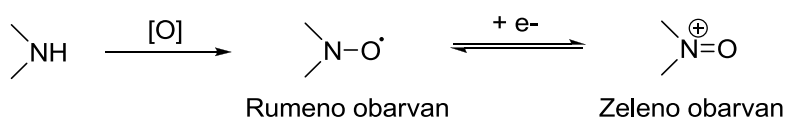
V naslednji stopnji je sledila kislinsko katalizirana esterifikacija ketokislina **3**. BF_3 -metanolni kompleks je Lewisova kislina, ki je pogosto uporabljen kislinski katalizator za esterifikacijo maščobnih kislin. $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ protonira kisikov atom na karboksilni skupini, zato ta postane bolj dovzetna za nukleofilne substitucije. Kisik v metanolu tako napade protonirano karboksilno skupino, sledi izstop vode in nastanek metilnega estra **4** (shema 9). Izkoristek reakcije je bil sicer dober (96 %), vendar bi ga lahko še povečali če bi tekom reakcije odstranjevali vodo, saj je reakcija reverzibilna (21, 28, 29).

Shema 9: Mehanizem kislinsko katalizirane esterifikacije maščobnih kislin

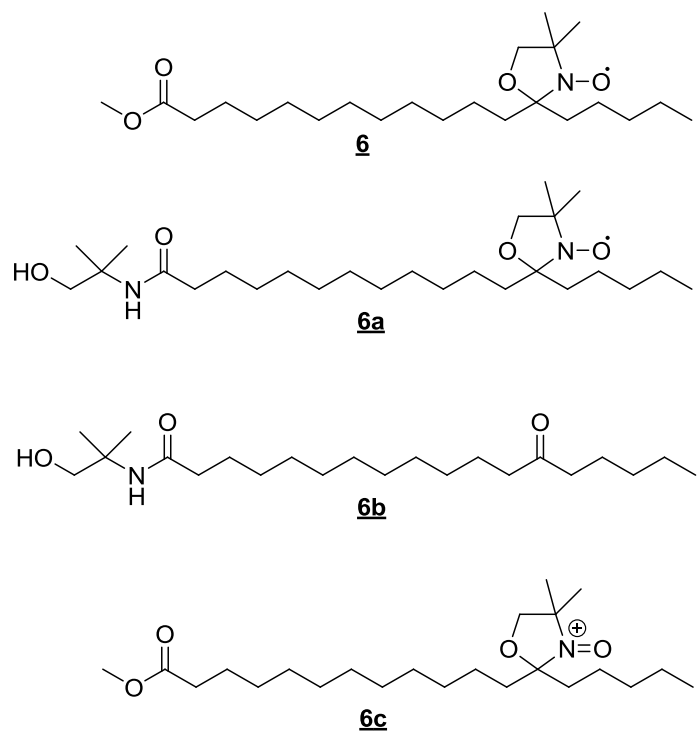


V naslednji stopnji smo izvedli kondenzacijo ketoestra **4** z 2-amino-2-metilpropanolom ob prisotnosti kislinskega katalizatorja (TsOH) in s segrevanjem reakcijske zmesi. TsOH ima v tej reakciji podobno vlogo kot BF₃ v prejšnji stopnji – protonira karbnilno skupino, ki postane bolj elektrofilna. Dušik iz amino skupine jo zato zlahka napade, ob reakciji obeh alkoholnih skupin pa izstopi voda. Ker je reakcija reverzibilna, smo z uporabo Dean-Starkove pasti tekom reakcije odstranjevali vodo ter tako pomikali reakcijsko ravnotežje v smer nastajanja produkta **5**. Kljub temu, da smo uporabili omenjeno metodo za odstranjevanje vode ter aminoalkohol v znatnem presežku, je produkt nastajal zelo počasi. Po izolaciji spojine nismo čistili na koloni silikagela, ampak smo jo zaradi neobstoynosti (aminoketal lahko hidrolizira nazaj do aminoalkohola in ketona) takoj oksidirali z mCPBA do nitroksida. Ker izbrani oksidant burno reagira z izhodno spojino, smo reakcijo izvajali pri 0 °C. Oksidant smo dodajali počasi po kapljicah, konec poteka reakcije pa smo zaznali organoleptično. Tekom oksidacije se je namreč reakcijska zmes barvala vedno bolj rumeno, ko pa je barva postala že za odtenek bolj zelena pa smo reakcijo prekinili. Rumena barva je nastala na račun oksidacije aminske skupine do nitroksidne (**6**). Nadaljnja oksidacija nitroksida pa je vodila do nastanka oksoamonijevega kationa, ki se obarva zeleno (shema 10) (30).

Shema 10: Prikaz oksidacije amina



Izolacija spojine **6** je potekala z ekstrakcijo. S spiranjem z vodno raztopino NaHCO₃ smo se znebili klorobenzojske kisline, ki je nastala kot stranski produkt oksidacije. Pri čiščenju s kolonsko kromatografijo smo opazili, da se v našem vzorcu nahaja 5 spojin. Poleg produkta **6**, nezreagirane izhodne spojine **4** in oksoamonijeve soli (**6c**), najdemo še dva stranska produkta – oksazolidnski amid (**6a**) in oksoamid (**6b**) (slika 10) (22).

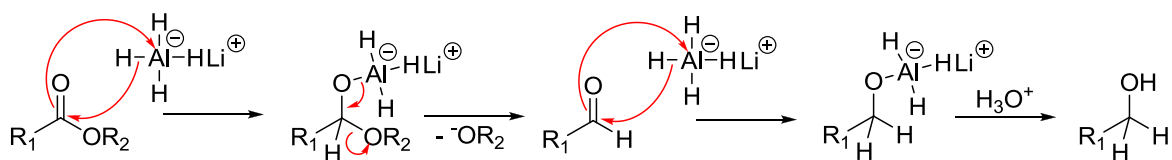


Slika 10: *Spojine, ki so nastale pri kondenzaciji ketoestra z aminoalkoholom in nadaljnji oksidaciji oksazolidina.*

Omenjene spojine smo na TLC detektirali z oroševanjem z 2,4-dinitrofenilhidrazinom, pri čemer so se ketoni (**4** in **6b**) takoj obarvali rumeno, prisotnost doksila (**6** in **6a**) pa se je potrdila šele po nekaj minutah, ko je spojina v kislem mediju hidrolizirala nazaj do ketona.

Sledila je redukcija metilnega estra spojine **6** do alkohola **7**. Izvedba reakcije zahteva nekaj več pozornosti zaradi uporabe LiAlH_4 , ki je izredno reaktiven reducent. Redukcijo smo zato morali izvajati v inertni suhi atmosferi ter z uporabo brezvodnega topila. Mehanizem redukcije je prikazan na shemi 11. Nukleofilni hidrid iz LiAlH_4 napade elektrofilno karbnilno skupino esterske vezi, kar vodi do nastanka tetraedričnega intermediata. Sledi razpad intermediata in izstop metoksida, pri tem pa se tvori nov intermediat – aldehyd. V naslednjem koraku se po istem principu reducira tudi aldehyd. Nukleofilni hidrid napade karbnilno skupino na aldehydu, tvori se tetraedrični intermediat, ki po razpadu in protoniranju alkoksida daje ustrezen alkohol (17, 31).

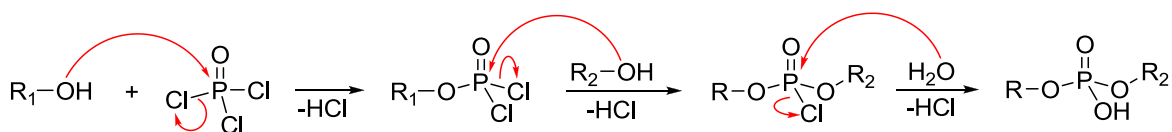
Shema 11: Mehanizem redukcije estra z LiAlH_4



Konec poteka reakcije smo potrdili s TLC, v reakcijski zmesi pa je še vedno ostalo nekaj nezreagirane LiAlH_4 . Ker LiAlH_4 zelo burno reagira z vodo smo v reakcijsko zmes najprej dolili etilacetat in šele ko je ta nehal reagirati (reakcijska zmes se je rahlo penila), smo dodali vodo. Dodali smo še sušilno sredstvo, zmes filtrirali, uparili topilo ter spojino **7** čistili s kolonsko kromatografijo. Spojina **7** je služila kot izhodna spojina za pripravo SI-APL **9**, **12**, **15** in **17**.

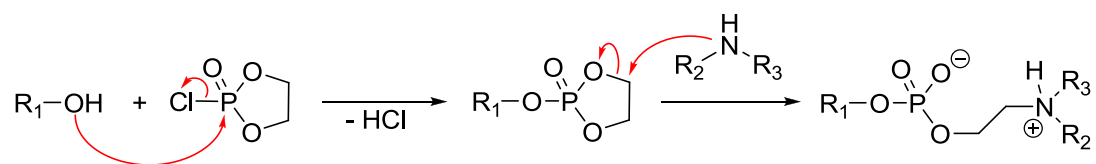
Nitroksid **8** smo sintetizirali tako, da smo na alkoholno skupino spojine **7** uvedli fosfat in aminoalkohol. Reakcija je potekla po mehanizmu trojne nukleofilne substitucije (shema 12). Ker prisotnost vode moti uvedbo omenjenih fragmentov, smo prvi dve stopnji sinteze izvedli v brezvodnih pogojih ter z uporabo brezvodnih topil in reagentov. Zaradi večje selektivnosti reakcije smo reakcijo izvajali pri temperaturi med 5 in 10 °C ter s postopnim dodajanjem fosforilklorida. Pri sintezi smo kot bazo uporabili piridin, ki je v reakciji nevtraliziral sproščeni HCl (23).

Shema 12: Sinteza fosfatnega diestra



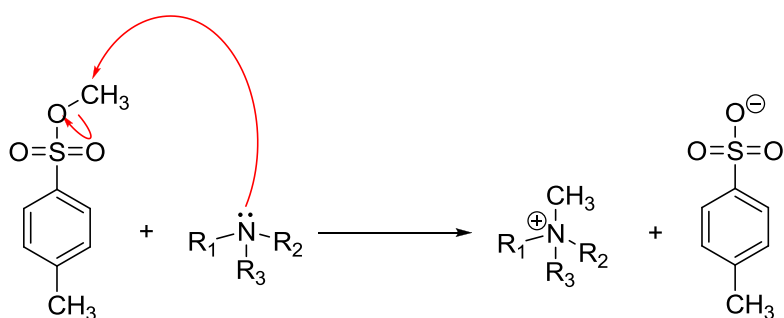
Alkilfosfolipide **11**, **14** in **17** smo sintetizirali na podoben način. Na alkoholno skupino molekule **7** smo uvedli 2-kloro-2-okso-1,3,2-dioksafosfolan, pri tem pa je potekla nukleofilna substitucija. Ker je reagent je zelo reaktiven, smo reakcijo zaradi večje selektivnosti izvajali pri 0 °C ter s postopnim dodajanjem reagenta. Dioksafosfolanski obroč je dokaj labilen, zato smo produkt reakcije takoj prenesli v naslednjo stopnjo. V tej stopnji je šlo za adicijo sekundarnega oz. v primeru sinteze spojine **17**, terciarnega amina. Nukleofilni dušik aminske skupine napade metilensko skupino s primanjkljajem elektronske gostote, ki se nahaja v obroču dioksafosfolana. Obročna struktura se tako odpre, pri tem pa nastane alkilfosfolipid (shema 13). Kot bazo za nevtralizacijo sproščene HCl smo uporabili trietilamin (23).

Shema 13: Fosforilacija in uvedba amina



Molekulam **8**, **11** in **14** smo kvarternizirali dušikov atom v terciarnem aminu. Metiliranje terciarnega amina poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije S_N2 z metilnim estrom p-toluensulfonske kisline (p-toluensulfonat je dobra izstopajoča skupina pri S_N2) ob prisotnosti baze (K_2CO_3) in polarne topila, ki pospešita tvorbo produkta. Dušik v terciarnem aminu napade elektrofilno metilno skupino, pri tem pa izstopi tozilat (shema 14) (23, 32).

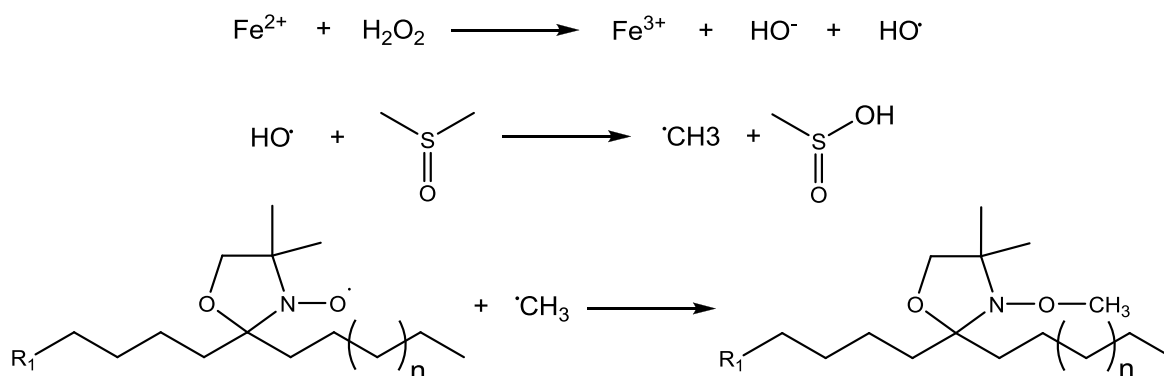
Shema 14: Mehanizem nukleofilne substitucije S_N2



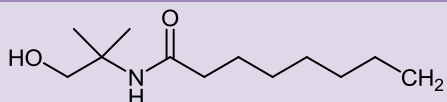
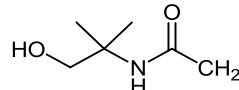
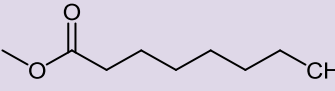
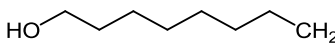
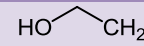
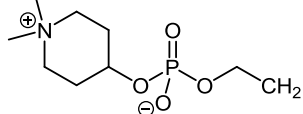
5.1.2. Metiliranje nitroksidnega radikala – Fentonova reakcija

Tudi pri metiliranju nitroksidnega radikala, smo se zgedovali po že znanih postopkih. Nitroksid smo ob prisotnosti DMSO, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in H_2O_2 pretvorili v metoksiaminski analog. Pri tem je potekla Fentonova reakcija. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ je vir Fe^{2+} ionov, ki se oksidirajo z H_2O_2 do 3+ oksidacijskega stanja, pri reakciji pa nastaneta hidroksilni anion (OH^-) in hidroksilni radikal (HO^\bullet). Slednji nadalje reagira z DMSO, s tem pa se tvorita metansulfonska kislina in metilni radikal ($^\bullet CH_3$), ki reagira z nitroksidnim radikalom v doksilni skupini in tako prekine verižno reakcijo. DMSO ima v reakciji poleg vloge generatorja metilnih radikalov tudi vlogo topila. Reakcija je prikazana na shemi 15 (33, 34, 35).

Shema 15: Fentonova reakcija, predstavljena na oksazolidinskem tipu nitroksidnega radikala



Preglednica IV: Strukturni fragmenti spojin 19, 20, 21, 22, 23, 24

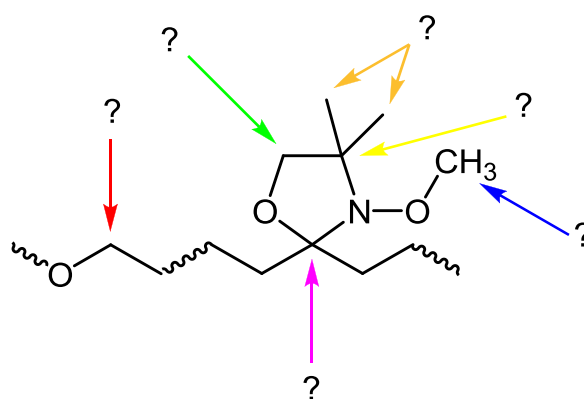
Spojine:	R ₁ :	n:
<u>19</u>		1
<u>20</u>		7
<u>21</u>		1
<u>22</u>		1
<u>23</u>		7
<u>24</u>		7

Sinteza spojin 18, 19, 20, 21, 22, 23 in 24 je potekala na podoben načini. Ker smo želeli tudi optimizirati sintezo, smo spreminjali ekvivalente reagentov ter način izolacije med posameznimi sintezami teh spojin. Reakcija je potekla po 30 minutah, kar smo zaznali tudi s TLC (lisa izhodne spojine (nitroksid) ni bila več prisotna). Izolacija spojine naj bi po literarnih podatkih potekala z dodatkom raztopine 1 M NaOH in ekstrakcijo z Et₂O. Po takšnem principu smo izolirali spojino 19, pri izolaciji spojin 18, 20, 21, 22 in 23 pa smo v

reakcijsko zmes najprej dodali prečiščeno vodo, nato pa izvedli ekstrakcijo z Et₂O. Izkoristki reakcij so bili tako pri slednjih višji (24 – 51 %) kot pri spojini **19** (21 %), poleg tega pa smo pri spojini **19** zaznali tudi dodatno liso na TLC. Zaradi svoje lipofilnosti so se omenjene spojine v večini porazdelile v organsko fazo. Pri spojini **18** je izkoristek nekoliko nižji (24 %), saj je ta bistveno manj lipofilna in se je zadržala tudi v vodni fazi. Ker je spojina **24** izredno polarna, in bi tako po opisani izolaciji ostala v vodni fazi, smo reakcijski zmesi po koncu reakcije uparili DMSO. Pri tem smo imeli težave, saj ima DMSO visoko vrelišče in ga zato izredno težko odstranimo z uparivanjem. Spojine, kjer smo pri nanosu produkta zaznali več lis na TLC ploščici, smo čistili s kolonsko kromatografijo. Problem smo imeli s čiščenjem spojine **24**, kjer sta bila retencijska faktorja izhodne spojine in produkta enaka in se nista spremenila niti z nižanjem polarosti mobilne faze. V vzorcu sta se zato nahajali obe spojini, poleg tega pa je bil prisoten tudi DMSO. Signali v ¹H NMR spektru omenjene spojine so bili zelo široki in prekriti s signali, ki so pripadali topilu. Izkoristek reakcije pa je bil prav tako bistveno višji (92 %), ravno na račun prisotne izhodne spojine in topila.

5.2. KOMENTAR NMR ANALIZ

Produktom (19, 20, 21, 22, 23, 24), ki so nastali po metilaciji nitroksidnega radikala, smo posneli ^1H in ^{13}C NMR spektre. Ker iz dobljenih spektrov nismo mogli ugotoviti kateri signal pripada določenemu protonu oz. ogljikovemu atomu v strukturi molekule, smo si pomagali z napovedjo ^1H in ^{13}C NMR spektrov v programu ChemDraw Ultra 11.0 ter tudi s HMQC in HMBC meritvami. Probleme z asignacijo signalov smo imeli pri ogljikovih atomih doksilne skupine ter CH_2 skupine, ki se nahaja ob kisiku na alkilni verigi (slika 11).

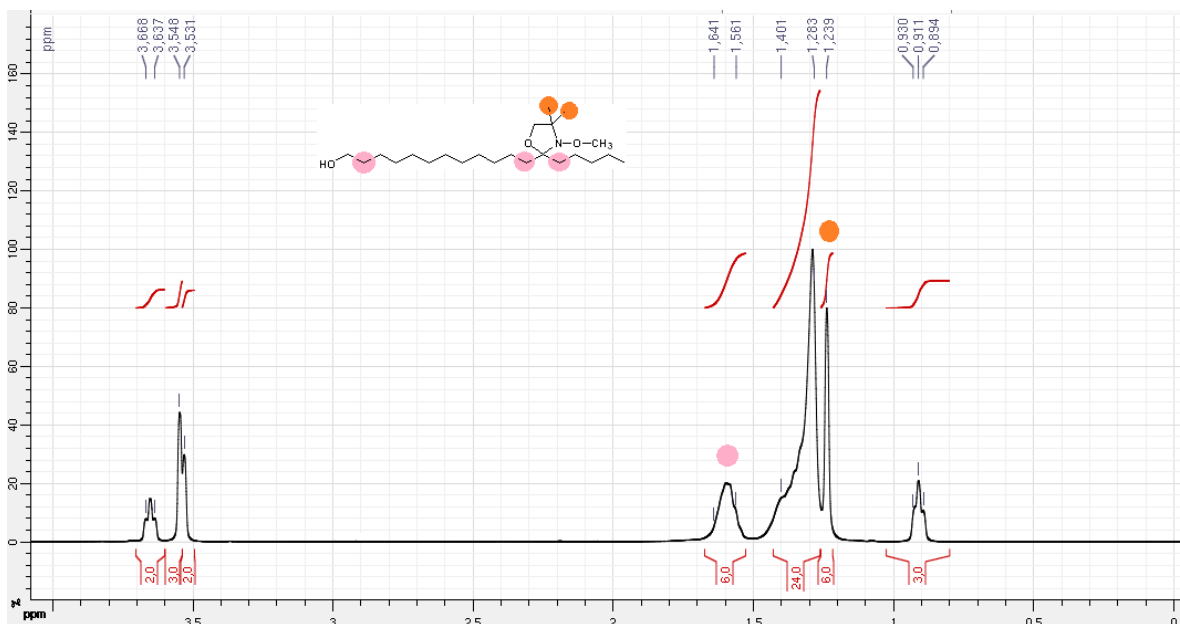


Slika 11: Prikaz delov molekule, kjer smo imeli probleme z asignacijo signalov v ^1H in ^{13}C NMR spektrih

Ker so si spojine 19, 20, 21, 22, 23, 24 med seboj strukturno podobne, podobni pa so tudi kemijski premiki atomov, ki nas zanimajo, smo v nadaljevanju opisali razlago spektrov le za spojino 22.

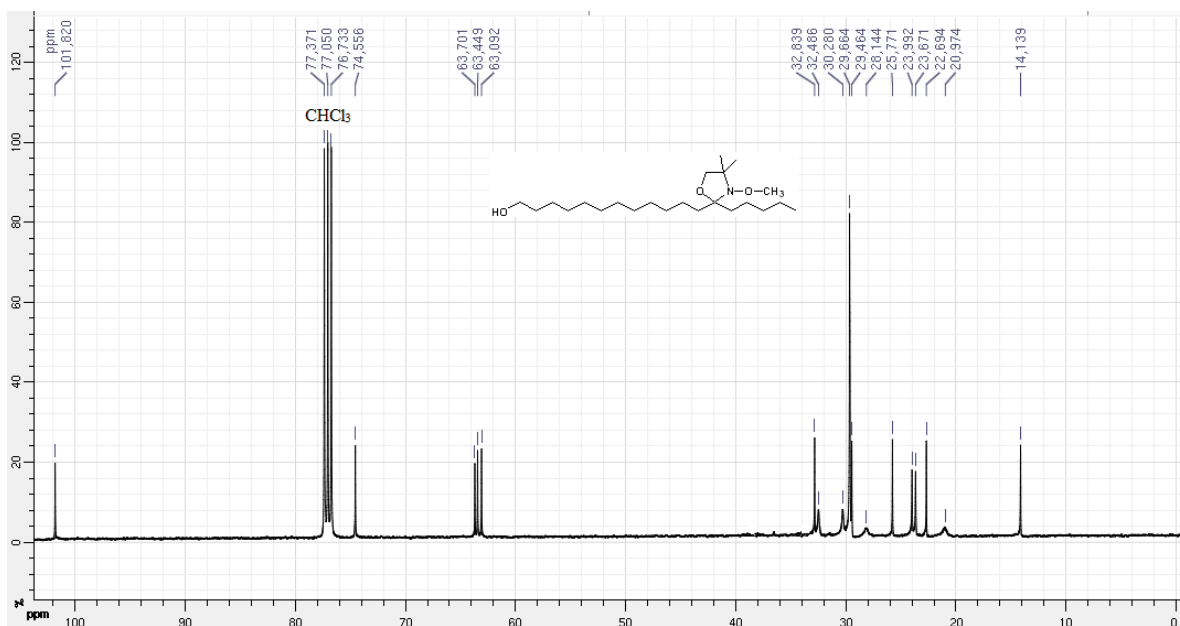
Z napovedjo ^1H NMR spektra s programom ChemDraw Ultra 11.0 smo si pomagali razložiti, katerim protonom pripada singlet s kemijskim premikom 1,24 ppm in katerim multiplet pri 1,56-1,64 ppm (slika 12). Ugotovili smo, da:

- singlet pripada obema metilnima skupinama na doksilu (označena z oranžno)
- multiplet vsebuje protone, ki se nahajajo na alkilni verigi ob doksilu ter protone, ki so za 2 C atoma oddaljeni od kisika na alkilni verigi (označeni z roza).



Slika 12: ^1H NMR spekter spojine 22

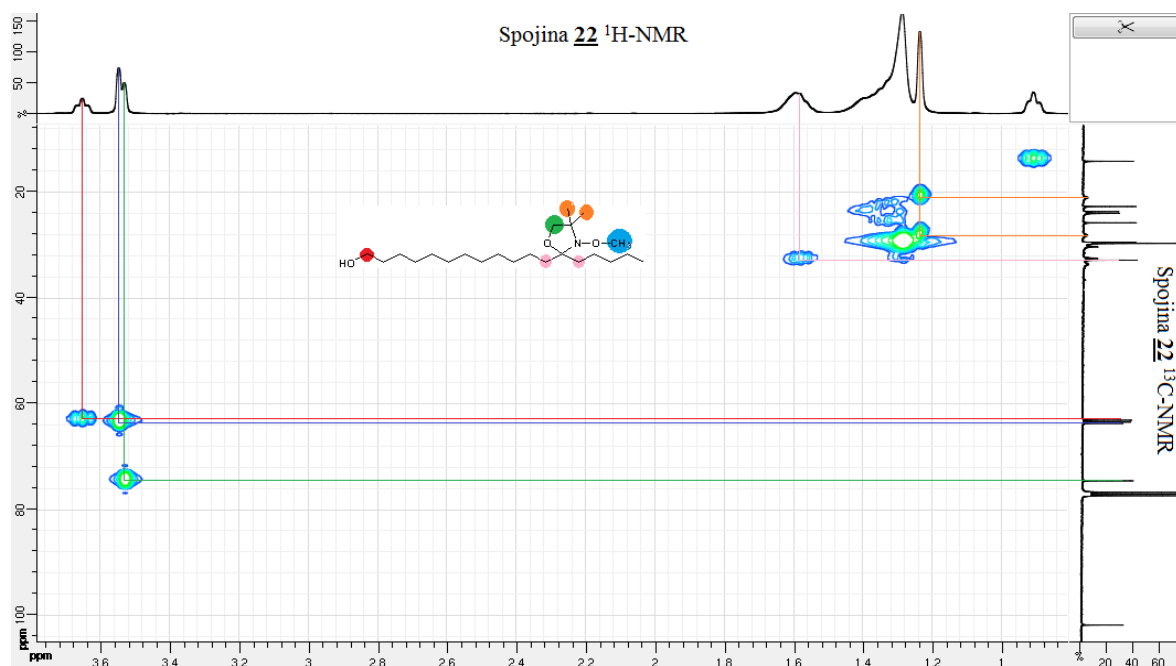
Iz ^{13}C spektra (slika 13) niti s pomočjo napovedi nismo mogli ugotoviti kateri signal pripada kateremu ogljiku, zato smo posneli še HMQC in HMBC spektra.



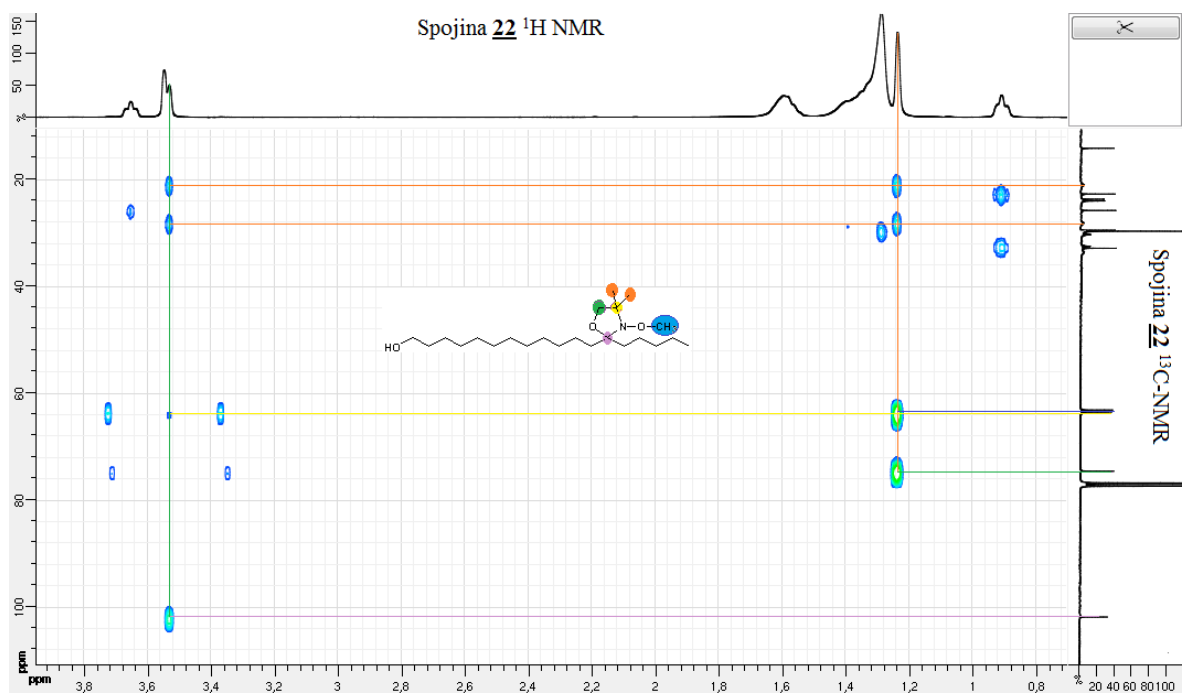
Slika 13: ^{13}C NMR spekter spojine 22

HMQC spekter (slika 14) nam prikazuje sklopitve ^{13}C atomov z na njih vezanimi protoni, katerih kemijske premike poznamo iz ^1H NMR spektra. HMBC spekter (slika 15) nam prikazuje sklopitve bolj oddaljenih protonov s ^{13}C preko dveh, treh ali celo štirih vezi. Iz povezav v HMQC in HMBC spektrih smo tako ugotovili, da v ^{13}C spektrih:

- šibka signala s 20,97 in 28,14 ppm pripadata metilnima skupinama na doksilu (označeni z oranžno na slikah 14 in 15)
- ogljika, ki se nahajata tik ob ogljiku, na katerega je vezana doksilna skupina, imata v ^{13}C spektru signal pri 32,84 ppm (označena z roza na sliki 14)
- pri 63,10 – 63,70 ppm, kjer imamo tri signale v ^{13}C NMR spektru, prvi signal pripada CH_2 skupini ob kisiku na alkilni verigi (označena z rdečo na sliki 14), drugi metilni skupini na doksilnemu kisiku (označena z modro na slikah 14 in 15), tretji signal pa C atomu v doksilni skupini, na katerega sta vezani metilni skupini (označen z rumeno na sliki 15)
- signal pri 74,56 ppm pripada CH_2 skupini v doksilu (označen z zeleno na slikah 14 in 15)
- signal pri 101,82 ppm pripada ogljiku alkilne verige, na katero je vezana doksilna skupina (označen z vijolično na sliki 15).



Slika 14: HMQC spekter spojine 22



Slika 15: HMBC spekter spojine **22**

5.3. KOMENTAR ANALIZ EPR SPEKTROV

Nitroksidom **6**, **7**, **9**, **12**, **15** in **17** smo izmerili EPR spektre v etanolu, prečiščeni vodi, mleku (emulzija olje/voda) ter v vzorcu liposomov. Iz spektrov spojin v različnih okoljih smo določili hiperfino sklopitveno konstanto (a_N), ki daje informacijo o neposredni okolici nitroksidnega radikala. Vzorcem, posnetih v mleku in liposomih pa še ureditveni parameter (S_{eff}), ki pa opisuje ureditev fosfolipidnih alkilnih verig v membrani. EPR spektri so prikazani v podpoglavju 4.3., vrednosti ureditvenih parametrov v preglednici V, vrednosti konstant hiperfine sklopitve pa v preglednici VI.

Preglednica V: Ureditveni parameter S_{eff}

Spojine	Liposomi	Mleko
6	0,510	-
7	0,550	-
9	0,617	0,851
12	0,583	0,892
15	0,562	0,809
17	0,580	0,818

Preglednica VI: Izotropna hiperfina sklopitvena konstanta a_N ($\times 10^{-4} T$)

Spojina	Etanol	Voda	Mleko		Liposomi
			Voda	Olje	
6	620	Netopna	496	-	564
7	620	Netopna	493	-	572
9	616	552	524	511	590
12	620	552	549	527	587
15	624	556	550	468	575
17	620	556	552	547	575

EPR spektri nitroksidov v etanolu

Spektri etanolnih raztopin nitroksidov so značilni izotropni tripleti in so si med seboj podobni. Večje odstopanje opazimo le pri spojini **12**, kjer je amplituda h_0 manjša. Pri

redčenju vzorcev je najverjetneje prišlo do napake, zato je koncentracija spojine **12** nekoliko nižja od predvidene (10^{-4} M). Konstante hiperfine sklopitve se bistveno ne razlikujejo med sabo. Vzorce nitroksidov smo posneli v prisotnosti kisika. Kisik je lipofilen paramagnetni plin, ki se v organskih topilih raztaplja bolje kot v vodi in zaradi dipolarnih interakcij z nitroksidi povzroča širitev spektralnih črt. Če bi vzorcem odstranili kisik (jih prepihal z dušikom), bi dobili ožje spektralne črte z večjo amplitudo (9).

EPR spektri nitroksidov v vodi

Za razliko od spojin **9**, **12**, **15** in **17** sta spojini **6** in **7** izrazito lipofilni in zaradi tega v vodi nista topni. EPR spektra teh dveh nitroksidov sta zato neuporabna. SI-APL **9**, **12**, **15** in **17** imajo značilno amfifilno strukturo in zato se v vodnih raztopinah pri koncentracijah nižjih od CMC razporedijo po vseh mejnih površinah, nad CMC pa tvorijo micelle. EPR spektri vodnih raztopin SI-APL **12**, **15** in **17** so izotropni in so si med seboj podobni, pri spojini **9** pa opazimo nekoliko spremenjen spekter, ki je posledica tvorbe micel. Iz tega lahko sklepamo, da so koncentracije raztopin **12**, **15** in **17** nižje od CMC, medtem ko je pri vzorcu s spojino **9** koncentracija že višja od CMC. Vrednosti hiperfinih sklopitvenih konstant SI-APL so si med seboj podobne.

EPR spektri nitroksidov v mleku

Mleko je emulzija tipa olje v vodi, zaradi česar se spojine porazdeljujejo med ti dve fazi. Lipofilne verige tako segajo v oljno fazo, medtem ko se polarne glave zadržujejo v vodni. Spojini **6** in **7** se zaradi svoje izrazite lipofilnosti raje zadržujeta v oljni fazi, SI-APL, ki imajo značilne amfifilne strukture pa so se porazdelili med obe fazi. EPR spektri slednjih so zato značilne oblike, z vodnim in oljnim delom spektra. Tem spojinam smo zato lahko izračunali hiperfino sklopitveno konstanto (a_N) in ureditveni parameter (S_{eff}) (preglednica V in preglednica VI). S prileganjem in z uporabo ustreznega programa za simulacijo EPR spektrov, bi lahko določili porazdelitveni koeficient molekul.

EPR spektri nitroksidov v liposomih

Iz EPR spektrov spinsko označenih liposomov lahko ocenimo v kolikšnem deležu se je posamezen spinski označevalec vgradil v membrano. Spektri SI-APL **12**, **15** in **17** se praktično ne razlikujejo. Pri vseh je viden vodni (izotropni) del EPR spektra, ki je pri SI-APL **9** že nekoliko manjši. Izotropni del spektra je viden na račun prostih molekul

spinskega označevalca, ki se niso vgradile v fosfolipidni dvosloj. Zaradi izrazite lipofilnosti spojin 6 in 7 je viden le membranski del spektra teh dveh molekul - spojini sta se v celoti vgradili v liposome. Delež vgrajenih molekul je torej največji pri spojinah 6 in 7, sledjo pa jima spojine 9, 12, 15 in 17.

Iz podatkov o maksimalnem in minimalnem hiperfinem razcepu ($2A_{\max}$ in $2A_{\min}$) absorpcijskih črt na EPR spektru smo izračunali vrednosti (navideznega) ureditvenega parametra (S_{eff}) in izotropne ^{14}N -hiperfine sklopitvene konstante (a_N). Ureditveni parameter določa urejenost fosfolipidnih verig v lipidnem dvosloju, pri čemer vrednost $S_{eff} = 1$ predstavlja popolno urejenost membrane, vrednost $S_{eff} = 0$ pa izotropno porazdelitev. Hiperfina sklopitvena konstanta (a_N) daje informacijo o neposredni okolici nitroksidnega radikala in se z večanjem polarnosti okolice viša (9).

5.4. KOMENTAR MOLEKULSKEGA MODELIRANJA

Simulacija molekulske dinamike je pokazala, da ureditveni parameter za alkilne verige fosfolipidov najprej nekoliko narašča, potem pa pada proti sredini lipidnega dvosloja, kjer so vrednosti najmanjše (36).

Iz izračunanih ureditvenih parametrov (S_{eff}) in hiperfinih sklopitvenih konstant (a_N), ki so podane v preglednici V in preglednici VI v podpoglavju 5.3. lahko sklepamo, da se doksilna skupina spojine **6** nahaja najgloblje v membrani liposoma, medtem ko je najbolj na površini doksilna skupina spojine **9**. Zaradi svoje lipofilne strukture, brez polarne glave se **6** z lahkoto vgradi globlje v membrano. Spojina **7** ima na koncu lipofilne verige alkoholno skupino, ki vgrajevanje že nekoliko otežuje. Glede na strukturo polarne glave med molekulami SI-APL nismo opazili bistvenih razlik. Najgloblje v membrano liposomov se je vgradila doksilna skupina molekule **15**, ki ima v strukturi piperidin v oddaljenosti dveh C atomov od fosfatne skupine. Najmanj globoko pa se je vgradila spojina **9**, ki ima prav tako v polarni glavi piperidin, ki pa je neposredno povezan s fosfatno skupino v molekuli SI-APL. Razlog, da se je pri spojini **9** doksilna skupina, ki poroča o svoji okolici, vgradila najmanj globoko v membrano bi lahko bil v razdalji med polarno glavo in doksilno skupino, ki je pri tej spojini najkrajša.

ZAKLJUČEK

V okviru magistrskega dela smo pripravili spinsko označene alkilfosfolipide (SI-APL), ki so v svoji strukturi vsebovali doksilno skupino na 13. C atomu, njihove polarne glave pa so bile različne. Spojino **7** smo sintetizirali z linearno sintezo v sedmih reakcijskih stopnjah, nadaljnja sinteza pa je potekala divergentno v dveh oz. treh reakcijskih stopnjah do končnih spojin **9**, **12**, **15** in **17**.

Spojinam z oksazolidinskim nitroksidnim radikalom smo nato posneli EPR spektre v različnih okoljih in po izračunanih ureditvenih parametrih (S_{eff}) sklepali na stopnjo vgrajevanja posamezne spojine v liposome. Poleg ureditvenega parametra smo izračunali tudi vrednosti hiperfine sklopitvene konstante (a_N), ki opisuje mikropolarnost okolice nitroksidnega radikala. Iz tega podatka smo lahko sklepali kako globoko v liposom se je vgradila doksilna skupina pri posamezni spojini. Najgloblje v membrano se je vgradila doksilna skupina pri molekuli **6**, izmed SI-APL pa pri spojini **15**. O največji urejenosti v membranski strukturi liposoma je poročala doksilna skupina pri spojini **9**.

Ker nitroksidi kot paramagnetni centri širijo spektralne črte v NMR spektru, smo nekatere pripravljene nitrokside ter nekaj modelnih nitroksidov pretvori do metiliranih analogov. Tako smo lahko z NMR potrdili strukturo pripravljenega nitroksida, hkrati pa skušali optimizirati reakcijo metiliranja nitroksidov.

Nadalje bi bilo smiselno pripravljene SI-APL **9**, **12**, **15** in **17** testirati na celičnih linijah rakavih celic. Le tako bi dobili prave informacije o protitumornem delovanju sintetiziranih spojin.

LITERATURA

1. Ross, D: *Introduction to Molecular Medicine*. 3rd ed, New York, Springer Science, 2002: 108-110.
2. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7th ed, Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 1199-1266.
3. Ribarič, S [ured.]: *Temelji Patološke Fiziologije*. 2. izdaja, Ljubljana, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, 2011: 113-124.
4. Patrick G: *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 3rd ed, New York: Oxford University Press Inc., 2005: 489-498.
5. Danker K, Reutter W, Semini G: Glycosidated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane. *British Journal of Pharmacology*. 2010; 160: 36-47.
6. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. 1. izdaja, Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo, 2007: 567-576.
7. Mollinedo F, Gajate C, Martin-Santamaria C, Gago F: ET-18-OCH₃ (Edelfosine): A Selective Antitumor Lipid Targeting Apoptosis Through Intracellular Activation of Fas/CD95 Death Receptor. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11: 3163-3184.
8. Pike, LJ: Lipid Rafts: Bringing order to chaos. *The Journal of Lipid Research*. 2003; 44: 655-667.
9. Mravljak, J: *Interakcije spinsko označenih derivatov perifosina in miltefosina z modelnimi in celičnimi membranami; Doktorska disertacija*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
10. van Blitterswijk WJ, Verheij M: Anticancer Alkylphospholipids: Mechanism of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects. *Curr. Pharm. des.* 2008; 11: 2061-2074.
11. Koklic T, Podlipec R, Mravljak J, Garvas M, Šentjerc M, Zeisig R: Interaction of Alkylphospholipid Formulations with Breast Cancer Cells in the Context of Anticancer Drug Development. *InTechOpen*. 2011.

12. Jiménez-López JM, Ríos-Marco P, Marco C, Segovia JL, Carrasco MP: Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:33.
13. Carrasco MP, Jimenez-Lopez JM, Rios-Marco P, Segovia JL, Marco C: Disruption of cellular cholesterol transport and homeostasis as a novel mechanism of action of membrane-targeted alkylphospholipid analogues. *British Journal of Pharmacology.* 2010; 160: 355-366.
14. Podlipec R, Koklic T, Štrancar J, Mravljak J, Šentjurc M: Influence of cancerostatic perifosine on membrane fluidity of liposomes and different cell lines as measured by electron paramagnetic resonance. *Madical Reserch in Biophysicy.* 2012; 53: 558-567.
15. Fei H, Chen G, Wang J, Wang F: Perfosine induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines by blockade of Akt phosphorylation. *Cytotechnology.* 2010;62: 449-460.
16. Gills JJ, Dennis PA: Perifosine: Update on a Novel Akt Inhibitor. *Current Oncology Reports.* 2009; 11: 102-110.
17. Mravljak J, Zeisig R, Pečar S: Synthesis and Biological Evaluation of Spin-Labeled Alkylphospholipid Analogs. *J. Med. Chem.* 2005; 48: 6393-6399.
18. http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&id=1384&Itemid=372 (junij 2013).
19. Cho HS, DeFlorio V. Process of preparing ω -hydroxy acids. United States Patent, Patent Number 5502226, date of patent Mar. 26, 1996.
20. Hünig S, Benzing E, Lücke E: Synthesen mit Enaminen, I. Acylierung mit Carbonsäurechloriden. *Chemische Berichte.* 1957; 90: 2833–2840.
21. Metacalfe LD, Schmitz AA: The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 1961; 33 (3): 364–366.
22. Mravljak J, Pečar S: Improved Yields in the Synthesis of Spin-Labeled Fatty Acids. *Synthetic Communications.* 2004; 34 (20): 3763-3771.

23. Noessner G, Kutscher B, Engel J, Schumacher W, Stekar J, Hilgard P: Novi alkini in alkenški fosfati, postopek za njihovo pripravo in njihova uporaba kot zdravilnega sredstva. SI patent, številka patenta: 9 300 365 A, datum patenta julij 7 1993.
24.
<http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/ch22aldehydeskeytonesamines.html> (oktober 2013).
25. Gurdeep, R: *Organic Name Reactions Reagents and Molecular Rearrangements*. 3rd ed., Meerut: Rastogi for KRISHNA Prakashan Media (P), Ltd., 2008: 316-317.
26. McConnell HM, Wayne HL: Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 1971; 93 (2): 314–326.
27. Hauser CR, Swamer FW, Ringler BI: Alkaline Cleavage of Unsymmetrical β -Diketones. Ring Opening of Acylcyclohexanones to Form ϵ -Acyl Caproic Acids¹. *J. Am. Chem. Soc.* 1948; 70 (12): 4023–4026.
28. Christie, WW: Preparation of Ester Derivates of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. *Advances in Lipid Methodology - Two*. 1993: 69-101.
29. Požgan F, Štefane B: *Uvod v laboratorijsko organsko kemijo*. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2009: 133-135.
30. Hodgson JL, Namazian M, Bottle SE, Coote ML: One-Electron Oxidation and Reduction Potentials of Nitroxide Antioxidants: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry*. 2007; 111 (51): 13595-13605.
31.
http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Ester_to_Alcohol/Ester_to_Alcohol_LiAlH4_Mech.htm (september 2013).
32. Tišler, M: *Organska kemija*. 3. izdaja: Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1991: 121-149.
33. Bottle SE, Fairfull-Smith K: The Synthesis and Physical Properties of Novel Polyaromatic Profluorescent Isoindoline Nitroxide Probes. *European Journal of Organic Chemistry*. 2008; 32: 5391-5400.

34. Fenton, HJH: Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894; 65: 899-910.
35. Yapici NB, Jockusch S, Moscatelli A, Rao Mandalapu S, Itagaki Y, Bates DK, Wiseman S, Gibson MK, Turro, NJ, Bi L: New Rhodamine Nitroxide Based Fluorescent Probes for Intracellular Hydroxyl Radical Identification in Living Cells. *Organic Letters*. 2012; 14(1): 50-53.
36. Mravljak J, Konc J, Hodošček M, Šolmajer T, Pečar S: Spin-Labeled Alkylphospholipids in a Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer: Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B*. 2006; 110: 25559-25561.