

Sinteza novih derivata kumarina i L-askorbinske kiseline primjenom klik kemije

Kovačić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:842777>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Kovačić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Kovačić

*Sinteza novih derivata kumarina i L-askorbinske kiseline primjenom klik kemije /
Synthesis of novel coumarin and L-ascorbic acid derivatives using click
chemistry*

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Silvana Raić Malić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
2. dr. sc. Andrijana Meščić
3. prof. dr. sc. Sandra Babić

Zagreb, srpanj 2015.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na spremnosti da mi bude mentor, pruženom povjerenju, vodstvu, stručnim savjetima i pomoći tokom izrade ovog rada. Hvala na prenesenom znanju tokom čitavog studija, na susretljivosti i strpljivosti.

Posebna zahvala asistentici dr. sc. Andrijani Meščić, na stručnom vodstvu, edukaciji, motiviranju, susretljivosti, te brojnim korisnim savjetima bez kojih izrada ovog diplomskog rada ne bi bila moguća.

Hvala svim djelatnicima i kolegama studentima Zavoda za organsku kemiju. Uz pozitivnu i kolegijalnu atmosferu sve se čini lakše. ☺

Na kraju želim zahvaliti svojim roditeljima i prijateljima koji su mi pružali stalnu podršku u mom školovanju, kao i u cijelom životu.

SAŽETAK RADA

Sinteza novih derivata kumarina i L-askorbinske kiseline primjenom klik kemije

Cilj ovog rada bila je sinteza novih potencijalno biološki aktivnih derivata kumarina i derivata L-askorbinske kiseline regioselektivnom 1,3-dipolarnom cikloadicijom odgovarajućih terminalnih alkina i organskih azida. U tu svrhu je Pechmannovom ciklizacijom sintetiziran 7-hidroksi-4-(klormetil)kumarin **1**, koji je potom preveden u odgovarajući kumarinski azid **2**, te derivati L-askorbinske kiseline **3**, **4** i **5** koji su bili potrebni za sintezu azida L-askorbinske kiseline **6**. Također, sintetizirani su različiti terminalni alkini (**7** – **13**) koji su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sa spojevima **2** i **6**. Provedene su reakcije Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom 4-(azidometil)-7-hidroksikumarina i 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline s odgovarajućim terminalnim alkinima. U tim su reakcijama sintetizirani derivati s 1,2,3-triazolnim supstituentom vezanim u položaju C-4 7-hidroksikumarina i C-6 2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline (**14** – **23**). Ovakve reakcije udovoljile su većini uvjeta „klik“ reakcije.

Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su spektroskopijom ^1H - i ^{13}C -NMR.

Provedena su ispitivanja antibakterijskog djelovanja spojeva **14** – **19** i **21** na osam bakterijskih vrsta (četiri Gram-pozitivne i četiri Gram-negativne bakterijske vrste). Spojevi **15**, **16** i **18** pokazuju učinkovita djelovanja na Gram-pozitivne bakterijske vrste: *Enterococcus faecali* i *Enterococcus faecium* (VRE) te pokazuju bolju učinkovitost od antibiotika ceftazidim (CAZ) na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecali*, te su učinkovitiji od oba ispitana antibiotika na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecium* (VRE).

Ključne riječi: molekularni hibridi, kumarini, L-askorbinska kiselina, 1,2,3-triazoli, „klik“ kemija, Huisgenova cikloadicija

SUMMARY

Synthesis of novel coumarin and L-ascorbic acid derivatives using click chemistry

The aim of this work was the synthesis of novel coumarin and L-ascorbic acid derivatives with potential biological activity, using regioselective 1,3-dipolar cycloaddition of terminal alkynes and corresponding organic azides. For this purpose, 4-(Chloromethyl)-7-hydroxycoumarin **1** was synthesized and then converted to the corresponding azide **2**. Furthermore, L-ascorbic acid derivatives **3**, **4** and **5**, required for the synthesis of L-ascorbic acid azide **6**, were prepared. Different terminal alkynes (**7 – 13**), which are used as the dipolarophile in the 1,3-dipolar cycloaddition with compounds **2** and **6**, were synthesized. A series of copper catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reactions of 4-(azidomethyl)-7-hydroxycoumarin and 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzyl-L-ascorbic acid with various terminal alkynes were performed. In these reactions derivatives with 1,2,3-triazole substituent attached at C-4 position of the C-7- hydroxycoumarin and C-6position of 2,3-*O,O*-dibenzyl-L-ascorbic acid were synthesized (**14 – 23**). This type of reaction fulfills majority of requirements for „click“ chemistry reaction.

The structures of all synthesized compounds were confirmed by ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy.

The anti-bacterial activity of the synthesized compounds **14 – 19** and **21** were performed *in vitro* against four Gram-positive bacterial species and four Gram-negative bacterial species. The MIC determination of the tested compounds was investigated in comparison with Ceftazidime and Ciprofloxacin. Compounds **15**, **16** and **18** showed anti-bacterial activity which was higher than Ceftazidime against Gram-negative bacterial specie: *Enterococcus faecali* and these compounds also showed anti-bacterial activity which was higher than Ceftazidime and Ciprofloxacin against Gram-negative bacterial species: *Enterococcus faecium* (VRE).

Keywords: molecular hybrids, coumarin, L-ascorbic acid, 1,2,3-triazoles, „click“ chemistry, Huisgen cycloaddition

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	4
2.1. Kumarini	5
2.1.1. Biološka aktivnost kumarina i derivata kumarina	6
2.2. Molekulski hibridi	10
2.2.1. Hibridi kumarina	11
2.2.1.1. Hibridi kumarina i pirazolina s fenilsulfonilnom skupinom	11
2.2.1.2. Hibridi kumarina i stilbena	13
2.2.1.3. Hibridi kumarina i benzimidazola	15
2.2.1.4. Hibridi kumarina i kalkona	17
2.2.1.5. Hibridi kumarina i manosterola	18
2.3. 1,2,3-triazoli	20
2.3.1. Biološka aktivnost triazola	20
2.3.2. Kumarinski derivati triazola	22
2.4. L-askorbinska kiselina	23
2.4.1. Biološka aktivnost L-askorbinske kiseline.....	24
2.5. Klik kemija.....	25
2.5.1. Huisgenova cikloadicija.....	25
2.5.2. Azid-alkin cikloadicija katalizirana Cu(I)	27
2.5.2.1. Mehanizam azid alkin cikloadicije katalizirane Cu(I)	27

3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. Opće napomene	30
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva	31
3.3. Priprave spojeva.....	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. Sinteze spojeva	47
4.2. Analiza spektara ¹ H-NMR.....	54
4.3. Ispitivanje antibakterijskog djelovanja <i>in vitro</i>	57
5. ZAKLJUČCI	59
6. LITERATURA	62
7. ŽIVOTOPIS	66

1. UVOD

Rak je bolest u kojoj stanica ili više stanica izgube kontrolu nad dijeljenjem, što rezultira nakupinom stanica poznatom kako tumor. Tumor je abnormalna masa tkiva koja nastaje zbog stanja u kojem se poremete kontrolni mehanizmi koji reguliraju rast stanice što dovodi do nekontroliranog dijeljenja i proliferacije stanica te je jedan od glavnih zdravstvenih problema današnjice. Tijekom godina postignut je značajan napredak u razvoju novih lijekova, terapije su postale naprednije te olakšavaju i produžuju život pacijentima.¹ Usprkos napredcima moderne medicine, liječenje mnogih vrsta tumora ostaje problematično. Do sada su uspješno korištene terapije koje djeluju na jednu biološku molekulu. Ipak postoji problem rezistencije na lijekove i uvriježeno je da agensi koji djeluju na više meta imaju bolju učinkovitost od onih koji djeluju na samo jednu. Takva opća uvjerenja su dovela do potrage za moduliranjem molekula koje će djelovati na više meta. Djelovanje na više meta simultano se može postići kombinacijom lijekova s različitim mehanizmima djelovanja ili jednim kemijskim spojem koji može djelovati na više meta multifaktorske bolesti. Kao rezultat toga, postoji veliki interes u otkrivanju agenasa za liječenje raka, koji istovremeno djeluju na više bioloških meta.

Kombinirana terapija, jedna od strategija za liječenje pacijenata koji ne reagiraju na tretman, je dodatno potaknula istraživače na globalnoj razini na dizajn liganada koji sadrže dvije farmakoforne jedinice u jednoj molekuli, te koje djeluju na više meta, upravo zbog problema povezanih s kombiniranom terapijom. Molekulska hibridizacija je strategija racionalnog dizajna liganada ili prototipova, koja se temelji na prepoznavanju farmakofornih podjedinica u molekularnoj strukturi od dvaju ili više poznatih bioaktivnih derivata. Odgovarajuće povezivanje podjedinica vodi do dizajna novih hibrida koji zadržavaju unaprijed odabrane karakteristike originalnih spojeva. Sinteza novog hibridnog spoja s poboljšanim svojstvima i učinkovitošću u usporedbi s početnim lijekovima, je novi koncept u dizajnu i razvoju lijekova.² Hibridizacija farmakofornih jedinica je analogna konvencionalnoj kombiniranoj terapiji, uz iznimku da su dva lijeka kovalentno povezana i na raspolaganju kao jedna cjelina. Hibridni lijekovi su u osnovi dizajnirani kako bi se povećao učinak i omogućilo djelovanje na više meta kao jedna molekula, smanjujući tako rizik od interakcije lijekova i pojave rezistencije.³

Jedna od reakcija povezivanja biomolekula je Cu(I) katalizirana Hisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija u kojoj reakcijom azida i terminalnih alkina nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. Ova reakcija je posebna zbog svoje regiospecifičnosti, biokompatibilnosti

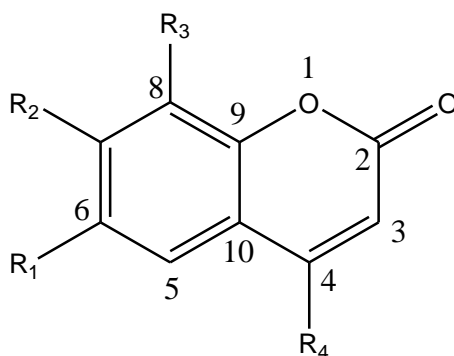
reaktanata i visokih iskorištenja. Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija je primjer „klik“ reakcije koja ima široku primjenu.⁴

Konačno, u zadnjih nekoliko godina se sve više razvijaju kumarinski derivati konjugirani s 1,2,3-triazolima koji pokazuju široku biološku aktivnost, a sintetizirani derivati L-askorbinske kiseline konjugirani s 1,2,3-triazolima su vrlo obećavajući. Askorbinska kiselina je esencijalni mikronutrijent te se smatra da ima antioksidativno djelovanje u živim sustavima⁵ te se smatra važnom u prevenciji različitih kroničnih bolesti kao što su rak, cerebralna apopleksija, dijabetes, atopijski dermatitis, infarkt miokarda i AIDS.⁶ S druge strane 1,2,3-triazoli također pokazuju mnoga biološka svojstva kao što su antimikrobiološka, analgetska, antimalarijska i antivirusna aktivnost, te su neki od njih pokazali antiproliferacijsku i antitumorsku aktivnost.⁷

2. OPĆI DIO

2.1. Kumarini

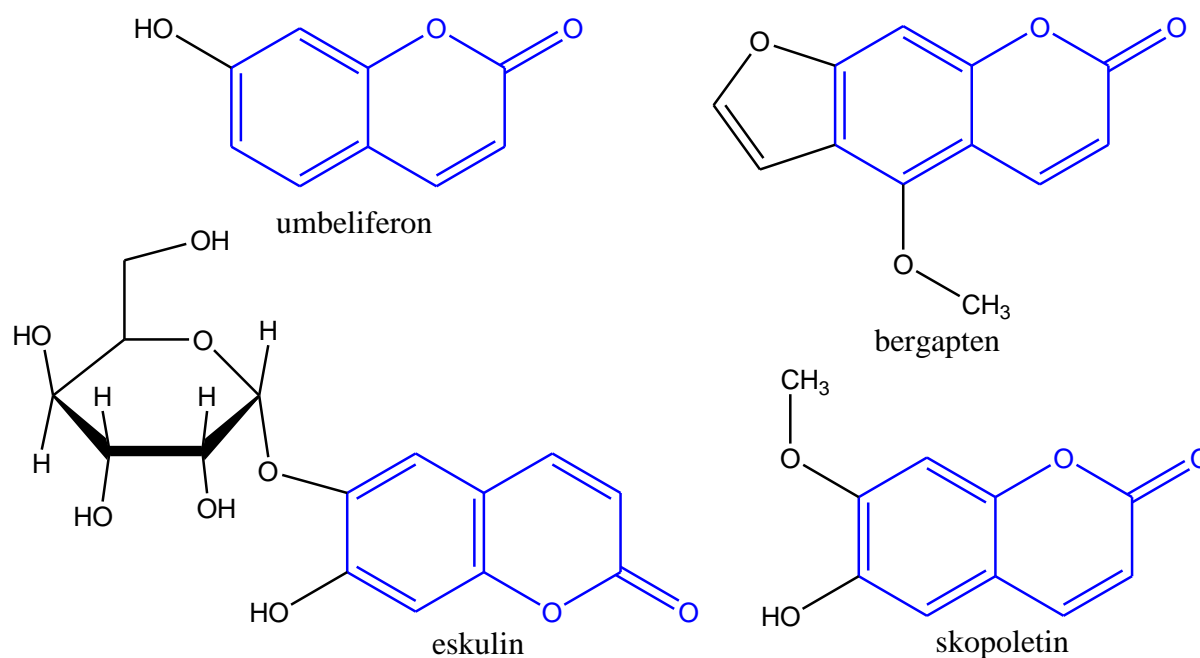
Kumarini su heterociklički spojevi koji u svojoj strukturi kao heteroatome sadrže atome kisika (Slika 1). Kumarin je 5,6-benzo-2-piron, te se njegovi derivati nalaze u brojnim biljnim vrstama, a pronađeni su i u produktima metabolizma mikroorganizama i životinja. Značajne koncentracije kumarinskih spojeva se mogu naći u voću. Najviše u marelicama, višnjama, jagodama, te začinskim biljkama kao što su cimet i lavanda. Proučavanje kumarina započelo je prije 200 godina, a prvi put kumarin je izoliran iz biljke *Coumarouna odorata Aube (Dipteryx odorata)* 1820. g., po kojoj je i dobio ime.⁸ Kumarine u prirodi nalazimo kao slobodne ili u obliku heterozida. Kumarin je poznat po ugodnom mirisu na vaniliju, koji neki autori opisuju i kao miris svježeg pokošenog sijena. S obzirom da na kumarinskom prstenu postoji 6 položaja na kojima se može odviti supstitucija, poznati su različiti derivati kumarina, bilo sintetički ili prirodni, a takva strukturalna raznolikost uzrok je mnoštvu različitih bioloških aktivnosti. Prisutnost kumarinskih derivata u biljkama je vrlo česta, a mnoge od tih biljaka se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini od davnina.⁹



Slika 1. Struktura kumarina

Proizvodnja kumarina počela je 1868. godine kada su se prvi put počeli koristiti u industriji parfema i pojačivača okusa. Biosinteza kumarina u biljkama kreće od cimetne kiseline koja se ciklizacijom prevodi u kumarinsku strukturu. U laboratoriju se koriste mnoge sintetičke metode, a među njima Perkinova, Knoevenagelova i Pechmannova reakcija.¹⁰ Zagrijavanjem kumarina nastaju dikumaroli koji su jaki antikoagulansi. Kumarini također imaju snažan utjecaj na biosintezu vitamina K. Pored ovih svojstava, kumarini posjeduju i antibakterijska i antigljivična svojstva. Neki od bitnijih kumarinskih spojeva nađenih u biljnom svijetu prikazani

su na Slici 2. Umbeliferon je kumarin prisutan u aromatičnim biljkama Umbeliferon s izrazitim antigljivičnim svojstvima, eskulin je glikozidni kumarin iz ploda kestena sa vaskularnim terapijskim svojstvima, skopoletin je kumarin iz biljke noni koji regulira krvni pritisak te ima značajna antibakterijska svojstva, regulira hormon serotonin i smanjuje depresiju i anksioznost, dok je bergapten kumarin iz citrusnog voća bergamota koji spada u grupu furokumarina (psoralena) i koristi se kao aktivna komponenta krema i losiona za sunčanje.¹¹

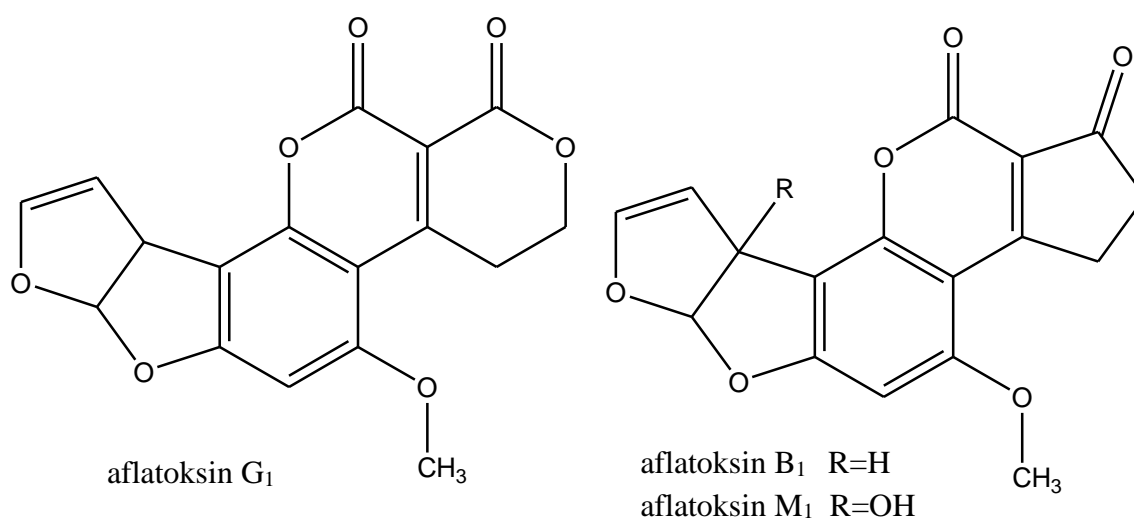


Slika 2. Poznati spojevi kumarinske strukture

2.1.1. Biološka aktivnost kumarina i derivata kumarina

Kumarini pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, uključujući antikoagulacijsku, estrogenu, dermalno fotosenzitirajuću, antimikrobnu, vazodilacijsku, moluskicidnu aktivnost (ubijanje mekušaca), djeluju kao antihelminthici, sedativi i hipnotici, a pokazuju i analgetsko i hipotermičko djelovanje. Ostale biološke aktivnosti uključuju inhibiciju agregacije krvnih pločica, citokroma P450 i steroidne 5α -reduktaze, spazmolitičku, antikoagulacijsku, antibakterijsku, antikancerogenu i anti HIV aktivnost. Značajna je i prevencija od bolesti, modulacija rasta i antioksidacijska svojstva, kao i antitumorski učinci, dok neki kumarini mogu uzrokovati značajne promjene u regulaciji imunološkog odgovora, rastu stanica i

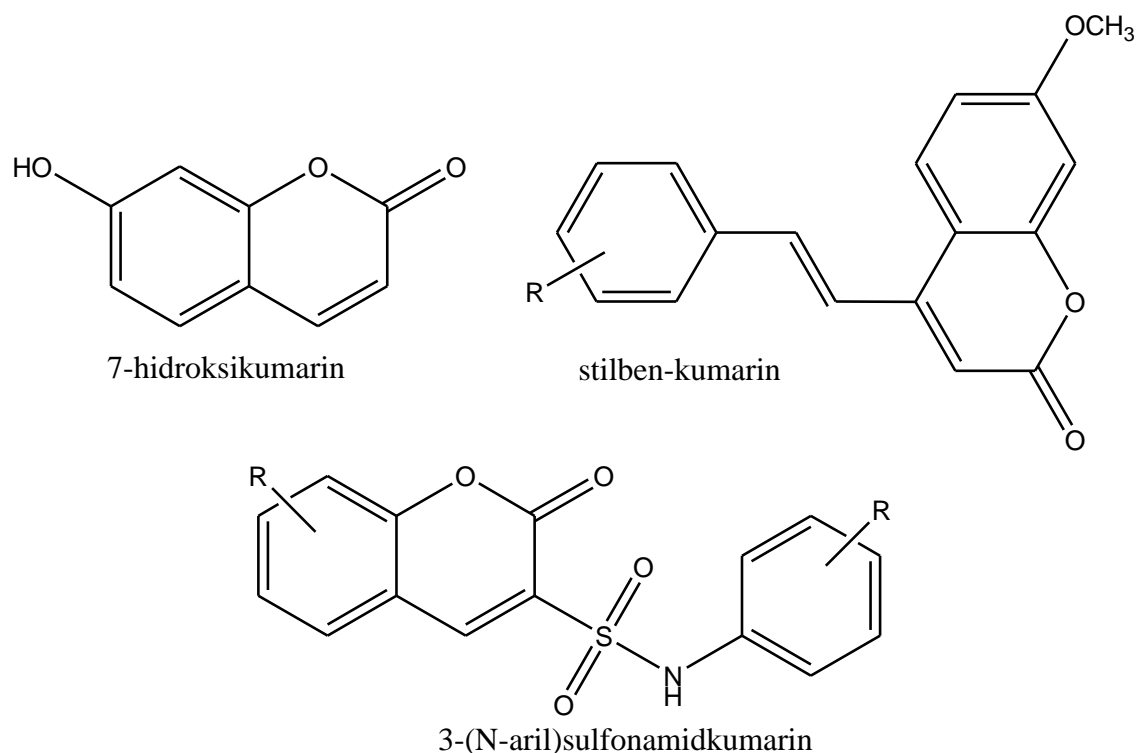
diferencijaciji.¹² Od derivata kumarina najviše se ističu dikumarol s antikoagulacijskim djelovanjem i novobiocin i kumermicin A s antibiotskom aktivnošću te određeni aflatoksini koji pokazuju značajnu hepatotoksičnost i karcinogenost.¹² Aflatoksini su heterociklički spojevi koji sadrže kumarinsku jezgru. Produkti su metabolizma pojedinih rodova plijesni poput *Aspergillus niger*. Fiziološki su vrlo aktivni te je dokazano da djeluju kancerogeno na jetru. Kancerogenost aflatoksina opada od najsnažnijeg aflatoksina B1 prema slabije kancerogenima G1, B2 i M1 (Slika 3).¹³



Slika 3. Aflatoksini

Razna istraživanja su potvrdila da velika većina biljnih ekstrakata koji su se u povijesti koristili u medicinske svrhe sadrži visoke koncentracije kumarina. Kumarin i 7-hidroksikumarin inhibiraju proliferaciju mnoštva staničnih linija porijeklom iz čovjeka *in vitro*, a pokazuju i aktivnost protiv nekoliko životinjskih tumora. Prema istraživanjima, konzumacija namirnica koje sadrže kumarin pruža određenu zaštitu od inicijacije hepatokarcinogeneze uzrokovane aflatoksinom B1 u štakora. Istraživanja o utjecaju kemijske strukture na biološku aktivnost kumarina su pokazale da dodatak kateholne skupine na osnovnu strukturu uzrokuje povećanu citotoksičnu aktivnost na stanice tumora. Kumarin i njegovi metaboliti 7-hidroksikumarin, kumarinski 3-(*N*-aril)sulfonamid, stilben-kumarin (Slika 4) pokazuju antitumorsku aktivnost na nekoliko linija stanica tumora kod ljudi, pokazali su se kao

inhibitori stanične proliferacije kod stanica želučanog karcinoma, a već je dokazana aktivnost kumarina protiv raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma.¹² Osim što se mogu koristiti u liječenju raka, kumarini se mogu koristiti i u tretmanima ublažavanja nuspojava izazvanih radioterapijom.¹⁴

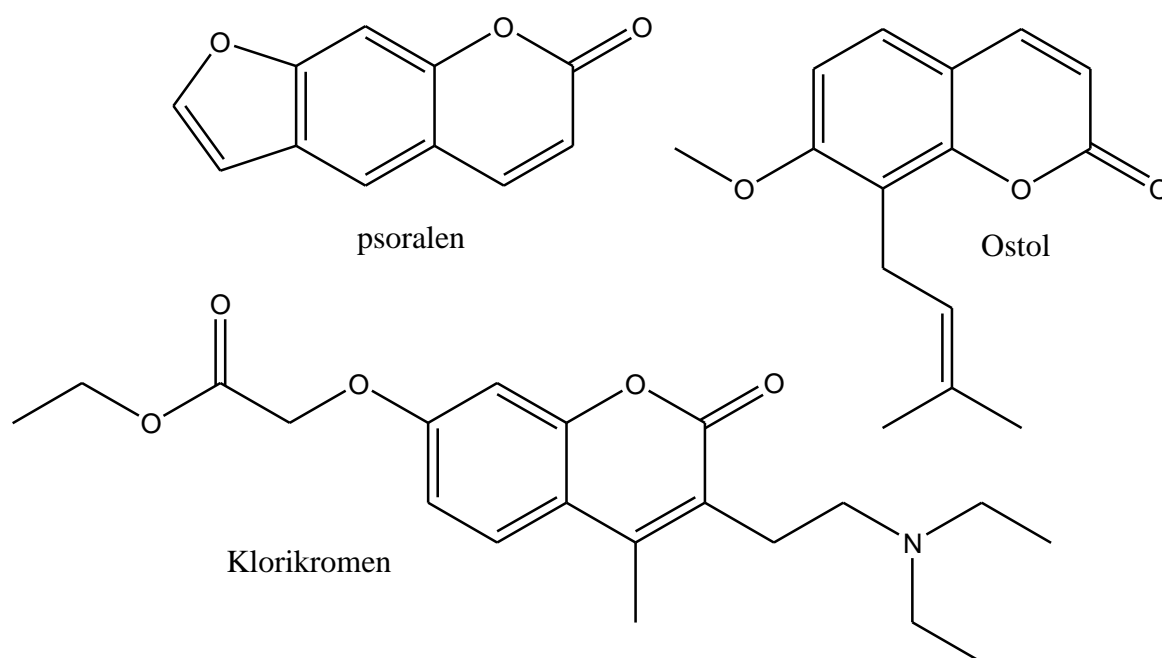


Slika 4. Kumarini s antitumorskim djelovanjem

Istraživanja su pokazala da kumarin smanjuje razinu glukoze u krvi te ne samo da inducira izoenzim aldo-ketoreduktaze (aflatoksin B1-aldehid reduktaza) koji sudjeluje u metabolizmu aflatoksina, nego i GSTA5 (glutation S-transferaza alfa 5) i druge enzime koji metaboliziraju lijekove.¹²

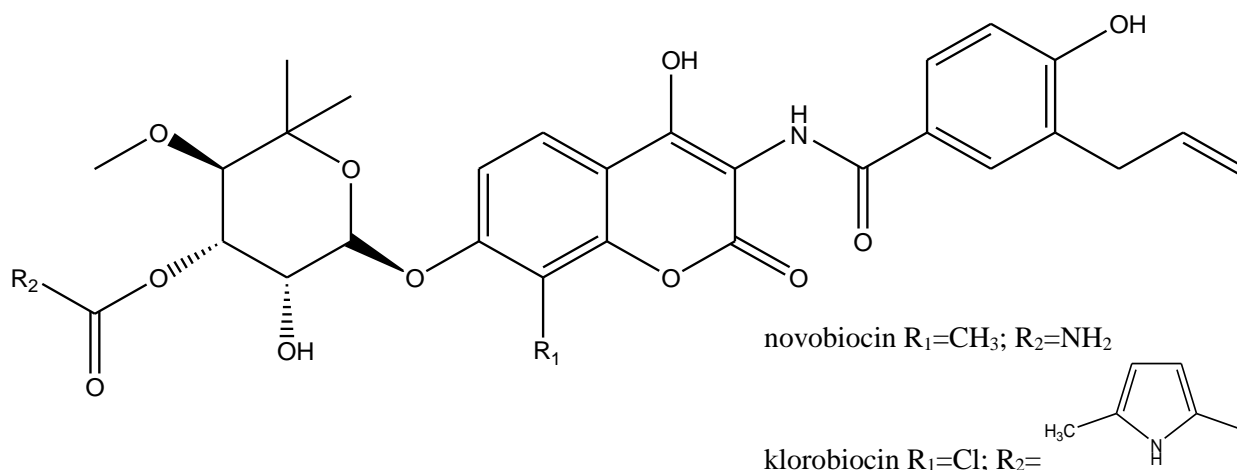
Ostol inhibira agregaciju krvnih pločica, dok klorikromen (sintetički kumarin) inhibira agregaciju *in vivo* i *in vitro*, i izaziva vazodilataciju. Ostol sprečava progresiju hepatitisa C u hepatokarcinomu kod ljudi, a derivati ostola koji pokazuju topivost u vodi veću nego sam ostol su nedavno predloženi za upotrebu kao hepatoprotektivni lijekovi. Što se tiče biološke aktivnosti ostola, vrlo je važna prisutnost metoksi skupine, jer je npr. 7-hidroksi derivat, ostenol, neaktivan. Kolinin pokazuje negativan učinak na replikaciju DNA virusa hepatitisa B. Određeni dimeri kumarina, osobito oni koji sadrže hidrofobne skupine, potentni su inhibitori HIV-1 integreze, dok 5,7,4'-trihidroksi-4-stiril-kumarin pokazuje značajnu antivirusnu aktivnost prema *Herpes simplex* virusu. Geiparvarin pokazuje značajnu *in vitro* citostatsku aktivnost, a neki

prirodni i sintetički kumarini su inhibitori kolinesteraze, što bi moglo dobro doći u liječenju Alzheimerove, kao i Parkinsonove bolesti. Varfarin je i danas jedno od osnovnih antikoagulirajućih sredstava, iako neki derivati 4-hidroksikumarina posjeduju još veću antikoagulacijsku aktivnost od varfarina. Furanokumarini se koriste u fotokemoterapeutskim tretmanima za neke kožne bolesti, limfome i autoimune poremećaje. Biljke koje sadrže psoralen se stoljećima koriste za tretiranje vitiliga, kožne bolesti koju odlikuje nedostatak pigmentacije. Neki imaju farmakološka svojstva i bez zračenja te su se pokazali djelotvornim u liječenju depresije, a čine se i kao korisni lijekovi u tretmanima multipleskleroze, jer blokiraju kalijeve kanale.



Slika 5. Biološki aktivni kumarinski derivati: ostol, klorikromen i psoralen

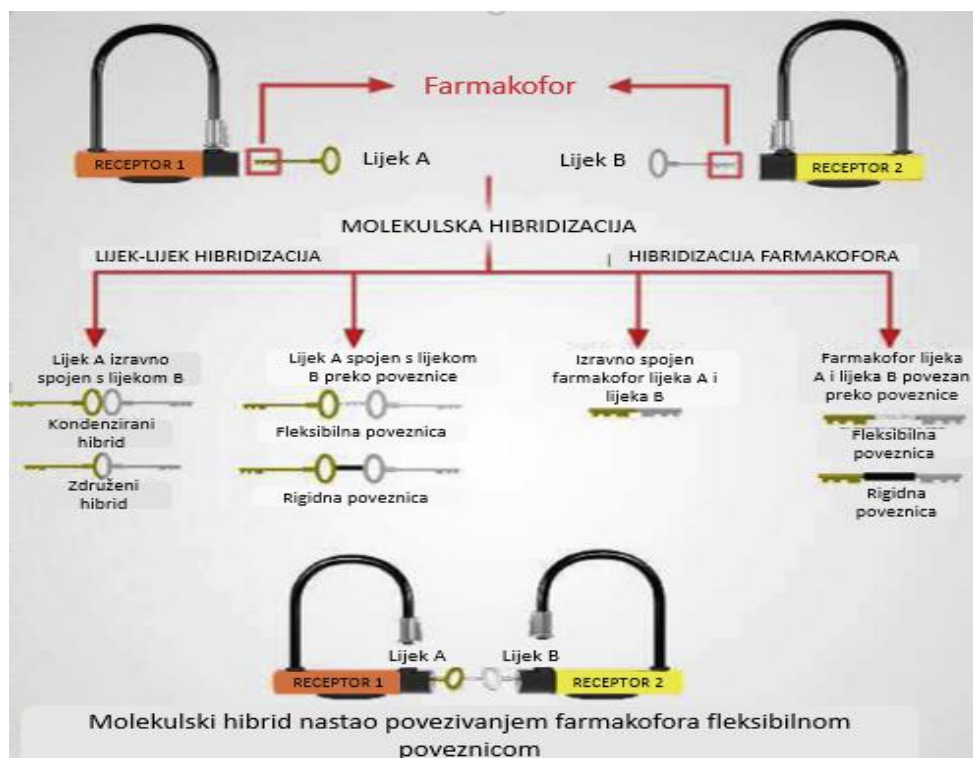
Zasad su neki kumarini, kao varfarin, acenokumarol, armilarizin A, himekromon i karbokromen odobreni za kliničku upotrebu. Eskulin je derivat kumarina koji se koristi u medicini, kao komponenta lijeka Proctosedyla, za tretiranje hemoroida i rektalnih lezija. Novobiocin i klorobiocin (Slika 6) su antibiotici prirodnog porijekla na bazi kumarina koji se ubrajaju u hidroksilirane kumarine, a inhibiraju DNA girazu i pokazuju široki spektar aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama.¹²



Slika 6. Antibiotici prirodnog porijekla na bazi kumarina: novobiocin i klorobiocin

2.2. Molekulski hibridi

Tijekom posljednjih nekoliko godina, molekulska hibridizacija se razvila kao novi pristup za razvoj hibridnih multifunkcionalnih molekula, koji uključuje konglomeraciju dvaju ili više farmakofora u jednu molekulsku cjelinu (Slika 7). Zbog spajanja farmakofora u jednu molekulu, nastali hibridi imaju višestruku biološku aktivnost, modificirani profil selektivnosti, različite ili dvojne načine djelovanja te mogu smanjiti pojavu neželjenih nuspojava. Takve se molekule mogu modificirati tako da imaju povoljna farmakokinetička svojstva i oralnu bioraspoloživost. Koristeći ovaj pristup, već je nekoliko istraživačkih grupa dizajniralo i sintetiziralo mnoge molekulske hibride. Neki istaknuti primjeri takvih molekula su ziprasidone, duloksetin i ladostigil za multifaktorske bolesti središnjeg živčanog sustava te sunitinib i lapatinib za liječenje raka.¹⁵ Ispitani su i prijavljeni mnogi molekulske hibridi za liječenje drugih multifaktorskih bolesti (koje su vrlo promjenjive i raznovrsne, te uključuju više sustava organa i meta) kao što su metabolički poremećaji, malarija, upale, organofosforna trovanja i ishemije. Hibridizacija ili vezanje različitih kumarina s bioaktivnim molekulama kao što su resveratrol, sulfonamidi maleimida, pirazolini, kalkoni, triazoli i α -liponska kiselina, daje nove molekulske hibride koji imaju vazorelaksacijska, antiagregacijska, antitumorska, antimikrobna, antioksidativna te protuupalna svojstva. Stoga, molekulska hibridizacija ima važnu ulogu u razvoju novih molekula za liječenje brojnih multifaktorskih bolesti.¹⁶



Slika 7. Molekulska hibridizacija

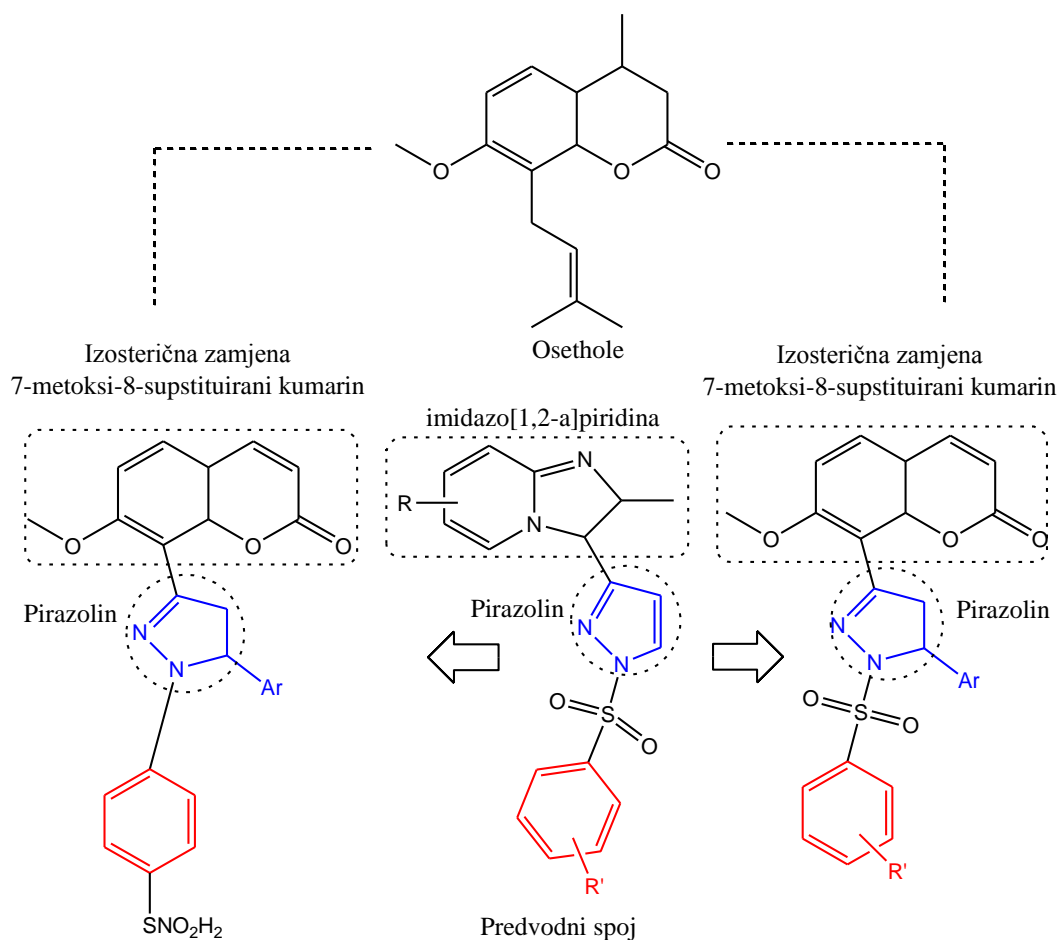
2.2.1. Hibridi kumarina

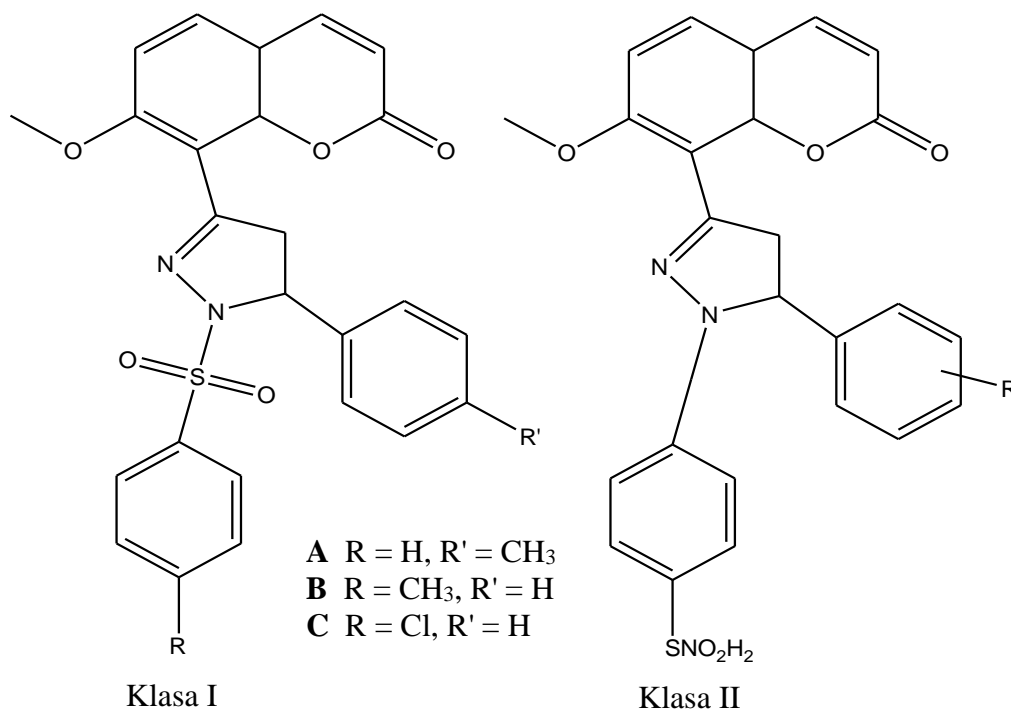
Kumarini spadaju u značajnu klasu spojeva, koja zauzima posebnu ulogu u prirodi. Oni pripadaju klasi flavonoida, koji su sekundarni metaboliti biljaka te pokazuju razne biološke aktivnosti koje su obično povezane s niskom toksičnošću. Prisutnost kumarinske strukture u prirodnim proizvodima i širok raspon primjene u agrokemikalijama, lijekovima i farmaceuticima kao antikancerogeni, anti HIV, antituberkulotici, anti Alzheimer, protuupalni, antivirusni i antimikrobni agensi, ih čini povlaštenim strukturama. Kumarini pokazuju niz bioloških aktivnosti, ali glavni razlog za njihovo uključivanje u okvir hibrida je njihova sposobnost da ubiju stanice raka putem različitih mehanizama.

2.2.1.1. Hibridi kumarina i pirazolina s fenilsulfonilnom skupinom

Amin i suradnici koriste pristup temeljen na hibridizaciji i bioizosterima za dizajn hibrida pirazolina, koji sadrži dva moguća supstitucijska produkta. Kod jednog tipa produkta fenilsulfonilna skupina spaja dvije molekule spoja, dok drugi tip produkta sadrži sulfamoilnu

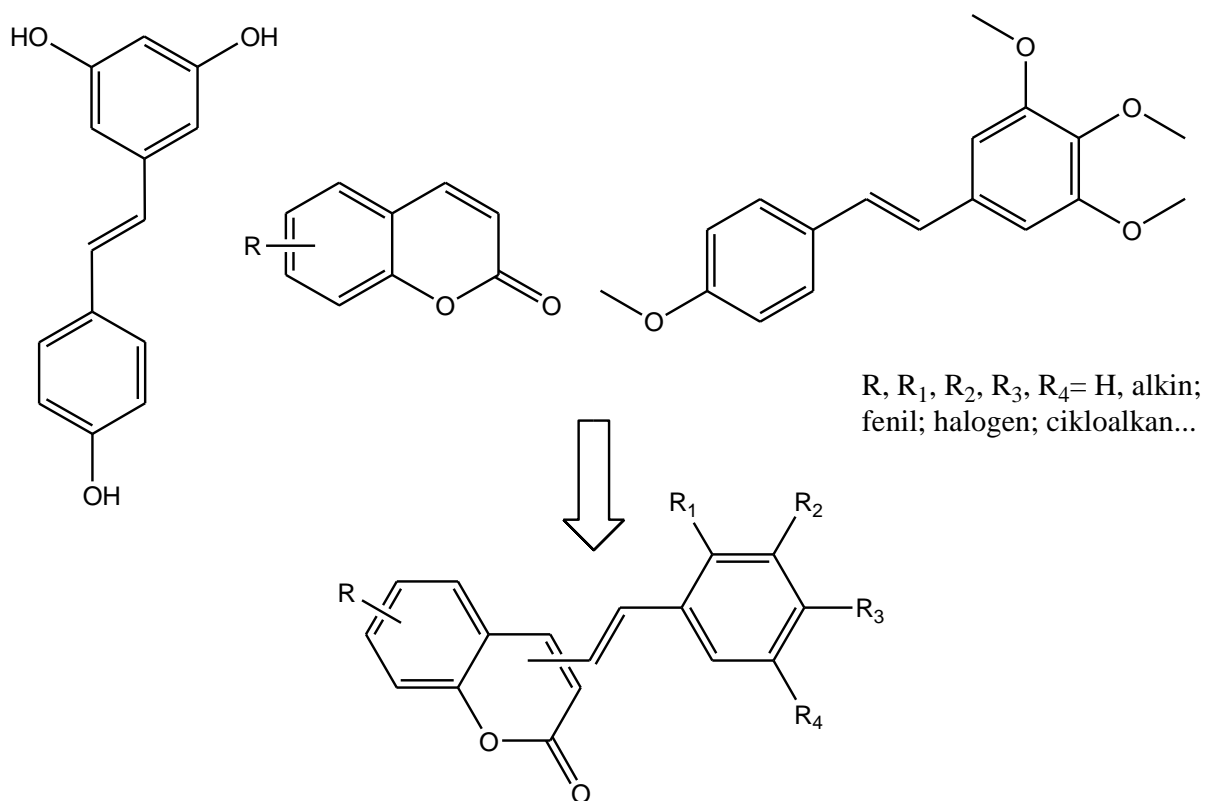
skupinu kao krajnju. Spojevi su dizajnirani putem bioizosteričke zamjene imidazo[1,2-a]piridina s kumarinom (Slika 8). Funkcionalne grupe su odabrane prema određenim kriterijima pa sintetizirane molekule sadrže sljedeće strukturne karakteristike: 7-metoksi-8-supstituirani kumarin koji je odabran zbog prisutnosti u Osethole II, agensu na bazi kumarina koji posjeduje snažnu aktivnost protiv stanica raka pluća, pirazolinski prsten koji pokazuje uspješnost u snažnom selektivnom djelovanju na ljudskim staničnim linijama raka, derivati *N*-fenilsulfonil pirazolina koji imaju inhibitorški potencijal te pokazuju visoku aktivnost protiv ljudskih stanica raka želuca, raka pluća i inhibiciju telomeraze kod staničnih kultura raka prostate. Zatim, jedan od kriterija je i taj, što su u tijeku klinička ispitivanja za nekoliko sulfonamida kao antitumorskih agenasa. Ispitana je antitumorska aktivnost dobivenih hibrida kumarina i pirazolina na 60 staničnih linija raka prema US NCI protokolu. Stanice raka dojke i raka debelog crijeva su najosjetljivije na utjecaj spojeva A, B i C, dok C pokazuje najveću citotoksičnost. Spoj C posjeduje IC_{50} od 0,01 mM protiv raka debelog crijeva što je manje od IC_{50} vrijednost Doksorubicina ($IC_{50} = 0.63$ mM). Nadalje, spojevi Klase I su pokazali bolja citotoksična svojstva od spojeva Klase II (Slika 9).



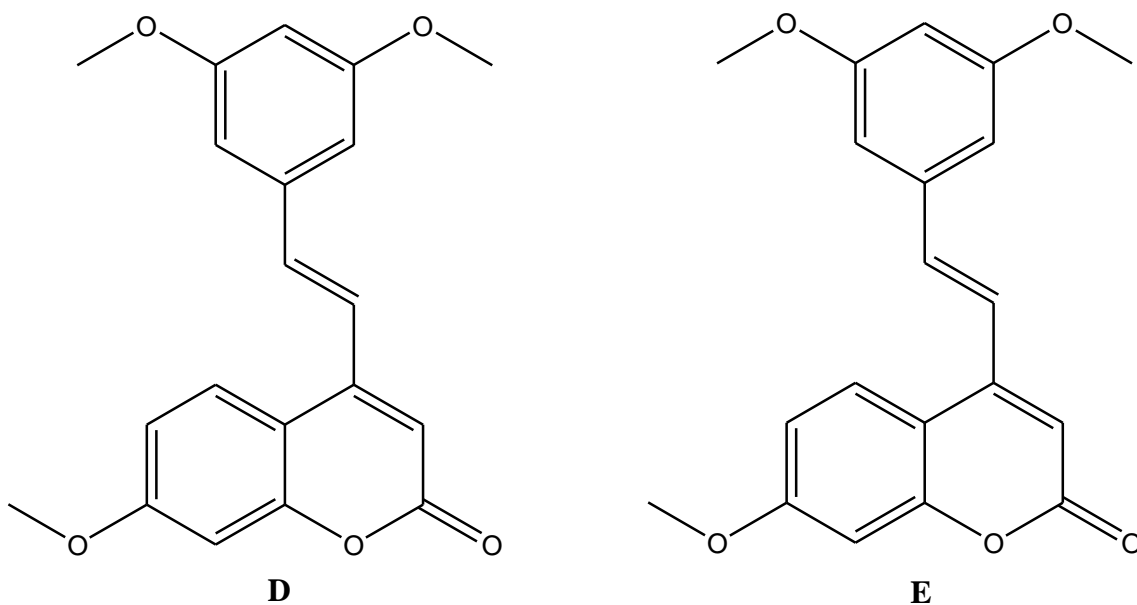
Slika 8. Hibridi kumarina i pirazolina**Slika 9.** Spojevi Klase I i Klase II hibrida kumarina i pirazolina

2.2.1.2. Hibridi kumarina i stilbena

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilben) je prirodni polifenol koji se u velikim količinama pojavljuje u grožđu, te je zbog široke lepeze bioloških aktivnosti privukao pozornost. Proučavanje odnosa strukture i aktivnosti kod analoga resveratrola ukazalo je na utjecaj metoksi skupina na fenilnom prstenu na antitumorsku i proapoptičku aktivnost, stoga je 3,4',5,4'-metoksistilben inhibirao rast tumorskih stanica. To je navelo autore da na kumarinsku okosnicu vežu pravilno supstituiranu *trans*-vinilbenzensku skupinu (Slika 10). Sintetiziranim analogima je ispitana antiproliferacijska aktivnost na stanicama raka pluća. Spojevi D i E (Slika 11) su se pokazali djelotvornima protiv raka pločastih stanica i raka kože, što je detaljno istraženo kako bi se otkrila stanična osnova njihovih antitumorskih svojstava.



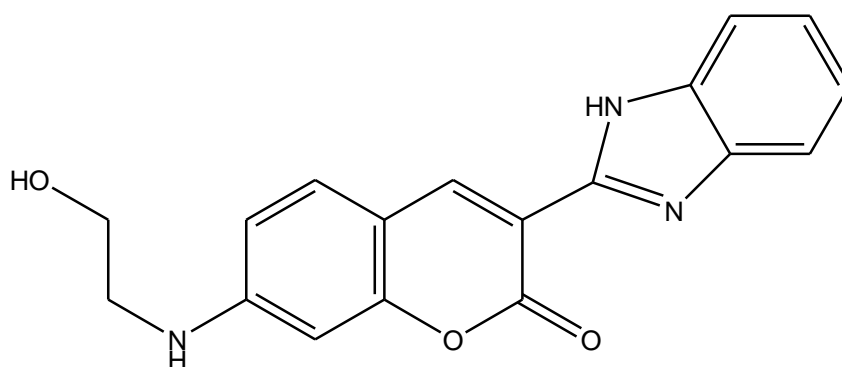
Slika 10. Dizajniranje hibrida kumarina i stilbena



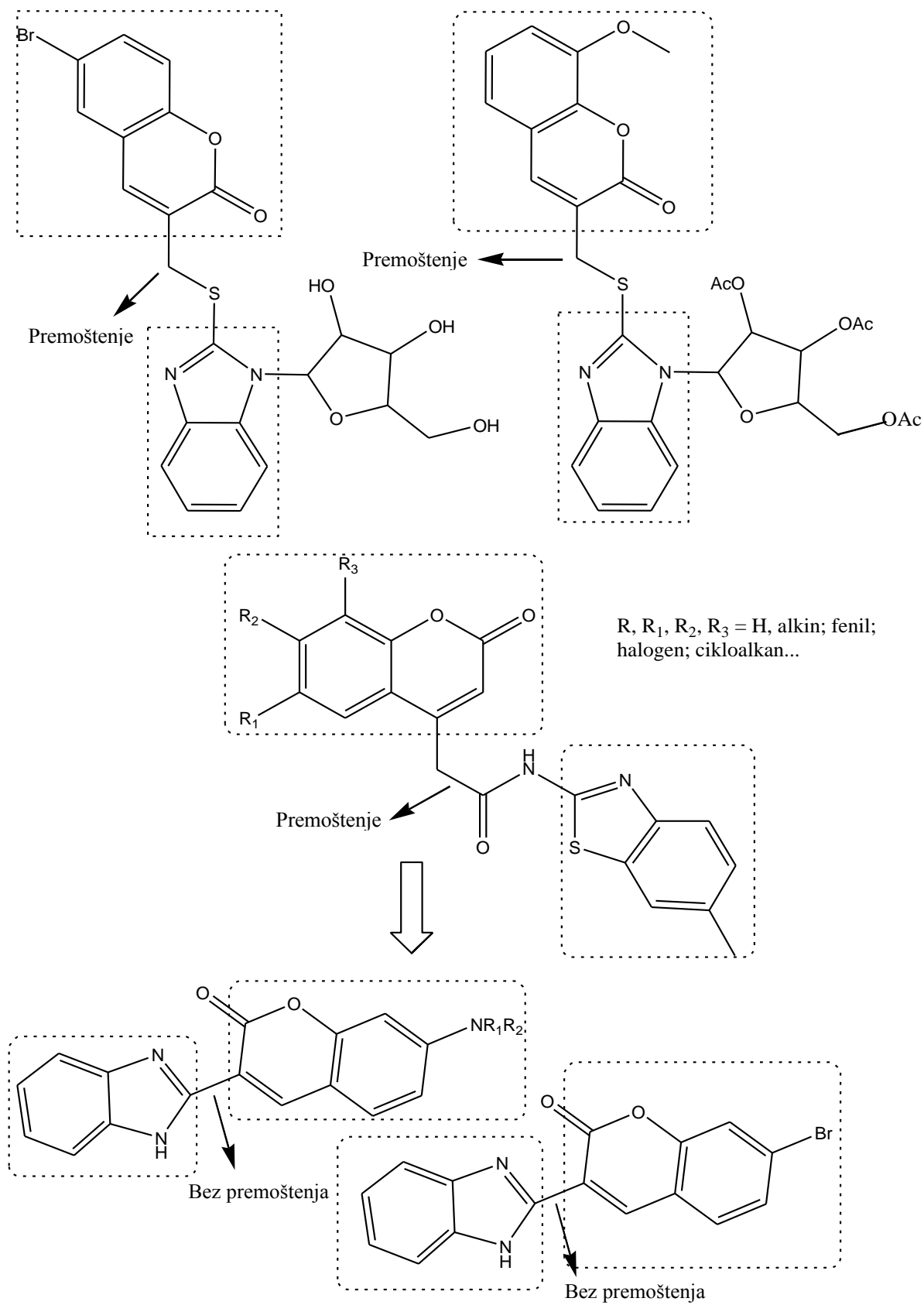
Slika 11. Prikaz spojeva D i E, hibrida kumarina i stilbena

2.2.1.3. Hibridi kumarina i benzimidazola

Benzimidazolna skupina je prisutna u mnogim biološki aktivnim prirodnim spojevima i sintetičkim spojevima, te je njihova potencijalna klinička antitumorska i antivirusna aktivnost dobro istražena. Imajući u vidu dokazani antitumorski potencijal benzimidazola i kumarina, hibridi kumarin-benzimidazola su ranije bili sintetizirani tako što su bili povezani premoštenjem, te je dokazano da posjeduju značajan klinički potencijal kao što su antiangiogenetska i anti HPV aktivnost. Sukladno tim saznanjima su Paul i suradnici dizajnirali i sintetizirali novu seriju spojeva izravnim spajanjem kumarina i benzimidazola, bez premoštenja. (Slika 13). Sintetiziranim spojevima je ispitana antitumorska aktivnost na 60 linija stanica tumora. Spoj F je pokazao značajnu inhibiciju rasta tumorskih stanica (veću nego 5-fluoruracil, u nekim linijama stanica) te značajnu antitumorsku aktivnost protiv staničnih linija leukemije, raka debelog crijeva i raka dojke. Izračun molekulskih svojstava pokazao je da najaktivniji spoj iz serije, spoj F (Slika 12), pokazuje viši TPSA te niži log P i molarnu refraktometriju što ukazuje na to da lipofilnost i molarna refraktometrija molekula nisu ključni faktori za aktivnost, već da za antitumorsku aktivnost spoja F presudnu ulogu ima hidrofilnost. Spoj F se usidri na aktivno mjesto topoizomeraze, ribonukleotid reduktaze i dihidrofolat reduktaze koja sadrži NADPH i folate. Vezanje spoja na aktivna mjesta tih enzima ukazuje na mogući način djelovanja i antitumorsku aktivnost. Eksperimentalni podaci i računalne studije ukazuju da uvođenje etanolamina na poziciju 7 značajno utječe na citotoksični potencijal.



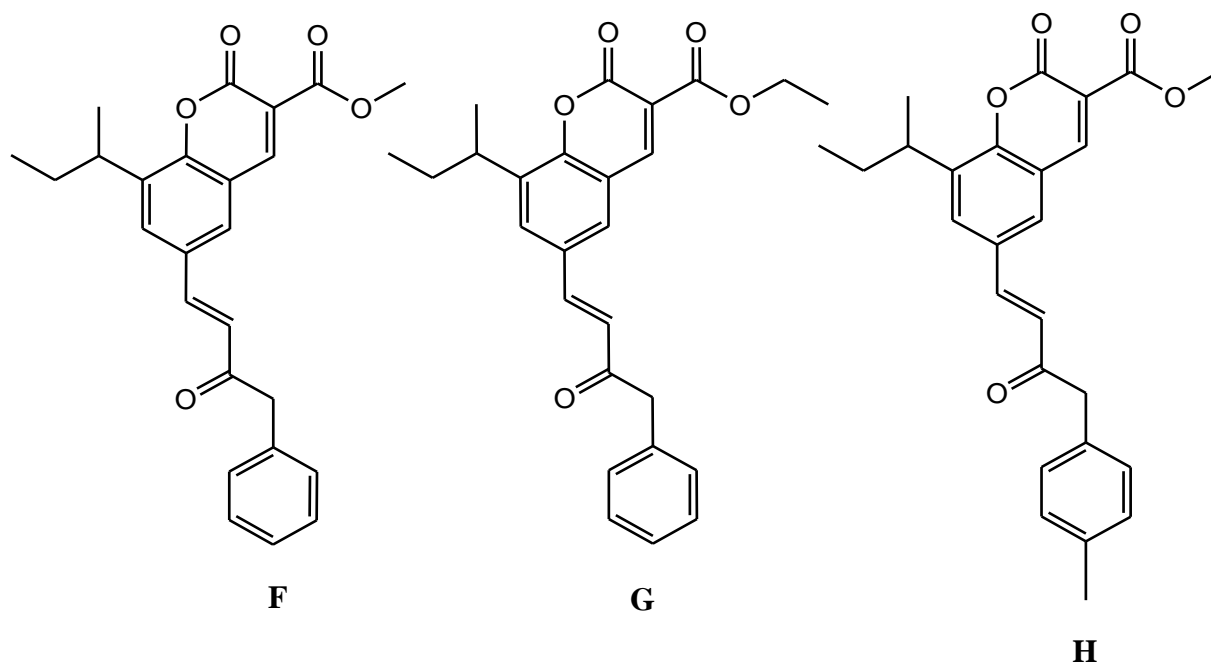
Slika 12. Spoj F, hibrid kumarina i benzimidazola



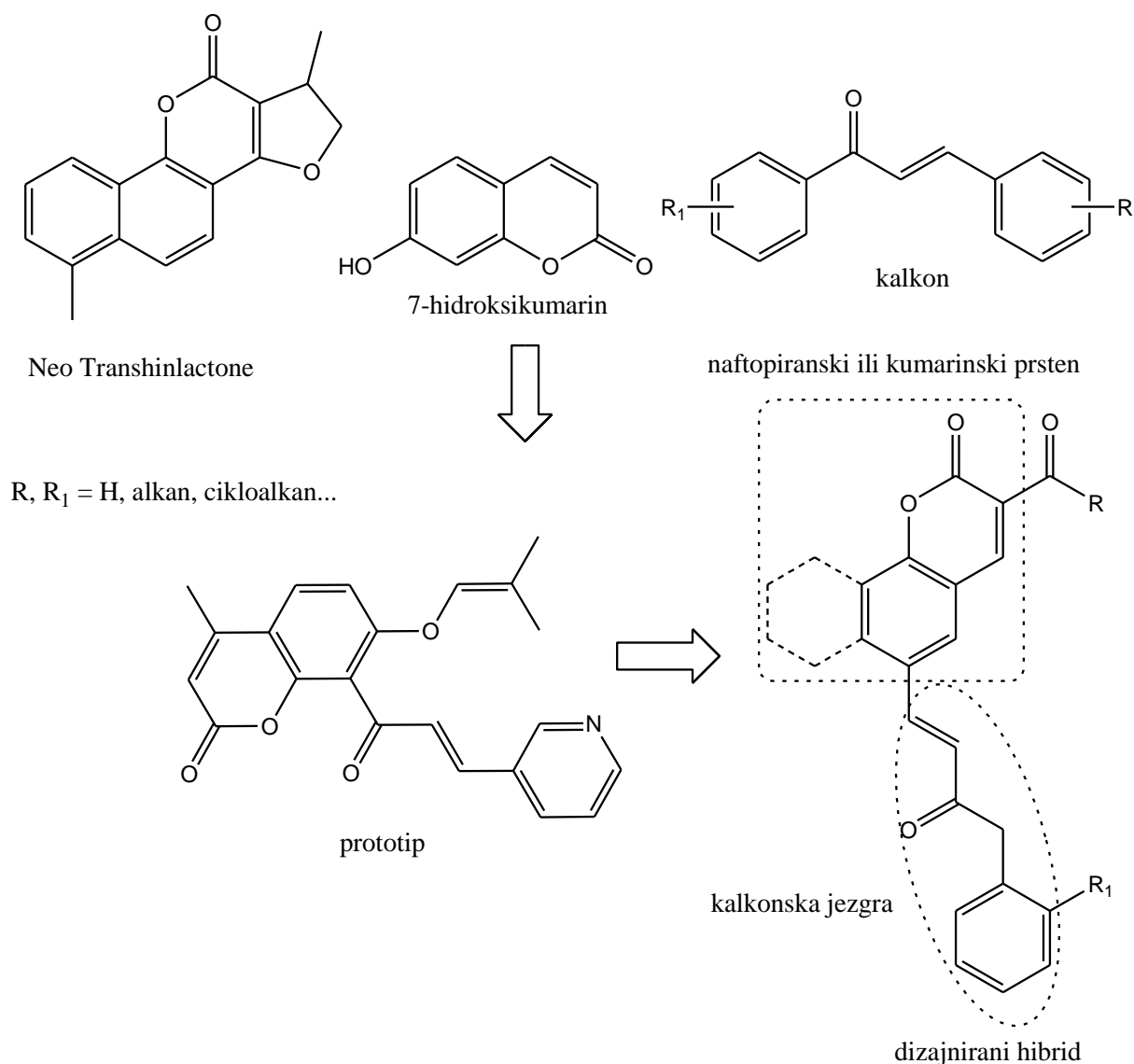
Slika 13. Hibridi kumarina i benzimidazola

2.2.1.4. Hibrid kumarina i kalkona

Sashidhara i suradnici su za dizajn hibrida kumarina i kalkona upotrijebili pristup u kojem mijenjaju sastav farmakofora molekule (Slika 15). Sintetizirane molekule sadrže sljedeće strukturne karakteristike: kalkonsku okosnicu (1,3-diaril-2-propenon) koja posjeduje širok spektar aktivnosti i kumarinsku jezgru ili naftopiranski prsten (strukturna jezgra povezana s inhibitorskim potencijalom linija stanica raka dojke). Sukladno tome i nedavnim saznanjima da su hibridi kumarina i kalkona potencijalni inhibitori tumora, sintetizirano je niz hibrida kumarina i kalokona i ispitana njihova *in vitro* citotoksičnost protiv oralnog tumora skvamoznih stanica, karcinoma grlića maternice, adenokarcinoma dojke, karcinoma pluća i normalnog fibroblasta (fibroblast embrija miša). Spojevi F, G i H (Slika 14) pokazuju raspon IC_{50} od 3,59 do 8,12 mM. Najviše obećava spoj H koji je pokazao 30 puta veću selektivnost prema stanicama karcinoma grlića maternice nego prema stanicama normalnih fibroblasta.



Slika 14. Spojevi F, G i H, hibridi kumarina i kalkona

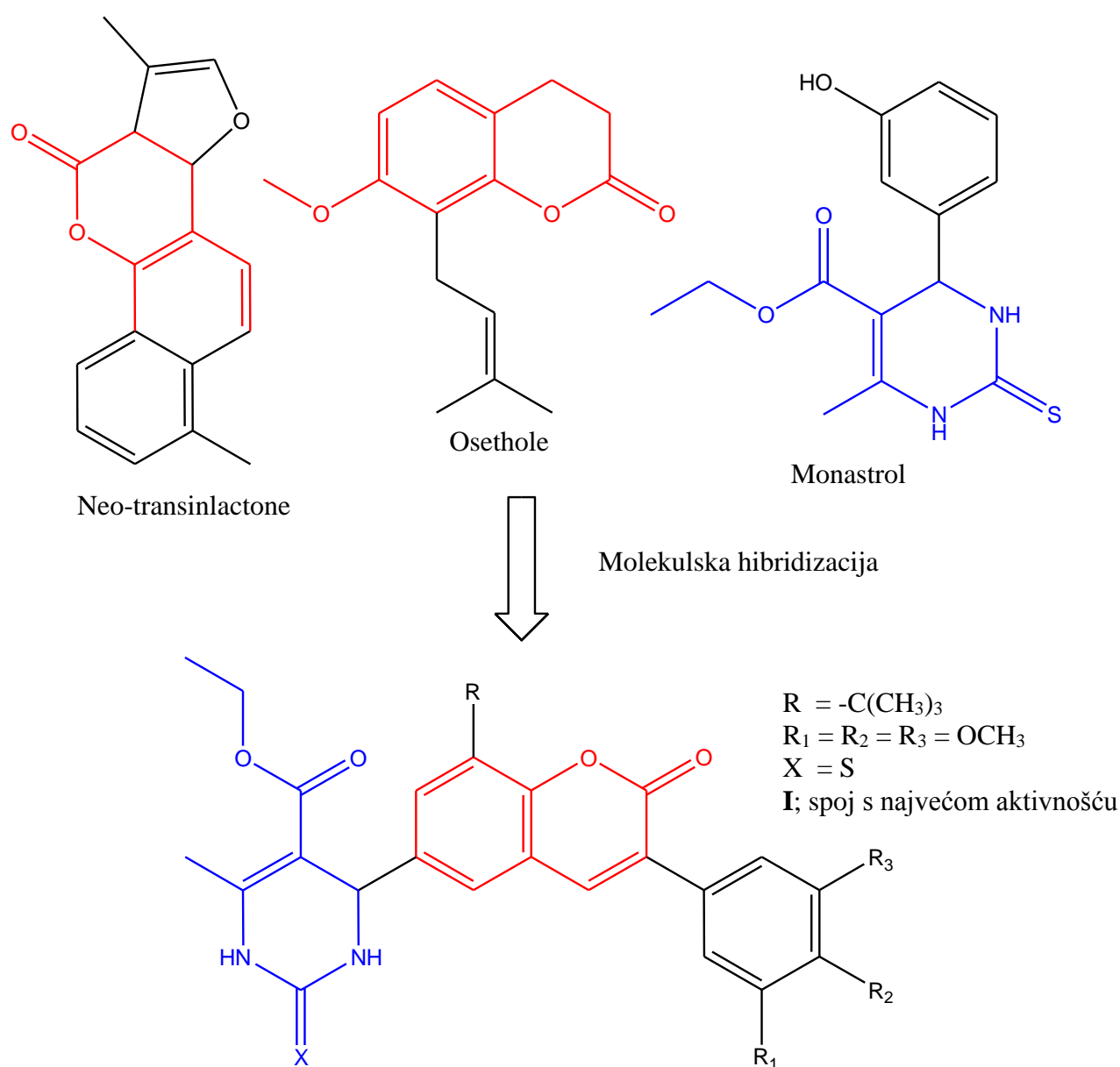


Slika 15. Hibridi kumarina i kalkona

2.2.1.5. Hibridi kumarina i manosterola

S obzirom na činjenice da je rak dojke jedan od vodećih uzroka smrti od raka u žena, zbog rezistencije prema najčešće korištenom antiestrogenom agensu tamoksifenu, koji je neuspješna kombinacija terapije koja uključuje tamoksifen i druge citotoksične agense, te zbog potrage za novim i potencijalnim antitumorskim agensima s novim mehanizmom djelovanja, Sashidara i suradnici su otkrili novu grupu hibrida kumarina i monastrola koji selektivno induciraju apoptozu u primarnim i metastaziranim linijama stanica raka dojke. Odabir

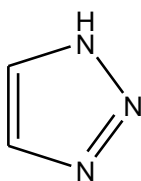
funkcionalnih skupina za dizajn hibrida je određen na temelju obećavajućih rezultata neo-tanshinlaktona koji ima 10 puta veći potencijal te ima 20 puta veću selektivnu inhibitornu aktivnost na dvije ER linije stanica raka dojke nego tamoksifen, te na temelju identifikacije monastrola kao nove molekule koja ulazi u stanicu te zaustavlja mitozu blokiranjem bipolarnog diobenog vretena u linijama stanica raka kod sisavaca. Dobivenim hybridima je ispitana *in vitro* antitumorska aktivnost protiv tumorskih i netumorskih stanica. Za ispitivanje su korištene linije stanica raka dojke, linije stanica raka pluća, linije stanica raka prostate, linije stanica raka jetre (hepatocelularni karcinom) te netumorske stanice. Među sintetiziranim hybridima spoj I (Slika 16) značajno inhibira proliferaciju stanica raka dojke.¹⁵



Slika 16. Hibridi kumarina i manosterola

2.3. 1,2,3-triazoli

1,2,3-triazoli su organski aromatski heterociklički spojevi s tri dušikova atoma u položajima 1, 2 i 3 (Slika 17). Svi atomi koji sačinjavaju peteročlani prsten su sp^2 hibridizirani, te je 6 elektrona delokalizirano u π molekulske orbitale.^{17,18} 1,2,3-triazoli su slabe baze, te podliježu reakcijama s elektrofilnim reagensima. Mogu se ponašati kao donori ili akceptori vodika, ovisno o njihovoj supstituiranosti.¹⁹ 1,2,3-triazolni prsten ima vrlo povoljna fizikalno kemijska svojstva, te može stvarati π - π interakcije s aromatskim prstenovima, kao što je benzenski prsten. Triazolni prsten posjeduje i dipolni moment (5,2 – 5,6 Debye). Dva atoma dušika N-2 i N-3 u strukturi triazola mogu formirati vodikove veze s donorima vodikovih veza ili kordinirati s metalnim ionima.²⁰ Istraživanja su pokazala da je sposobnost stvaranja vodikovih veza i visoki dipolni moment triazolnog prstena važna za vezanje na biomolekularne mete i povećanje njihove topljivosti.¹⁹ 1,2,3-triazoli su vrlo stabilni na metaboličku i kemijsku razgradnju, te inertni pri hidrolitičkim, oksidacijskim i redukcijским uvjetima, čak i pri visokim temperaturama.²¹



Slika 17. 1,2,3-triazol

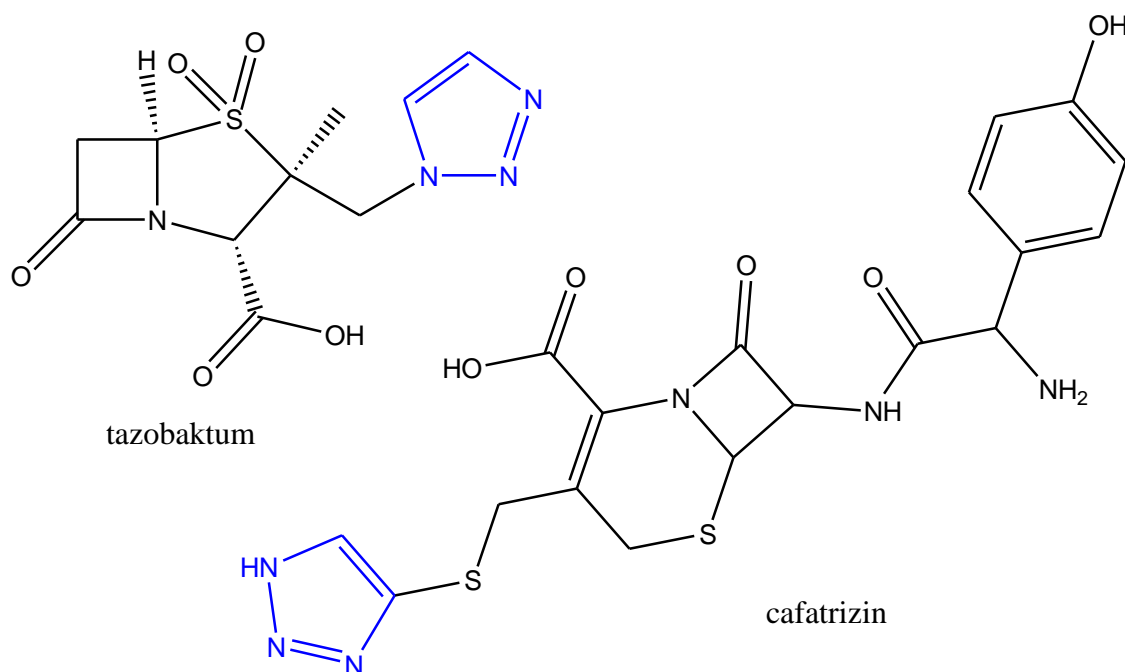
1,2,3-triazolni derivati imaju sve značajniju primjenu u različitim područjima suvremene kemije, razvoju lijekova, biokonjugata, polimera i materijala. 1,2,3-triazolni prsten se često u procesu razvoja lijekova koristi kao poveznica između dva spoja koja imaju farmakološko djelovanje.²⁰ Triazolni heterocikli se dosta primjenjuju i u industriji kao boje i bjelila za vlakna, kao inhibitori korozije za mnoge metale i legure te kao agrokemikalije u obliku herbicida, fungicida i antibakterijskih preparata.²²

2.3.1. Biološka aktivnost triazola

Zbog lagane sinteze klik kemijom, atraktivnih značajki i velikog broja bioloških aktivnosti, 1,2,3-triazoli imaju bitnu ulogu ne samo u organskoj već i u medicinskoj kemiji.

Triazolni prsten je jedna od ključnih strukturnih jedinica u bioaktivnim molekulama, te se pokazao kao antibakterijski, antimikrobiološki, analgetski, anti-inflamatorni, antimalarijski, anti HIV i antivirusni agens, a neki od 1,2,3-triazola su pokazali antiproliferacijsku i antitumorsku aktivnost. Neki od derivata 1,2,3-triazola se koriste kao aktivatori kalijevih kanala, te se vežu na enzime kovalentnim i nekovalentnim vezama. Važnost triazolnog prstena u strukturi lijekova leži u tome što se ne mogu hidrolitički razgraditi, te ih je skoro nemoguće reducirati ili oksidirati, a mogu stvarati vodikove veze. Stabilni su prilikom metaboličkih transformacija jer triazolni prsten nije prisutan u prirodnim produktima.^{23,24}

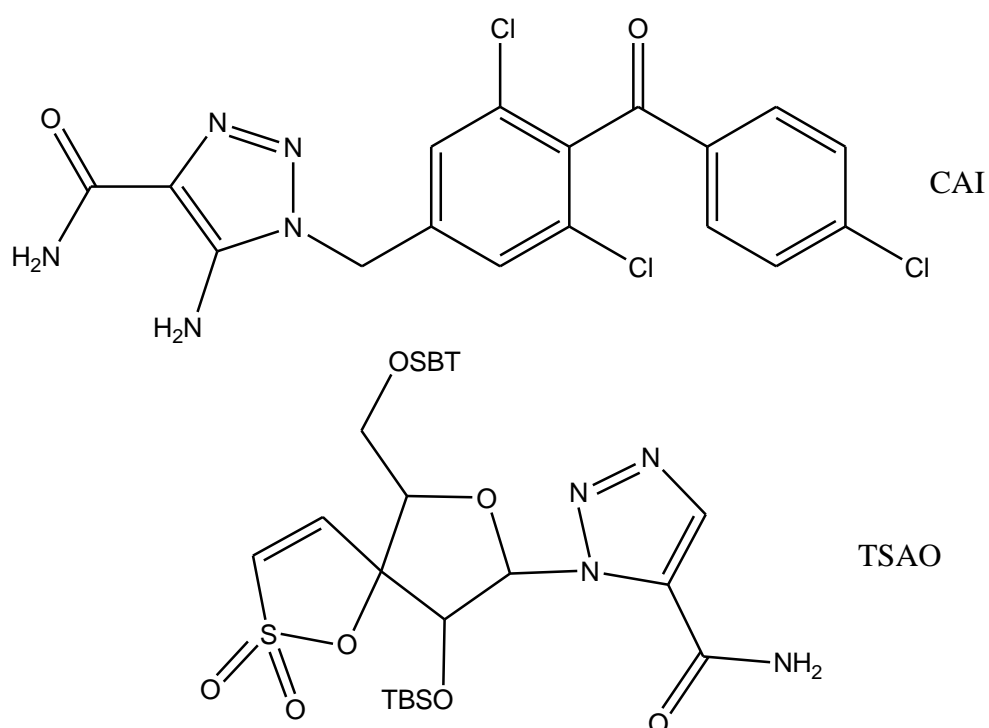
Poznati lijekovi koji sadrže 1,2,3-triazolni prsten su beta-laktamski antibiotik tazobaktum koji je inhibitor bakterijskog enzima betalaktamaze, te pokazuje antiproliferacijsku aktivnost, te cefalosporin cafatrizin koji pokazuje izvrsnu aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija, a inhibira bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis* (Slika 18).



Slika 18. Tazobaktum i cafatrizin

Karboksiamidotriazol (CAI) pokazuje antitumorsko djelovanje, inhibira proliferaciju u nekoliko vrsta tumora kao što su rak prostate i dojke. Nadalje, *tert-*

butildimetilsililspiroaminoooksatioldioksid (TSAO) i njegovi derivati su inhibitori reverzne transkriptaze (Slika 19).²⁵



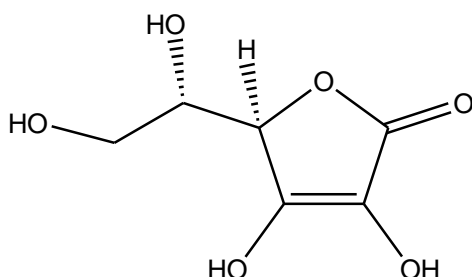
Slika 19. CAI i TSAO

2.3.2. Kumarinski derivati triazola

Sintetizirani su brojni biološki aktivni derivati kumarina konjugirani s 1,2,3-triazolima.²⁶ H. M. Liu i suradnici su otkrili da derivati 4-((1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarina pokazuju antitumorsku aktivnost uključujući i apoptozu. Analози novobiocina s 1,2,3-triazolnim prstenom na C-3 položaju kumarina pokazuju citotoksičnu aktivnost prema raku dojke.²⁷ Spojevi s 1,2,3-triazol-1-ilnim supstumentom, također na C-3 položaju kumarina inhibiraju agregaciju beta-amiloida koji uzrokuje progresiju Alzheimerove bolesti.²⁸

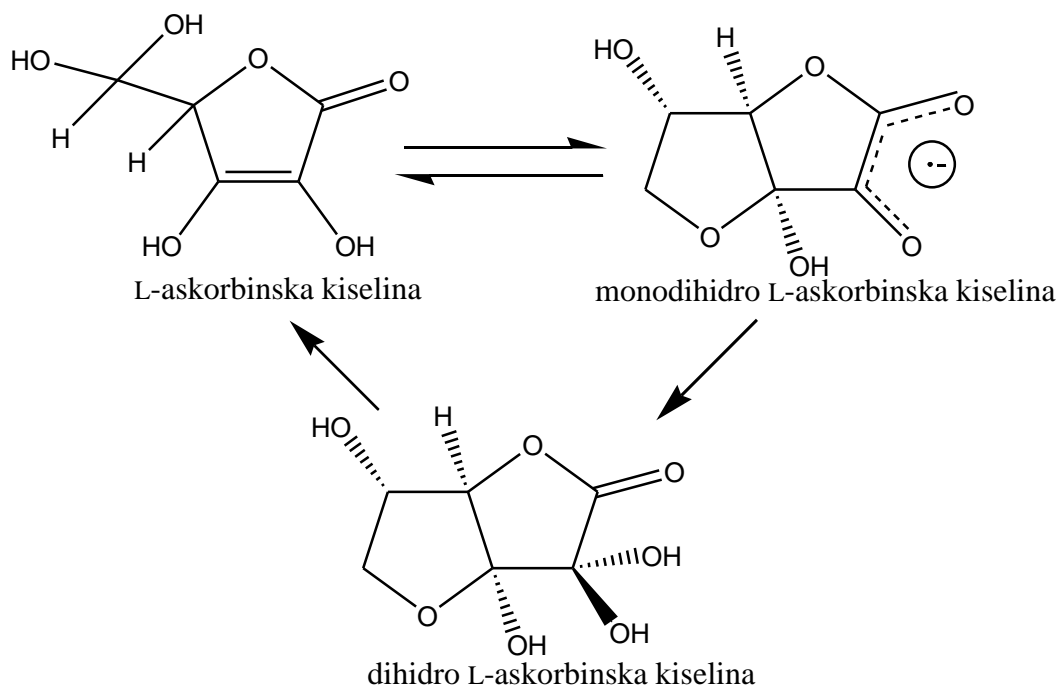
2.4. L-askorbinska kiselina

L-askorbinska kiselina (AscH_2 , vitamin C) je biološki značajno redukcijsko sredstvo zbog svoje 1-okso-2-en-2,3-diol strukture.²⁹ L-askorbinska kiselina je oksolakton sa šest C-atoma, strukturom sličan glukozi i ostalim heksozama.



Slika 20. Prikaz strukture askorbinske kiseline

Reverzibilno se oksidira u monodihidroaskorbatni radikal, koji se zatim disproporcionira do askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline (Slika 21). Budući da je dihidroaskorbinska kiselina nestabilna pri pH većem od 7, potrebno je održavati askorbinsku kiselinu u reducirajućem obliku kako bi se spriječio njen gubitak.³⁰



Slika 21. Struktura i međusobni odnosi askorbinske kiseline i njenih oksidiranih oblika

Čista askorbinska kiselina je bijeli kristalinični prah koji je vrlo topljiv u vodi te daje bezbojnu otopinu.³¹ Biljke i većina životinja sintetizira askorbat iz glukoze. Kod primitivnih riba, vodozemaca i gmazova askorbat se sintetizira u bubrezima dok kod sisavaca u jetri. Ljudi, ostali primati, zamorci i nekoliko vrsta šišmiša ne mogu sintetizirati askorbat jer gen koji kodira L-gulonolakton oksidazu (enzim koji je potreban za posljednji korak u sintezi askorbata) nije funkcionalan.³²

2.4.1. Biološka aktivnost L-askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina je esencijalni mikronutrijent te se smatra da ima antioksidativno djelovanje u živim sustavima.³³ Vitamin C sudjeluje u različitim fiziološkim procesima, na primjer u proizvodnji kolagena. Također se smatra važnim u prevenciji različitih kroničnih bolesti kao što su rak, cerebralna apopleksija, dijabetes, atopijski dermatitis, infarkt miokarda i AIDS.³⁴ L-askorbinska kiselina djeluje kao elektron donor i antioksidans za nekoliko enzima, sudjeluje u obrambenim mehanizmima domaćina, funkciji endokrinog sustava te drugim biološkim procesima.³⁵

L-askorbinska kiselina je jedan od glavnih antioksidanasa. Uklanja molekule slobodnih reaktivnih kisikovih (*Reactive Oxygen Species*, ROS) i dušikovih (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) jedinica dajući 1 ili 2 elektrona pri čemu nastaje slabo reaktivni askorbil-radikal. Ukoliko je povećan broj slobodnih radikala u odnosu na količinu antioksidanasa, dolazi do pojave oksidativnog stresa. S obzirom da slobodni radikali oštećuju nukleinske kiseline, proteine i masti, oksidativni stres utječe na razvoj kardiovaskularnih bolesti, hipertenziju, kronične upalne bolesti i dijabetes, a upravo L-askorbinska kiselina zaustavlja lančane reakcije oštećenja. Također, askorbinska kiselina štiti LDL oblik kolesterola od oksidacije i na taj način djeluje u prevenciji bolesti srca i krvnih žila.³⁶ Vitamin C ima važnu ulogu u održavanju vitamina E u aktivnom obliku, reduciranjem tokoferoksilnog radikala koji nastaje oksidacijom vitamina E. Ova dva vitamina djeluju sinergistički; vitamin E djeluje kao primarni antioksidans, a radikal koji nastaje reagira s vitaminom C, te se regenerira vitamin E.

Hidroksilne skupine na laktonskom prstenu L-askorbinske kiseline na položajima C-2' ili C-3' su značajne zbog biološke aktivnosti *in vivo*. Nasuprot tome, dokazano je da 6-hidroksi skupina L-askorbinske kiseline ima zanemarivu važnost u transportu i funkciji ovog vitamina.

2'-hidroksi skupina se nalazi u fokusu reakcije u redoks procesima L-askorbinske kiseline i značajna je za redukcijska svojstva vitamina C. Prema tome bi kemijske modifikacije hidroksilne skupine na položaju C-2' trebale imati značajan utjecaj na biološka svojstva kiseline. Vitamin C se također smatra korisnim sintetičkim prekursorom, zbog raznolike kemijske funkcionalnosti, za mnoge molekule koje imaju potencijalno biološko djelovanje.³⁷

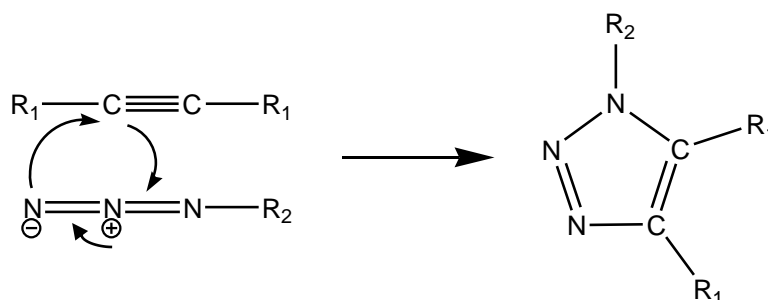
2.5. Klik kemija

Razvoj klik kemije započinje početkom 21. stoljeća (2001. godine) kada je američki znanstvenik K. Barry Sharpless proveo sintezu 1,2,3-triazolnog prstena uz bakar(I) kao katalizator i time postavio osnove za provođenje regioselektivnih klik reakcija.³⁸ Klik kemija opisuje niz jednostavnih, efikasnih i selektivnih kemijskih transformacija koje vode do jednog produkta. Ove reakcije karakterizira jednostavna izvedba, blagi reakcijski uvjeti, stereoselektivnost, visoka iskorištenja, dostupni reagensi, neosjetljivost na kisik i vodu, korištenje okolišu prihvatljivih otapala, jednostavna izolacija produkta.³⁹ Za nekoliko vrsta reakcija je otkriveno da zadovoljavaju uvjete „klik“ kemije: termodinamički favorizirane reakcije koje vode do jednog produkta, kao što je reakcija nukleofilnog otvaranja prstena između epoksida i aziridina; nealdolni tipovi karbonilnih reakcija, kao što je formiranje hidrazona i heterocikla; adicije na C-C višestruke veze, kao što je oksidativno formiranje epoksida, Michaelove adicije i Huisgenova 1,3-cikloadicija.⁴⁰ Klik kemija ima široku primjenu u području medicinske kemije, kao djelotvorna sintetska metoda u pripravi biblioteke novih spojeva s biološkim djelovanjem. Koncept klik kemije kojim nastaje 1,2,3- triazolni prsten primjenjuje se u razvoju lijekova, posebice u ranoj fazi otkrivanja lijekova i procesu optimiranja dobivenih predvodnih struktura.⁴¹

2.5.1. Huisgenova cikloadicija

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija je reakcija alkina i azida čiji produkt je 1,2,3-triazol te je nedvojbeno pravi primjer „klik“ reakcije. Tolerira širok spektar funkcionalnih skupina, uključujući nezaštićene hidroksilne, karboksilne i amino skupine, upotrebu vode kao

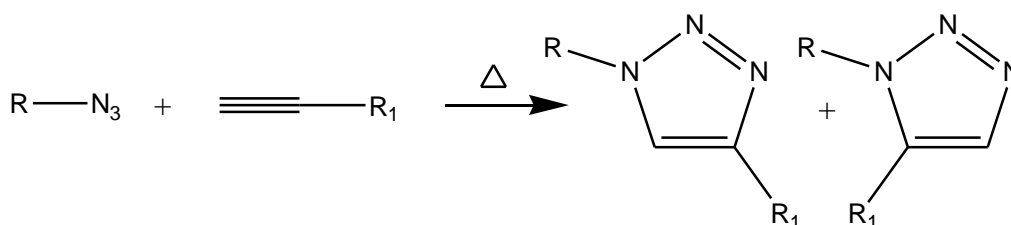
otapala što pogoduje primjeni reakcije u industrijskom mjerilu te time smanjuje zagađenje okoliša.⁴²



Slika 22. Općeniti prikaz Huisgenove ciklizacije

2π -elektroni dipolarofila, alkeni i alkini i molekule koje sadrže heteroatome u funkcionalnim skupinama kao što su karbonili i nitrili, te 4 elektrona dipolarne komponente sudjeluju u pericikličnom pomaku. Adicija je stereokonzervativna te je reakcija $[2s+4s]$ slična Diels-Alder-ovoj. Elektron odvlačeće skupine na dipolarofilu favoriziraju interakciju LUMO s HOMO dipola što dovodi do formiranja novih veza, jer elektron donorske skupine na dipolarofilu pretežito favoriziraju inverznu interakciju.⁴³

Najčešće korištena sinteza 1,2,3-triazola je Huisgenova cikloadicija azida i alkina pri povišenoj temperaturi (Slika 23), koju je oko 1960. godine izveo njemački kemičar R. Huisgen te izolirao dva produkta, 1,4 i 1,5-disupstituirana triazolna prstena u približnom omjeru 1:1.⁴⁴ Ovaj način sinteze je dugotrajan, zahtijeva visoke temperature te nastaju regioselektivni produkti kada se koriste nesimetrični alkini.



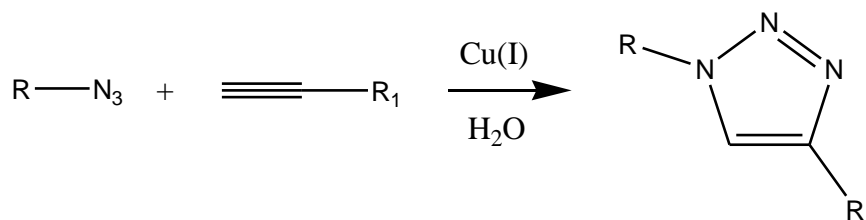
Slika 23. Huisgenova cikloadicija azida i alkina pri povišenoj temperaturi

Zbog zahtjevnih reakcijskih uvjeta i nastajanja dva regioizomera kriteriji „klik“ reakcija nisu u potpunosti zadovoljeni.⁴⁵ K.B. Sharpless i Meldal su upotrebom bakar(I) kao katalizatora dobili samo 1,4-disupstituirani triazolni prsten kao produkt reakcije koju je proveo Huisgen.

Ako se primjenjuje rutenij kao katalizator nastaju 1,5-disupstituirani triazoli. Reakcije u kojima se koriste katalizatori u potpunosti zadovoljavaju definiciju „klik“ kemije.⁴⁶

2.5.2. Azid-alkin cikloadicija katalizirana Cu(I)

Reakcija 1,3-dipolarne cikloadicije terminalnih alkina i azida s bakar(I) kao katalizatorom (CuAAC) je reakcija za dobivanje 1,4-disupstituiranog triazolnog prstena⁴⁸ te je regioselektivna, kemoselektivna i može se provoditi u vodenom mediju (stoga se djelotvorno može odvijati u fiziološkim uvjetima) na sobnoj temperaturi.⁴⁸



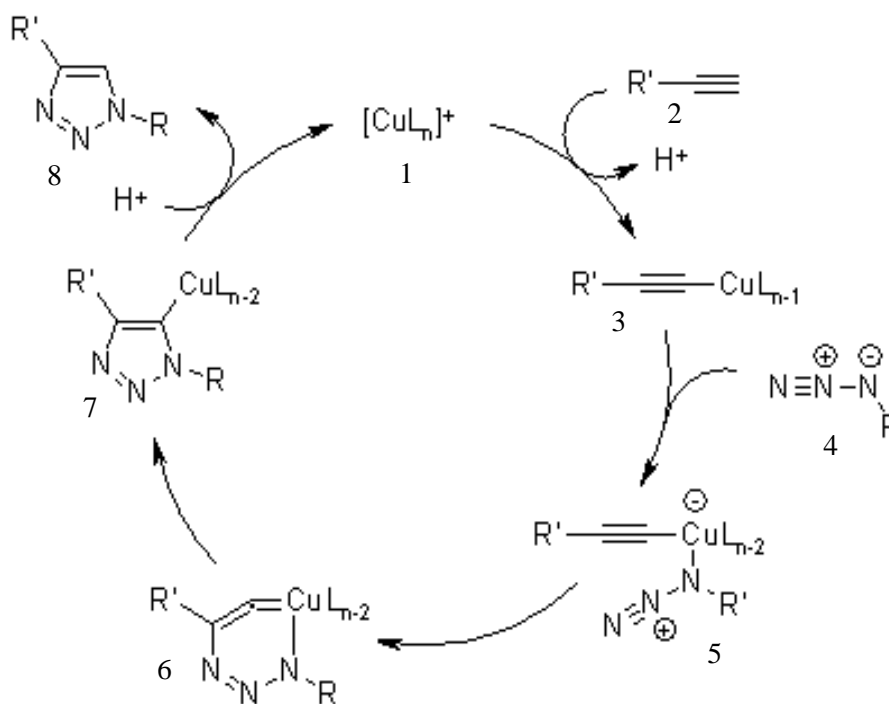
Slika 24. Azid-alkin cikloadicija katalizirana Cu(I)

Izvor bakra, kao katalizatora, su bakrene soli (CuI, CuBr) dok je sve češće izvor Cu(I) posljedica oksido-redukcijskih reakcija. Razlog upotrebe oksido-redukcijskih reakcija je što upotrebom soli Cu(I) ion podliježe redukcijskim procesima pri normalnoj atmosferi, pa je potrebno osigurati inertnu atmosferu, dok *in situ* priprava Cu(I) iona iz oksido-redukcijskih procesa ne zahtjeva inertnu atmosferu. Soli koje se koriste za pripremu Cu(I) su CuSO₄/Na-askorbat i 1M CuSO₄/Cu(0). Metoda koja se također pokazala uspješnom je sinteza triazolnog prstena uz pomoću mikrovalova.⁴⁹ Veliki je broj sintetskih mogućnosti reakcije CuAAC u bioznanostima te ima primjenu u sintezi lijekova, biokemiji, sintezi biokonjugata, genskoj terapiji, bioseparaciji i dijagnostici.⁴⁰

2.5.2.1. Mehanizam azid-alkin cikloadicije katalizirane Cu(I)

Mehanizam azid-alkin cikloadicije katalizirane Cu(I) je prikazan na slici 25. Započinje koordinacijom alkina na Cu(I) uz izdvajanje jednog liganda čime nastaje bakrov acetilid (**3**). U

sljedećem stupnju, azid zamjenjuje jedan od liganda i baskov kompleks veže dušik vezan na supstituent R formirajući intermedijar **5**. Napadom terminalnog dušika u intermedijaru **5** na C-2 acetilida nastaje neobičan šesteročlani Cu(III) kompleks (**6**). Preuređivanjem kompleksa **6** nastaje peteročlana specija **7** koja proteolizom daje konačni produkt **8**.⁵⁰



Slika 25. Mehanizam azid-alkin cikloadicije katalizirane Cu(I)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sva otapala su sušena/pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3 Å. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče 60F-254 prevučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm.

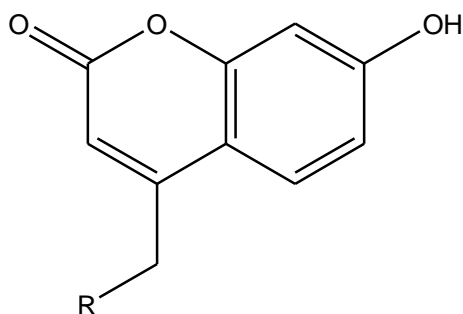
Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063-0,2 mm). Staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije, a kao eluens je korištena odgovarajuća smjesa CH₂Cl₂/CH₃OH te n-heksan/etil-acetat.

Točke tališta sintetiziranih spojeva određene su na instrumentu Kofler (Reichert, Wien) i nisu korigirane.

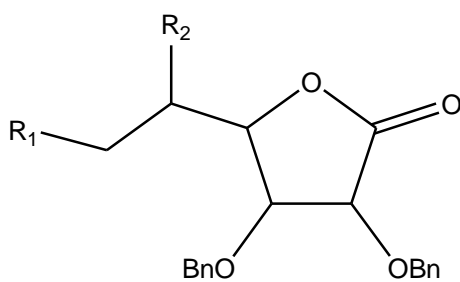
Spektri ¹H i ¹³C NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u DMSO-*d*₆ i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ¹H i ¹³C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu tetrametilsilana na δ 0,0 ppm za ¹H i prema signalu DMSO δ39.50 ppm za ¹³C. Pojedine rezonancije su pridružene na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstante sprege.

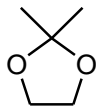
Reakcije potpomognute mikrovalovima provedene su u reaktoru Milestone stars S koristeći kvarcne kivete pri 80 °C i 300 W uz tlak 1 bar.

3.2. Pregled sintetiziranih spojeva

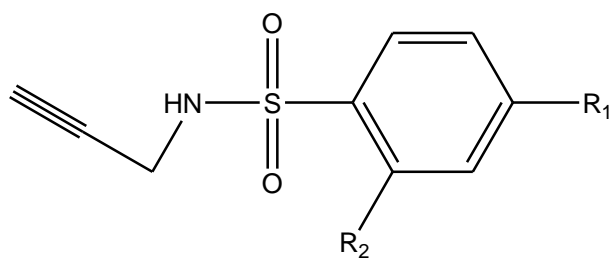


Spoj	R
1	Cl
2	N ₃

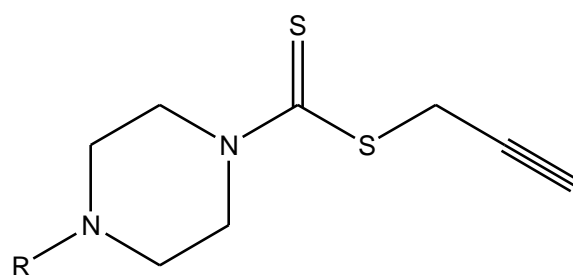


Spoj	R ₁ R ²
3	izopropiliden = 

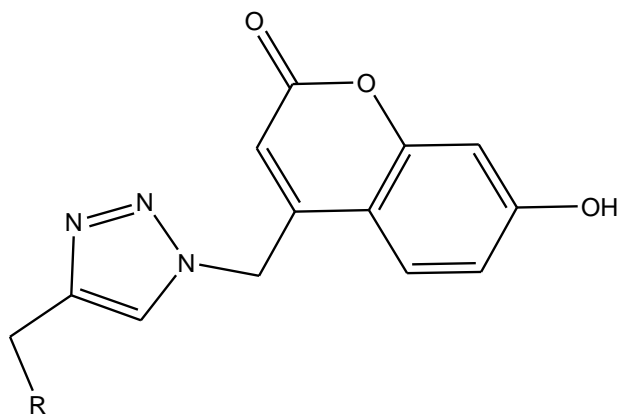
Spoj	R ₁	R ₂
4	OH	OH
5	OTs	OH
6	N ₃	OH



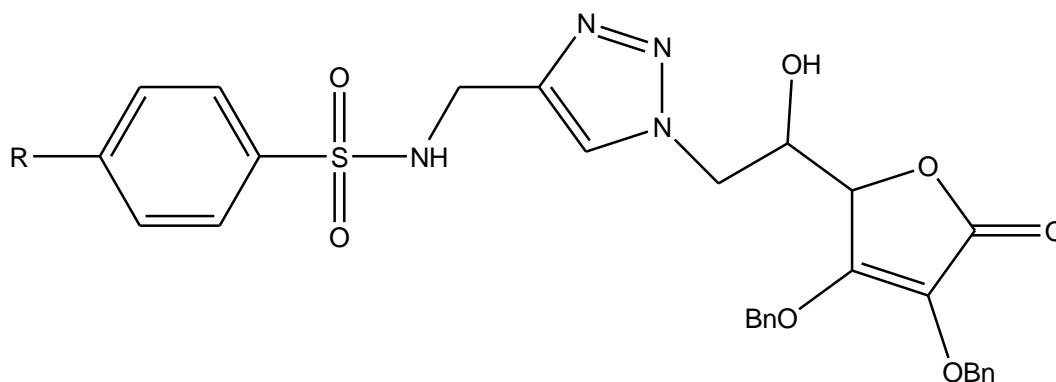
Spoj	R ₁	R ₁
7	NO ₂	H
8	F	H
9	CH ₃	H
10	Cl	H
11	F	Cl



Spoj	R
12	
13	CH ₃



Spoj	R
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	



Spoj	R
22	Cl
23	CH ₃

3.3. Priprave spojeva

7-hidro-4-(klormetil)ksikumarin (**1**)

Rezorcinol, (5,5 g, 50 mmol) se oprezno otopi u H₂SO₄ (95 %, 45 ml) na 0 °C uz miješanje. Otopini se dokapa etil-4-kloroacetoacetat (9,1 g, 55 mmol) i reakcijska smjesa se miješa 5 h na 0 °C. Otopina se zatim lagano izlije u smjesu led/voda (350 ml) pri čemu istaloži produkt. Produkt se odfiltrira i ispere nekoliko puta s vodom. Izoliran je žuti praškasti spoj **1** (6,21 g, 58,5%, T_t = 119 – 122 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10,56 (1H, bs, OH), 7,68 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-6), 6,84 (1H, dd, J = 8,7, 2,4, Hz, H-7), 6,75 (1H, d, J = 2,3 Hz, H-9), 6,42 (1H, s, H-3), 4,95(3H, d, J = 0,6 Hz, H-1') ppm.

4-(azidometil)-7-hidroksikumarin (**2**)

U otopinu spoja **1** (5,0 g, 15 mmol) u acetonitrilu (80 ml) doda se natrijev azid (5,6 g, 72,76 mmol). Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi refluksa 24 h. Tijek reakcije

se prati TLC-om. Nakon 24 h otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak otopljen u etil-acetatu (150 ml) te ekstrahiran s vodom (150 ml) i zasićenom otopinom natrijevog klorida (150 ml). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog natrij-sulfata te profiltriran i uparen pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$. Izoliran je spoj **2** kao žuti prah (2,7 g, 81,5 %, $T_t = 185 - 187$ °C).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ : 10,62 (1H, s, OH), 7,57 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-6), 6,90 – 6,70 (2H, m, H-7 i H-9), 6,29 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, H-3), 4,79 (2H, d, $J = 1,1$ Hz, H-1') ppm.

2,3-*O,O*-dibenzil-5,6-*O,O*-izopropiliden-L-askorbinska kiselina (3)⁵¹

5,6-*O,O*-izopropiliden-L-askorbinska kiselina (20,0 g, 93 mmol) se otopi u dimetilformamidu (DMF, 100 ml) te se otopini doda K_2CO_3 (14,1 g, 116 mmol) i benzil klorid (23,3 ml, 93 mmol). Reakcijska smjesa se miješa preko noći na 60 °C. Nakon završetka reakcije (provjera tankoslojnom kromatografijom), K_2CO_3 se odfiltrira a otapalo upari pri sniženom tlaku. Ostatak je otopljen u etil-acetatu (100 ml) te ekstrahiran s vodom (50 ml) i zasićenom otopinom natrijevog klorida (50 ml). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog magnezij-sulfata te profiltriran i uparen pri sniženom tlaku. Produkt se prekrizalizira u vrućem metanolu. Kristali se odvoje, a filtrat upari pri sniženom tlaku. Ostatak nakon uparavanja je prekrizaliziran, a potom pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 200 : 1$. Izoliran je spoj **3** (28,8 g, 80 %).

2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (4)⁵¹

Otopini spoja **3** (6,0 g, 30 mmol) u metanolu (60,2 ml) doda se octena kiselina (50 %, 60 ml). Reakcijska smjesa se miješa preko noći na 70 – 80 °C. Otapalo se upari pri sniženom tlaku, a ostatak se otopi u etil-acetatu (100 ml) te ekstrahira s vodom (100 ml) i zasićenom otopinom natrijevog klorida (100 ml). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog natrij-sulfata te filtriran. Otapalo je upareno pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 40 : 1$. Izoliran je spoj **4** (5,4 g, 50 %)

2,3-O,O-dibenzil-6-O-tosil-L-askorbinska kiselina (5)⁵¹

Spoj **4** (2,0 g, 5,6 mmol) se otopi u suhom diklormetanu (17 ml) i suhom piridinu (5,6 ml) te se reakcijska smjesa miješa na 0 °C u atmosferi argona. Otopini se kroz 2 h dokapa *p*-toluensulfonil-klorid (1,2 g, 6,29 mmol) otopljen u diklormetanu (11 ml). Reakcijska smjesa se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pri sniženom tlaku (kouparavanje s toluenom). Ostatak nakon uparavanja se otopi u diklormetanu (100 ml), te se ekstrahira s vodom (100 ml) i zasićenom otopinom NaHCO₃ (100 ml). Organski sloj se suši iznad bezvodnog MgSO₄. MgSO₄ se odfiltrira, a filtrat upari pri sniženom tlaku i pročisti kolonskom kromatografijom uz CH₂Cl₂ : CH₃OH = 200 : 1 kao eluens. Izoliran je spoj **5** (1,7 g, 60 %)

6-azido-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (6)

Otopini spoja **5** (2,2 g, 4,30 mmol) u DMF-u (29,3 ml) se lagano dokapa natrijev azid (572,0 mg, 7,4 mmol) otopljen u vodi (2,9 ml). Reakcijska smjesa se miješa 24 h na temperaturi 70 – 80 °C. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom. Nakon 24 h otapalo je upareno pri sniženom tlaku, a ostatak otopljen u etil-acetatu (100 ml) te ekstrahiran s vodom (150 ml). Organski sloj se suši iznad bezvodnog natrij-sulfata. Natrijev-sulfat je filtriran, a otapalo upareno pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 200 : 1; CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1. Izoliran je spoj **6** (1,2 g, 70 %)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 7,47 – 7,27 (10 H, m, CH₂Ph), 5,71 (1H, d, *J* = 6,6 Hz, H-4), 5,24 (2H, q, *J* = 11,7 Hz, CH₂Ph), 4,98 (2H, d, *J* = 1,6 Hz, CH₂Ph), 4,87 (1H, d, *J* = 1,7 Hz, OH), 3,95 – 3,79 (1H, m, H-5), 3,48 – 3,32 (2H, m, H-6) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO) δ 168,98 (C-1), 157,35 (C-2'), 136,14 (C-3), 135,62 (C-4), 128,37 (C-5', C-3'), 120,91 (C-2), 73,82 (C-4), 73,60 (C-1'), 72,74 (C-5), 52,72 (C-6) ppm.

***N*-(2-propinil)-4-nitrobenzensulfonamid (7)**

Piridin (12,3 ml) se dokapa u propargilamin (0,20 g, 3 mmol) te se otopina miješa na 0 °C u atmosferi argona. 4-nitrobenzensulfonil-klorid (0,4 g, 1,85 mmol) se dodaje oprezno u malim obrocima, te se reakcijska smjesa miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pod sniženim tlakom. Ostatak nakon uparavanja se otopi u etil-acetatu (120 ml) te ekstrahira s

klorovodičnom kiselinom (60 ml, 1 M). Organski sloj se suši iznad bezvodnog MgSO₄. MgSO₄ se odfiltrira, a filtrat upari pri sniženom tlaku i pročisti kolonskom kromatografijom uz CH₂Cl₂ kao eluens. Izoliran je spoj **7** kao bijeli prašak (2,0 g, 76,6 %, T_t = 165 – 168 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,52 (1H, s, -NH-), 8,47 – 8,38 (2H, m, Ph-H-7), 8,16 – 7,97 (2H, m, Ph-H-6), 3,79 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, H-3), 3,01 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, H-1) ppm.

4-fluor-*N*-(2-propinil)benzensulfonamid (8)

Piridin (6,9 ml) se dokapa u propargilamin (1,37 g, 24 mmol) te se otopina miješa na 0 °C pod atmosferom argona. 4-fluorbenzensulfonil-klorid (2,5 g, 12,8 mmol) se dodaje oprezno u malim obrocima, te se reakcijska smjesa miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije (prema TLC-u), otapalo se upari pri sniženom tlaku. Ostatak se otopi u etil-acetatu (80 ml) te ekstrahira s klorovodičnom kiselinom (60 ml, 1 M). Organski sloj se suši iznad bezvodnog MgSO₄. MgSO₄ se odfiltrira, a filtrat upari pri sniženom tlaku i pročisti kolonskom kromatografijom uz CH₂Cl₂ kao eluens. Izoliran je spoj **8** kao bijeli prašak (2,0 g, 73,2 %, T_t = 88 – 91 °C).

4-metil-*N*-(2-propinil)benzensulfonamid (9)

Piridin (12,3 ml) se dokapa u propargilamin (2,43 g, 44 mmol) te se otopina miješa na 0 °C pod atmosferom argona. *p*-toluensulfonil-klorid (2,5 g, 22,8 mmol) se dodaje oprezno u malim obrocima, te se reakcijska smjesa miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pri sniženom tlaku. Ostatak nakon uparavanja se otopi u etil-acetatu (150 ml) te ekstrahira s klorovodičnom kiselinom (120 ml, 1 M). Organski sloj se suši iznad bezvodnog MgSO₄. MgSO₄ se odfiltrira, a filtrat upari pri sniženom tlaku i pročisti kolonskom kromatografijom uz CH₂Cl₂ kao eluens. Izoliran je spoj **9** kao bijeli prašak (2,2 g, 46,8 %, T_t = 81 – 84 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,03 (1H, s, NH), 7,69 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, H-6), 7,39 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H-7), 3,65 (2H, d, *J* = 2,3 Hz, H-3), 3,05 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, H-1), 2,38 (3H, s, H-9) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 139.45 (C-8), 137.36 (C-5), 129.17 (C-7), 128.69 (C-6), 79.10 (C-2), 74.84 (C-1), 31.84 (C-3) ppm.

4-klor-*N*-(2-propinil)benzensulfonamid (10)

Piridin (5,1 ml) se dokapa u propargilamin (1,01 g, 18 mmol) te se otopina miješa na 0 °C pod atmosferom argona. 4-klorbenzensulfonil-klorid (2,0 g, 9,5 mmol) se dodaje oprezno u malim obrocima, te se reakcijska smjesa miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pri sniženom tlaku. Ostatak se otopi u etil-acetatu (100 ml) te ekstrahira s klorovodičnom kiselinom (50 ml, 1 M). Organski sloj se suši iznad bezvodnog MgSO₄. MgSO₄ se odfiltrira, a filtrat upari pri sniženom tlaku i pročisti kolonskom kromatografijom uz CH₂Cl₂ kao eluens. Izoliran je spoj **10** kao bijeli prašak (1,6 g, 72,5 %, T_i = 106 – 108 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,25 (1H, s, NH), 7,85 – 7,75 (2H, m, H-6), 7,73 – 7,56 (2H, m, H-7), 3,73 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, H-3), 3,05 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, H-1) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 139,45 (C-5), 137,36 (C-6, C-7) 128,93 (C-8, d, *J* = 36,6 Hz C-Cl), 79,10 (C-2), 74,84 (C-1), 31,84 (C-3) ppm.

4-fluor-2-klor-*N*-(2-propinil)benzensulfonamid (11)

Piridin (1,4 ml) se dokapa u propargilamin (0,26 g, 4,6 mmol) te se otopina miješa na 0 °C pod atmosferom argona. 4-fluor-2-klorbenzensulfonil-klorid (0,6 g, 2,5 mmol) se dodaje oprezno u malim obrocima, te se reakcijska smjesa miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pri sniženom tlaku. Ostatak se pročisti kolonskom kromatografijom uz CH₂Cl₂; CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1 kao eluens. Izoliran je spoj **11** kao bijeli prašak (406,7 mg, 65,7 %, T_i = 97 – 100 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,38 (1H, s, NH), 8,04 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 6,0 Hz, H-10), 7,70 (1H, dd, *J* = 8,8, 2,6 Hz, H-7), 7,45 – 7,28 (1H, m, H-9), 3,78 (2H, d, *J* = 2,4 Hz, H-3), 2,99 (1H, t, *J* = 2,4 Hz, H-1) ppm.

4-((2-tiopropinil)karbonotioil)piperazin-1-*tert*-butilkarboksilat (12)

Ugljikov disulfid (CS₂, 1,8 ml, 30 mmol) se oprezno dokapa u otopinu 1-boc-piperazina (1,86 g, 10 mmol) i Na₃PO₄ · 12H₂O (2,28 g, 6 mmol) u acetonu (40 ml). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim se u otopinu doda propargil-bromid (1,3 g,

11,0 mmol) te se reakcijska smjesa miješa još dodatnih 30 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa se filtrira, a filtrat se upari pri sniženom tlaku. Ostatak se otopi u etil-acetatu (50 ml) te ekstrahira s vodom (50 ml) i zasićenom otopinom natrijevog klorida (50 ml). Vodeni sloj je filtriran, te je iz taloga izoliran spoj **12** kao bijeli prah (1,6 g, 51,8 %, $T_f = 111 - 115$ °C).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 4,15 – 3,36 (8H, m, 4 x CH_2N), 4,14 (2H, d, $J = 2,6$ Hz, CH_2S), 3,20 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, H-1), 1,42 (9H, s, 3 x $-\text{CH}_3$) ppm.

2-propinil-4-metilpiperazin-1-karbohidioat (13)

U otopinu 1-metilpiperazina (2,0 g, 20 mmol) i $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4,55 g, 12 mmol) u acetonu (80 ml) oprezno se dokapa CS_2 (3,6 ml, 30 mmol). Nakon 30 minuta, dokapa se propargil-bromid (1,7 ml, 11,0 mmol), te se reakcijska smjesa nastavlja miješati na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa se filtrira, a filtrat se upari pri sniženom tlaku. Ostatak se otopi u etil-acetatu (50 ml) te ekstrahira s vodom (50 ml) i zasićenom otopinom natrijevog klorida (50 ml). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog natrij-sulfata, profiltriran, uparen pri sniženom tlaku i pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 200 : 1$. Izoliran je spoj **13** kao smeđe ulje (245,4 mg, 11,5 %).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ 4,22 – 3,88 (4H, m, CH_2N), 4,12 (2H, d, $J = 2,6$ Hz, CH_2S), 3,19 (1H, s, H-1), 2,43 – 2,37 (4H, m, 2 x CH_2N), 2,21 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-N}$) ppm.

4-[4-(4-nitrobenzensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-4-il]metil-7-hidroksikumarin (14)

Spoj **2** (100 mg, 0,46 mmol) se otopi u kivetu u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (3 ml), voda (3 ml) i DMF (3 ml). Otopini se potom doda spoj **7** (92,2 mg, 0,38 mmol), elementarni bakar (20 mg, 0,31 mmol) i 1 M otopina $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 50 : 1$. Dobiven je spoj **14** (6,3 mg, 3,6 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 10,72 (1H, s, OH), 8,58 (1H, s, NH), 8,36 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, H-6'), 8,08 (2H, d, $J = 1,8$ Hz, H-7'), 8,02 (1H, s, H-3'), 7,67 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-6), 6,82 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,4$ Hz, H-7), 6,75 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-9), 5,84 (1H, s, H-1'), 5,40 (1H, s, H-3), 4,19 (1H, s, $\text{CH}_2\text{-NH}$) ppm.

4-[4-(4-fluorbenzensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-4-il]metil-7-hidroksikumarin (15)

Spoj **2** (50 mg, 0,23 mmol) se otopi u kiveti u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (4 ml) i voda (3 ml). Otopini se potom doda spoj **8** (40,9 mg, 0,38 mmol), elementarni bakar (10 mg, 0,15 mmol) i 1 M otopina $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 50 : 1$. Dobiven je spoj **15** (11,5 mg, 14,1 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 10,70 (1H, s, OH), 8,47 (1H, s, NH), 8,05 – 7,93 (2H, m, H-6'), 7,69 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, H-7'), 7,52 (1H, s, H-3'), 7,34 (2H, td, $J = 8,5$, $J = 2,6$ Hz, H-7, H-9), 6,83 (dd, $J = 8,8$, $J = 2,3$ Hz, H-6), 6,76 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 5,83 (2H, s, H-1'), 5,50 (1H, s, H-3), 4,06 (2H, d, $J = 5.4$ Hz, CH_2NH) ppm.

4-[4-(4-metilbenzensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-1-il]metil-7-hidroksikumarin (16)

Spoj **2** (100,0 mg, 0,46 mmol) se otopi u kiveti u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (2 ml), voda (2 ml) i DMF (5 ml). Otopini se potom doda spoj **9** (104,4 mg, 0,58 mmol), elementarni bakar (30 mg, 0,47 mmol) i 1 M otopina $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,12 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 min na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 200 : 1$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$. Dobiven je spoj **16** (146,9 mg, 59,9 %, 201 – 203 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ 10,72 (1H, s, OH), 8,06 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, NH), 8,01 (1H, s, H-3'), 7,70 – 7,67 (3H, m, H-6, H-6'), 7,36 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-7') 6,83 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H-7), 6,76 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-9), 5,84 (2H, s, H-1'), 5,50 (1H, s, H-3), 4,05 (2H, d, $J = 5,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2,36 (3H, s, H-9') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO) δ 161,63 (C-2), 159,90 (C-8), 155,03 (C-4), 150,53 (C-2'), 143,98 (C-8'), 137,39 (C-5'), 129,54 (C-7'), 126,55 (C-6), 126,06 (C-6'), 124,41 (C-3'), 113,16 (C-7) 109,29 (C-3), 109,01 (C-9), 49,01 (C-1'), 38,00 (C-4'), 20,89 (C-9') ppm.

4-[4-(4-klorbenzensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-4-il]metil-7-hidroksikumarin (17)

Spoj **2** (150,0 mg, 0,69 mmol) se otopi u kivetu u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (2 ml), voda (2 ml) i dimetilformamid (5 ml). Otopini se potom doda spoj **10** (132 mg, 0,58 mmol), elementarni bakar (30 mg, 0,47 mmol) i 1 M otopina CuSO₄ · 5H₂O (0,12 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 min na 80 °C (300 W). Nakon završetka reakcije (provjera tankoslojnom kromatografijom), otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 200 : 1; CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1. Dobiven je bijeli kristalinični spoj **17** (207,0 mg, 83,5 %, 209 – 211 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,71 (1H, s, OH), 8,28 (1H, t, *J* = 5,7 Hz, NH), 8,05 (1H, s, H-3'), 7,79 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-6), 7,66 (2H, dd, *J* = 19,1 Hz, *J* = 8,7 Hz, H-7'), 6,84 (2H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,3 Hz, H-6'), 6,77 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H-7), 5,85 (2H, s, H-1'), 5,49 (1H, s, H-3), 4,11 (d, *J* = 5.6 Hz, CH₂-NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ 162,08 (C-2), 160,42 (C-8), 155,51 (C-4), 151,04 (C-2'), 144,20 (C-8'), 139,69 (C-5'), 137,76 (C-7'), 129,78 (C-6), 129,00 (C-6'), 126,41 (C-3'), 124,82 (C-7), 113,7 (C-3), 109,79 (C-9), 49,52 (C-1'), 38,41 (C-4') ppm.

4-[4-(4-fluor-2-klorbenzensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-4-il]metil-7-hidroksikumarin (18)

Spoj **2** (100,0 mg, 0,46 mmol) se otopi u kivetu u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (3 ml), voda (3 ml) i DMF (3 ml). Otopini se potom doda spoj **11** (94,9 mg, 0,38 mmol), elementarni bakar (20,0 mg, 0,31 mmol) i 1 M otopina CuSO₄ · 5H₂O (0,1 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1; CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1. Dobiven je bijeli kristalinični spoj **18** (10,8 mg, 6,1 %, 152 – 155 °C).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ 10,70 (1H, s, OH), 8,48 (1H, s, NH), 8,02 – 7,91 (2H, m, H-3', H-7'), 7,69 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H-6), 7,52 (1H dd, *J* = 8,7, 2,5 Hz, H-9'), 7,34 (1H, td, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,5 Hz, H-10'), 6,84 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,4 Hz, H-7), 6,77 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-9), 5,83 (1H, s, H-1'), 5,50 (1H, s, H-3) 4,20 (2H, s, CH₂-NH) ppm.

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO) δ 162,74 (C-8'), 161,62 (C-2), 159,89 (C-8), 155,05 (C-4), 150,52 (C-2'), 143,76 (C-5'), 125,72 (C-6'), 124,32 (C-10'), 119,22 (C-6), 114,63 (C-3'), 113,28 (C-7'), 109,32 (C-9'), 109,09 (C-5), 102,44 (C-3), 99,48 (C-7), 48,94 (C-1'), 37,69 (C-4') ppm.

4-[4-(*tert*-butil-4-(metiltiokarbotoil)piperazin-1-karboksilat)-1,2,3-triazol-4-il]metil-7-hidroksikumarin (19)

U tikvicu se dodaju spoj **12** (630,0 mg, 2,5 mmol), spoj **2** (500 mg, 2,3 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (52 mg), natrij-askorbat (84,0 mg), THF (17 ml), H_2O (17 ml), te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi 24 h. Nakon završetka reakcije, u reakcijsku smjesu se dodaje voda (40 ml), te se reakcijska smjesa ekstrahira s etil-acetatom (3 x 40 ml). Vodeni sloj je filtriran, te je iz taloga izoliran bijeli kristalinični spoj **19** (612,6 mg, 51,5 %, $T_t = 229 - 231$ °C).

^1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,67 (1H, s, -OH), 8,18 (1H, s, H-3'), 7,64 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-6), 6,79 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,4$ Hz, H-7), 6,72 (1H, d, H-9), 5,83 (2H, s, H-1'), 5,49 (1H, s, H-3), 4,57 (2H, s, - $\text{CH}_2\text{-S}$), 4.17 – 3.32 (8H, m, 4 x CH_2N), 1.37 (9H, s, 3 x -CH_3) ppm.

4-[4-(metil 4-metilpiperazin-1-karbonotioil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-7 hidroksikumarin (20)

Spoj **2** (50,0 mg, 0,23 mmol) se otopi u kivetu u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (4 ml) i voda (4 ml). Otopini se potom doda spoj **13** (41,1 mg, 0,19 mmol), elementarni bakar (10,0 mg, 0,16 mmol) i 1 M otopina $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,04 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 50 : 1$. Dobiven je spoj **20** (13,8 mg, 16,7 %).

^1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,84 (1H, s, H-3'), 7,56 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-6), 6,87 – 6,71 (2H, m, H-7, H-9), 6,57 (2H, d, $J = 1,4$ Hz, H-1'), 6,27 (1H, s, H-3), 4,79 (2H, s, H-4), 2,42 – 1,91 (8H, m, H-6', H-7'), 1,23 (3H, s, H-8') ppm.

4-[4-(metilpiperazin-1-karbonotioil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-7-hidroksikumarin (21)

Trifluoroctena kiselina (CF₃COOH, 0,9 ml) se dodaje u otopinu spoja **19** u diklormetanu (6 ml) na 0 °C. Reakcijska smjesa se miješa 24 h na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari pri sniženom tlaku. Ostatak nakon uparavanja se otopi u diklormetanu (70 ml), te se ekstrahira s vodom (80 ml) i zasićenom otopinom NaHCO₃ (80 ml). Vodeni sloj se filtrira, te je iz taloga izoliran spoj **21** (197,8 mg, 40,9 %, 253 – 256 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,22 (1H, s, H-3'), 7,69 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H-6), 6,88 – 6,72 (2H, m, H-7, H-9), 5,87 (2H, d, *J* = 1,2 Hz, H-1'), 5,54 (1H, s, H-3), 4,61 (2H, s, H-4), 4,16 – 2,80 (8H, m, H-6', H-7') ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO) δ 193,50 (C-5'), 161,63 (C-2), 159,90 (C-8), 155,06 (C-4), 150,52 (C-10), 142,76 (C-3'), 125,36 (C-6), 121,77 (C-4'), 113,15 (C-7), 109,34 (C-5), 109,16 (C-3), 105,63 (C-9), 49,10 (C-6'), 31,22 (C-7') ppm.

6-[(4-(4-klorbenzensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-4-il)-5,6-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (22)

Spoj **6** (190,3 mg, 0,50 mmol) se otopi u kivetu u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (3 ml), voda (3 ml) i DMF (3 ml). Otopini se potom dodaje spoj **10** (137,5 mg, 0,60 mmol), elementarni bakar (26,0 mg, 0,40 mmol) i 1 M otopina CuSO₄ · 5 H₂O (0,2 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100 : 1; CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50 : 1. Dobiven je spoj **22** (154,0 mg, 50,5 %, Tt = 123 – 124 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,21 (1H, t, *J* = 5,1 Hz, NH), 7,89 (1H, s, H-7), 7,75 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, 2 x Ph-H), 7,61 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, 2 x Ph-H), 7,45 – 7,22 (10H, m, CH₂Ph), 5,63 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, H-4), 5,21 (2H, dd, *J* = 22,0, 11,7 Hz, CH₂Ph), 5,03 – 4,91 (2H, m, CH₂Ph), 4,88 (1H, d, *J* = 1,1 Hz, OH), 4,56 (1H, dd, *J* = 13,8, 3,9 Hz, H-4), 4,32 (1H, dd, *J* = 13,8, 9,3 Hz, H-4), 4,15 – 4,06 (1H, m, H-5), 4,04 (2H, d, *J* = 5,4 Hz, CH₂NH) ppm.

6-[(4-(4-metilbensulfonamid)metil-1,2,3-triazol-4-il]-5,6-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina (23)

Spoj **6** (250,0 mg, 0,65 mmol) se otopi u kivetu u smjesi otapala *tert*-butilni alkohol (3 ml), voda (3 ml) i DMF (3 ml). Otopini se potom doda spoj **9** (164,6 mg, 0,79 mmol), elementarni bakar (34,0 mg, 0,53 mmol) i 1 M otopina $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,20 ml). Reakcijska smjesa se miješa i zagrijava u mikrovalnom reaktoru 60 minuta na 80 °C (300 W). Otapalo se upari pod sniženim tlakom, a ostatak nakon uparavanja se pročisti kolonskom kromatografijom uz eluens $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 100 : 1$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 50 : 1$. Dobiven je spoj **23** (196,0 mg, 50,6 %, 116 – 118 °C).

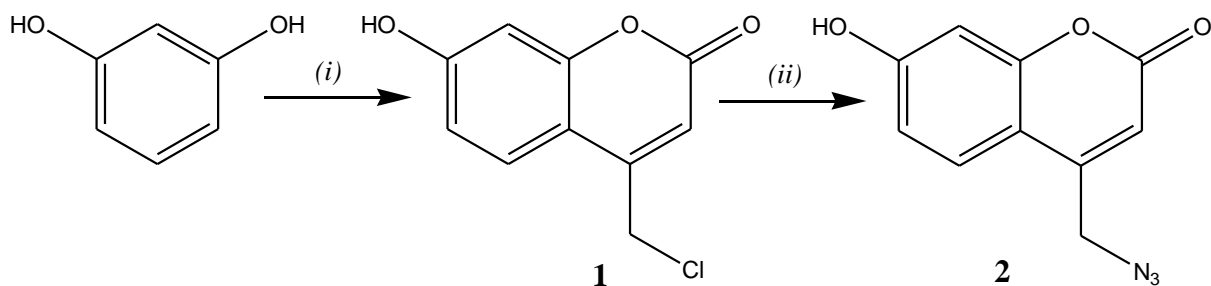
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8,01 (1H, t, $J = 5,0$ Hz, NH), 7,86 (1H, s, 1H, H-7), 7,67 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2 x Ph-H), 7,48 – 7,19 (12H, m, 2 x Ph-H), 5,65 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-4), 5,22 (2H, q, $J = 11,6$ Hz, CH_2Ph), 5,04 – 4,94 (2H, m, CH_2Ph), 4,89 (1H, d, $J = 1,3$ Hz, OH), 4,57 (1H, dd, $J = 13,7, 4,0$ Hz, H-6), 4,34 (1H, dd, $J = 13,8, 9,3$ Hz, H-6), 4,16 – 4,06 (1H, m, H-5), 4,00 (2H, d, $J = 4,1$ Hz, CH_2NH), 2,36 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-Ph}$) ppm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteze spojeva

U ovom radu priređeni su potencijalno biološki aktivni 1,2,3-triazolni derivati kumarina **14** – **21** i L-askorbinske kiseline, **22** i **23**. Spoj **1** je poslužio kao prekursor za sintezu kumarinskog azida **2**. Kako bi se priredio azidni derivat L-askorbinske kiseline **6** priređeni su spojevi **3**, **4** i **5**. Također su sintetizirani terminalni alkini **7** – **13**.

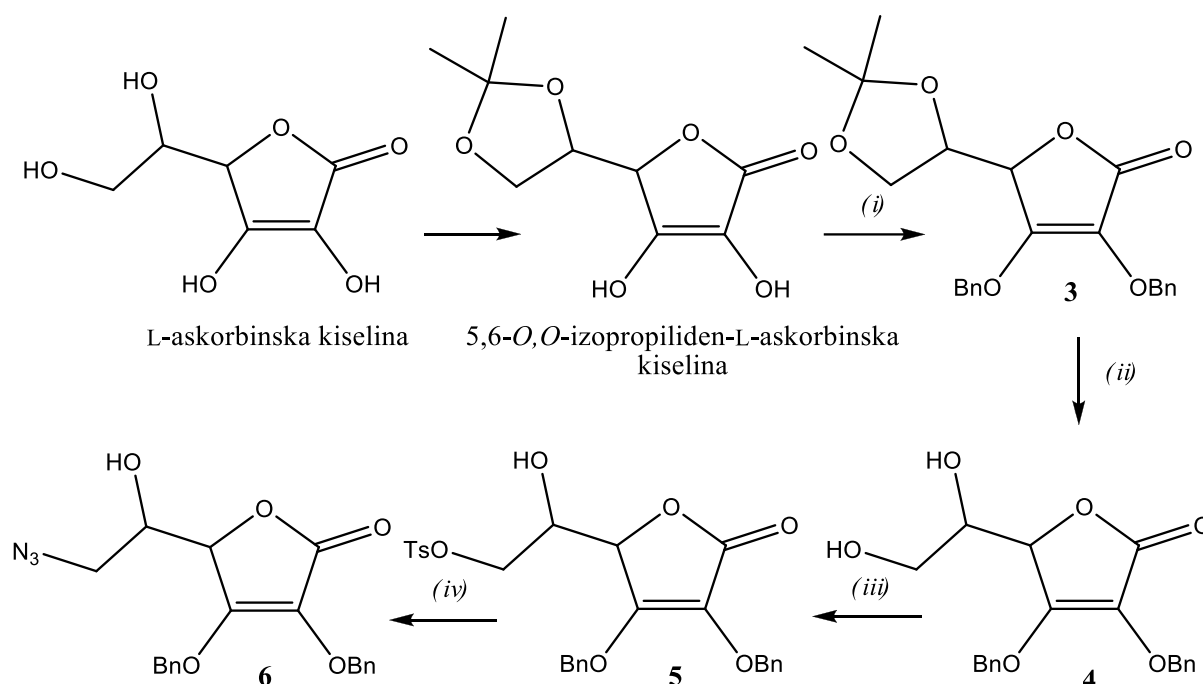
Predloženi sintetski put kojim bi se pripravili derivati kumarina s 1,2,3-triazolnim supstituentom u položaju C-4 kumarina i 1,4 disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline, uključuje „klik“ reakciju između 4-(azidometil)-7-hidroksikumarina (**2**) i različitih terminalnih alkina (**7**, **8**, **11** – **13**), te „klik“ reakciju 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline (**6**) i alkina **9** i **10**. U tu svrhu, pripremljen je 7-hidroksi-4-(klormetil)kumarin (**1**), kao prekursor za sintezu azidnog derivata kumarina, Pechmannovom ciklizacijom između rezorcinola i etil-4-kloroacetoacetata u H_2SO_4 (konc.) uz iskorištenje 58,5 %. U sljedećem koraku, reakcijom spoja **1** uz natrijev azid u acetonitrilu pripremljen je azid (**2**) uz iskorištenje 81,5 %. Spoj **2** poslužio je za uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena u kumarinsku okosnicu (shema 1).



Shema 1. (i) etil-4-kloroacetoacetat, H_2SO_4 (konc.), (ii) NaN_3 , CH_3CN

Shema 2 prikazuje sintetski put za dobivanje 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline (**6**) koji je također poslužio za uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena na položaj C-6 L-askorbinske kiseline. Za zaštitu hidroksilnih skupina na položajima C-5 i C-6 korištena je izopropilidenska zaštita. 5,6-*O,O*-izopropiliden-L-askorbinska kiselina je sintetizirana reakcijom acetil-klorida i L-askorbinske kiseline u acetonu. Za zaštitu hidroksilnih skupina na položajima C-2 i C-3 laktorskog prstena, izabrana je benzilna skupina. Spoj **3** dobiven je u

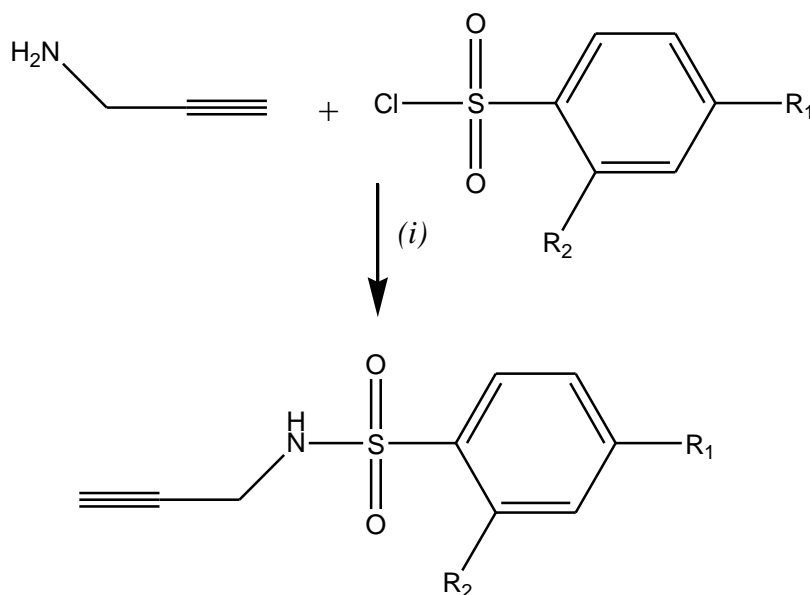
iskorištenju od 80 % benziliranjem C-2 i C-3 hidroksilnih skupina 5,6-*O,O*-izopropiliden-L-askorbinske kiseline, djelovanjem benzil-klorida i K_2CO_3 u DMF-u. Izopropilidenska zaštita uklonjena je reakcijom spoja **3** i octene kiseline u metanolu pri čemu je nastao 5,6-*O,O*-zaštićeni derivat L-askorbinske kiseline **4** u iskorištenju od 50 %. Reakcijom spoja **4** s *p*-toluensulfonil-kloridom u piridinu, izoliran je tosilatni derivat **5** u iskorištenju od 60 %. Nadalje, tosilatna skupina zamijenjena je azidnom skupinom reakcijom natrijevog azida i spoja **5** pri čemu je dobivena 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (**6**) u iskorištenju od 70 %.



Shema 2. (i) benzil klorid, K_2CO_3 , DMF (ii) octena kiselina (50 %), metanol, 70 – 80 °C, 24 h (iii) *p*-toluensulfonil-klorid, CH_2Cl_2 , piridin, 0 – 25 °C, 24 h (iv) DMF, voda, natrijev azid, 70 – 80 °C, 24 h

Sintetizirani su različiti terminalni alkini (**7** – **13**) u iskorištenjima od 11,5 % do 76,6 %, koji su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sa spojevima **2** i **6**. Sinteza spojeva **7** – **11** prikazana je na shemi 3. Reakcijom propargilamina i različito supstituiranih

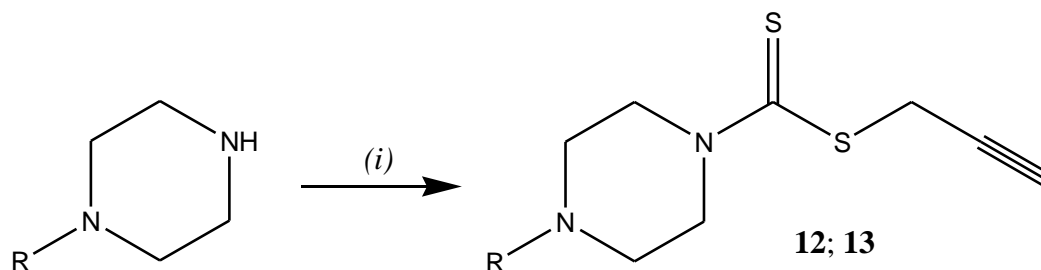
benzensulfonil-klorida priređeni su sulfonamidni terminalni alkini u iskorištenjima od 46,8 % do 76,6 %.

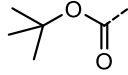


Spoj	R ₁	R ₂	I / %
7	NO ₂	H	76,6
8	F	H	73,2
9	CH ₃	H	46,8
10	Cl	H	72,5
11	F	Cl	65,7

Shema 3. (i) piridin, 0 °C do sobna temperatura, 24 h

Spojivi **12** i **13** su sintetizirani postupkom koji je prikazan na shemi 4 te su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sa spojem **2**. Spoj **12** je pripremljen reakcijom 1-boc-piperazina i propargil-bromida u acetonu, uz Na₃PO₄ · 12H₂O i ugljikov disulfid, u iskorištenju od 51,8 %. Spoj **13** sintetiziran je reakcijom 1-metilpiperazina i propargil-bromida u acetonu, uz Na₃PO₄ · 12H₂O i ugljikov disulfid u iskorištenju od 11,5%.

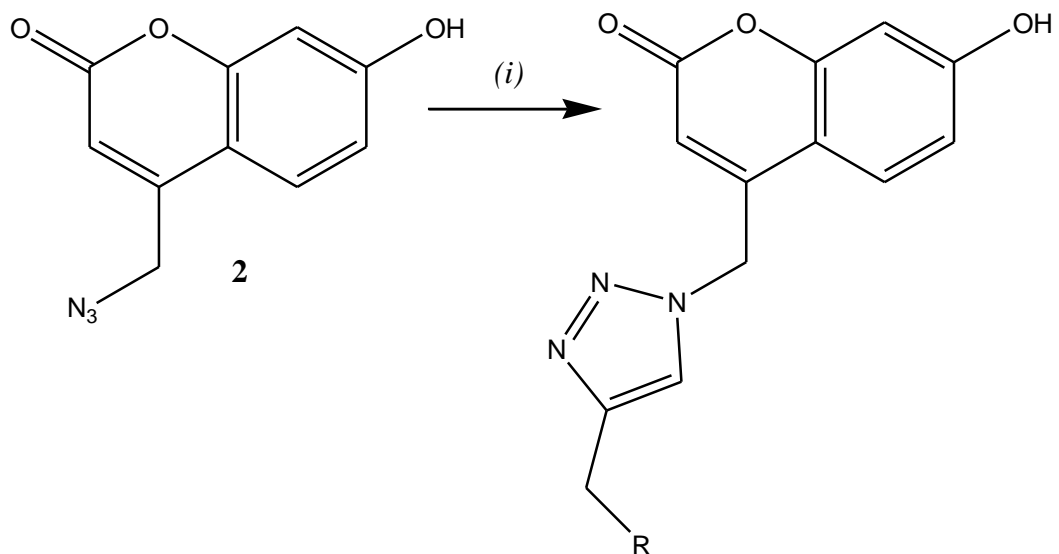


Spoj	R	I / %
12		51,8
13	CH ₃	11,5

Shema 4. (i) CS₂, Na₃PO₄ · 12H₂O, propargil-bromid, aceton, sobna temperatura

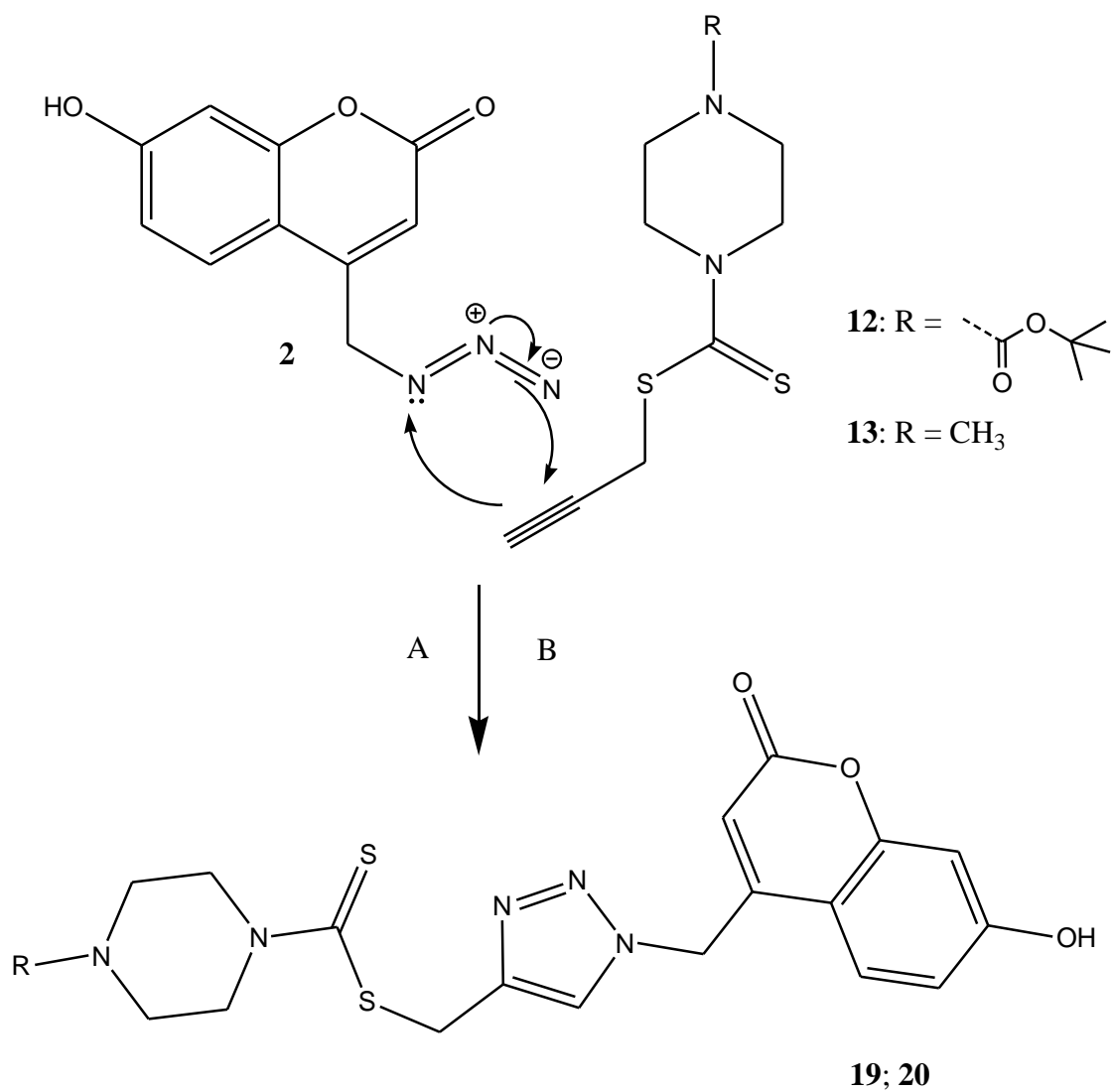
Derivati 7-hidroksikumarina s 1,2,3-triazolnim supstituentom u položaju C-4 kumarina (**14** – **18**) pripremljeni su „klik“ reakcijama potpomognutim mikrovalovima između spoja **2** i terminalnih alkina **7** – **11**. Reakcije su provedene u mikrovalnom reaktoru pri temperaturi od 80 °C i 300 W uz katalizatore Cu(0), 1M CuSO₄ u smjesi otapala DMF, voda i *tert*-butilni alkohol u omjeru 1:1:1. 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati **14** – **18** izolirani su u iskorištenjima od 6,1 % do 83,5 % (shema 5).

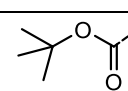
Nadalje, pripremljeni terminalni alkini **12** i **13** su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sa spojem **2** te su dobiveni triazolni derivati **19** i **20** u iskorištenjima od 51,5 % i 16,7 %. Spoj **19** je pripremljen reakcijom koja je provedena u mikrovalnom reaktoru pri temperaturi od 80 °C i 300 W uz katalizatore Cu(0), 1M CuSO₄ u smjesi otapala voda i *tert*-butilni alkohol u omjeru 1:1 (shema 6, A). Reakcija dobivanja spoja **20** je provedena na sobnoj temperaturi u smjesi otapala THF i voda u omjeru 1:1, a kao katalizator je korišten Cu(I) koji nastaje *in situ* iz CuSO₄ · H₂O uz reducens natrijev askorbat (shema 6, B).



Spoj	R	I / %
14		76,6
15		14,1
16		59,9
17		83,5
18		6,1

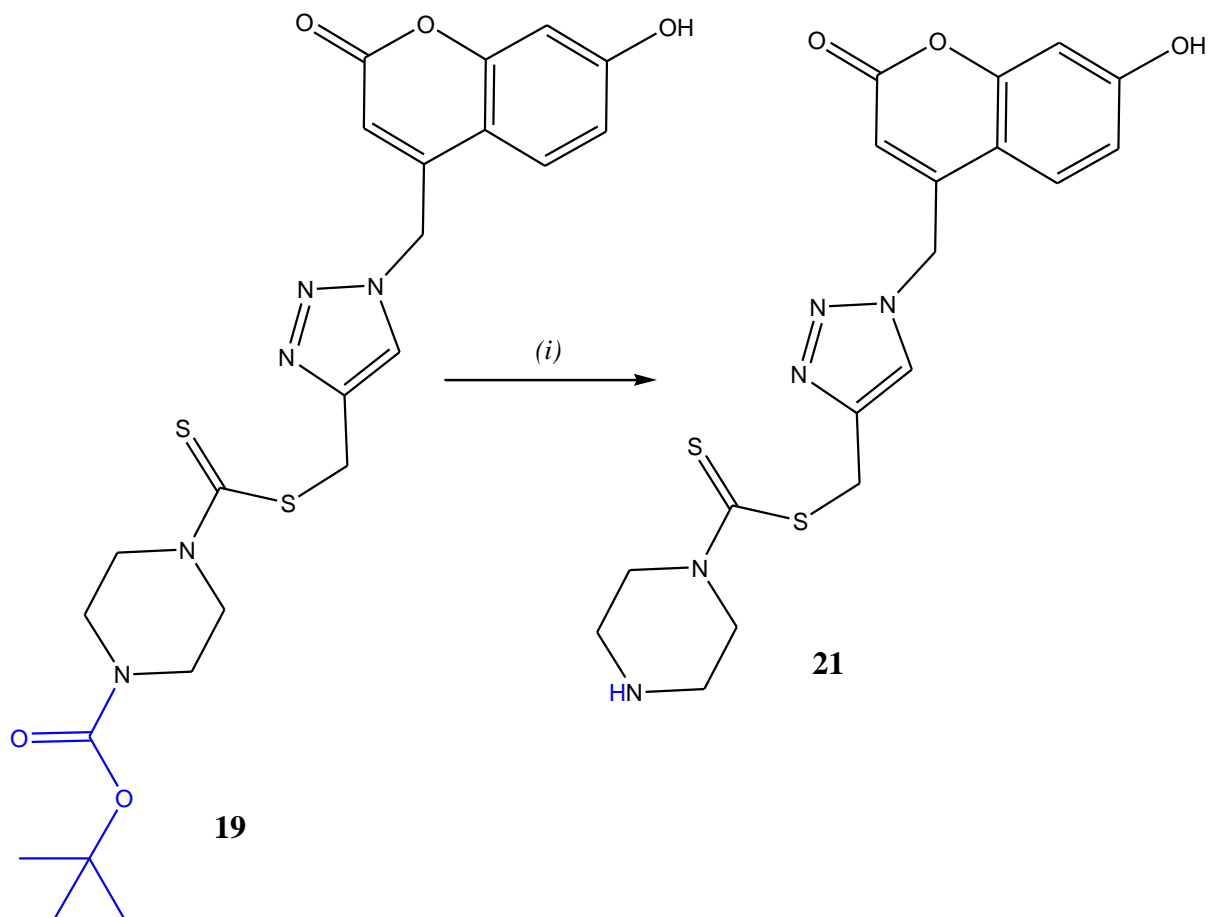
Shema 5. (i) „klik“ reakcija, MW, alkin, Cu(0), 1M CuSO₄



Spoj	R	I / %
19		50,5
20	CH ₃	50,6

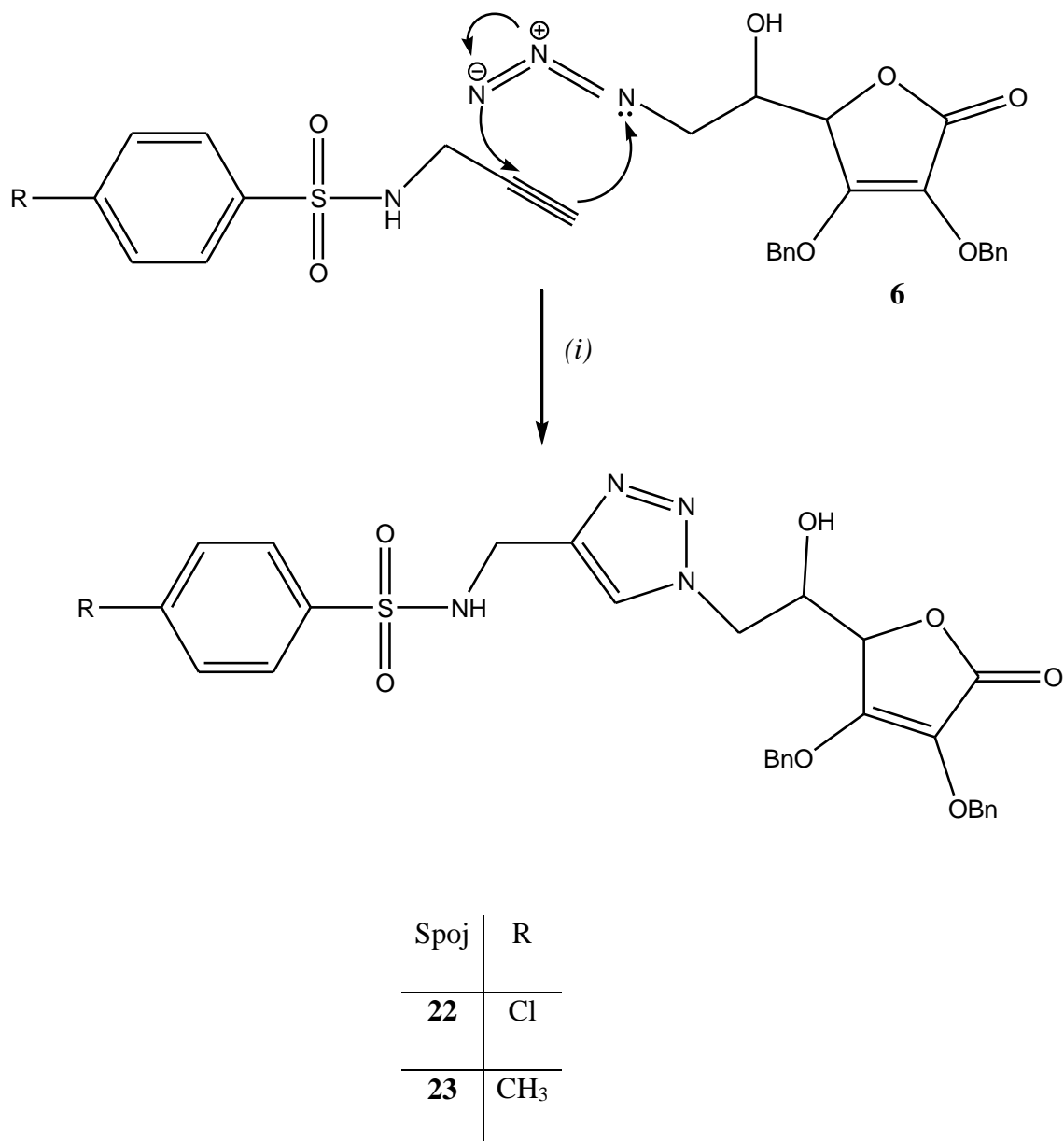
Shema 6. A: „klik“ reakcija, MW, alkin, Cu(0), 1M CuSO₄
B: alkin, natrijev askorbat, CuSO₄ · 5H₂O, sobna temperatura

1,2,3-triazolni derivat kumarina, spoj **21** pripremljen je uklanjanjem *tert*-butilkarboksilatne zaštite iz spoja **19** djelovanjem trifluoroctene kiseline u iskorištenju 40,9 % (shema 7).



Shema 7. (i) CF_3COOH , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$ sobna temperatura.

1,3-dipolarnom cikloadicijom terminalnih alkina **9** i **10** i 6-azido-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline (**6**) dobiveni su 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline **22** i **23**. Reakcije su provedene u mikrovalnom reaktoru pri temperaturi od $80\text{ }^\circ\text{C}$ i 300 W uz katalizatore $\text{Cu}(0)$, 1M CuSO_4 u smjesi otapala DMF, voda i *tert*-butilni alkohol u omjeru 1:1:1. 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati **22** i **23** sintetizirani su u iskorištenjima od 50,5 % i 50,6 % (shema 8).

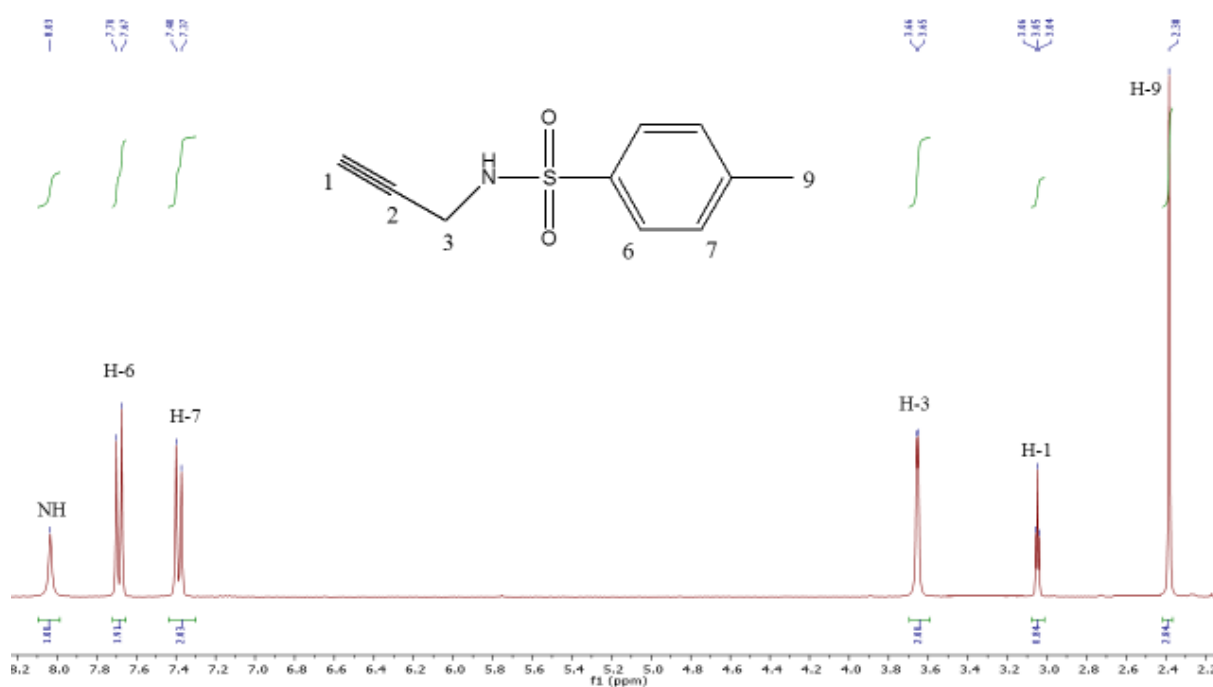


Shema 8. (i) „klik“ reakcija, MW, alkin, Cu(0), 1M CuSO₄

4.2. Analiza spektara ¹H-NMR

Strukture spojeva **1** – **23** određene su na temelju kemijskih pomaka, veličine signala, veličine i multipliciteta rezonancije te sprega spin-spin između jezgara H-H. Spektri ¹H-NMR za spojeve **1**, **2**, **14** – **21** sadrže karakteristične signale za protone kumarinskog prstena H-3, H-6, H-7, H-9, signal za –OH skupinu (~10,5 ppm) te signal za metilensku prenosnicu H-1'.

Prisustvo triazolnog prstena u molekuli potvrđeno je karakterističnim signalom H-3' u aromatskom području spektra (~8 ppm). U spektrima $^1\text{H-NMR}$ spojeva **7** – **11** koji sadrže fenilni supstituent u svojoj strukturi, prisutni su odgovarajući signali H-6' i H-7' u aromatskom području (~8 ppm) koji su pomaknuti prema višim, odnosno nižim poljima ovisno o supstituentu na benzenskom prstenu, signal za NH (~8,5 ppm), te H-3 signal (~4 ppm). Spektri $^1\text{H-NMR}$ spojeva **22** i **23** sadrže karakteristične signale u aromatskom području koji odgovaraju fenilnim protonima benzilne skupine te karakteristične signale koji odgovaraju fenilnom supstituentu koji dolazi od alkina. Nadalje, prisutan je signal koji odgovara NH protonu (~8 ppm), karakteristični signal H-7 (~8 ppm) kojim je potvrđeno prisustvo triazolnog prstena, signali koji odgovaraju H-4, H-5 i H-6 protonima, hidroksilnoj skupini na položaju C-5 L-askorbinske kiseline te signale za metilenske protone koji povezuju benzensulfonamidni dio s triazolom.



Slika 26. Spektar $^1\text{H-NMR}$ spoja **9**

4.3. Ispitivanje antibakterijskog djelovanja *in vitro*

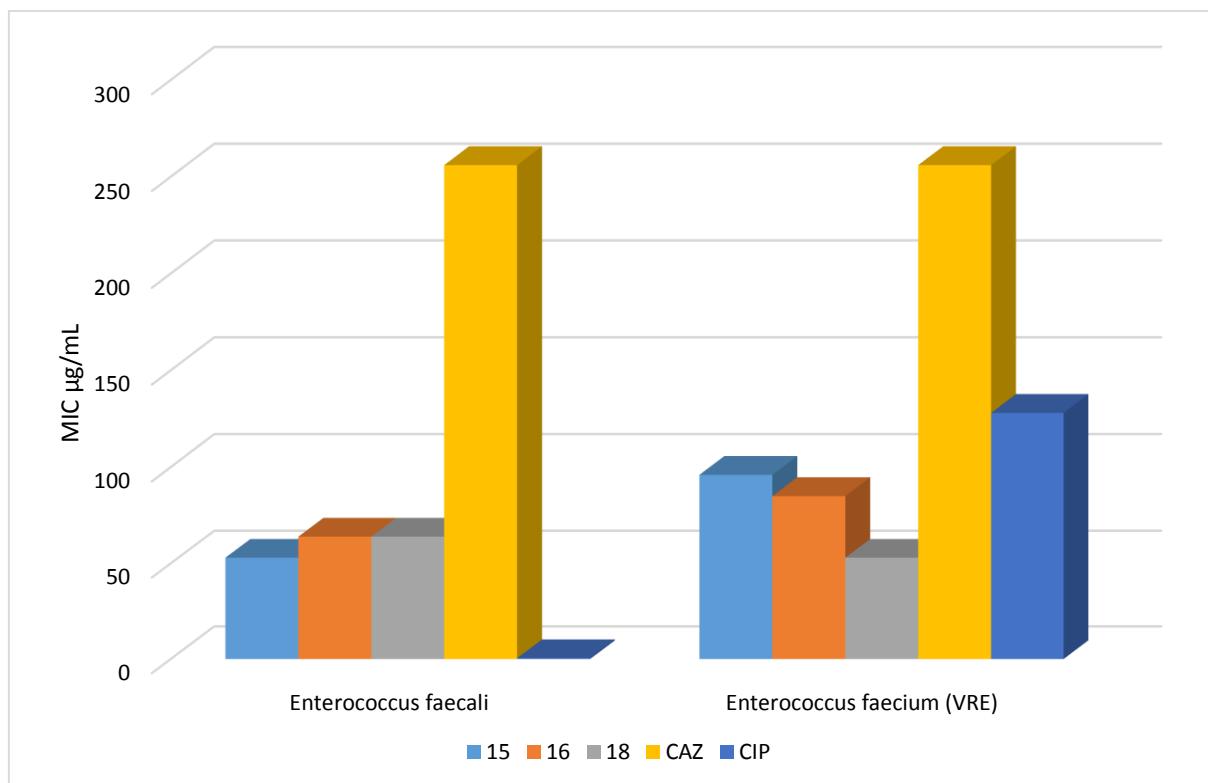
Antibakterijsko djelovanje spojeva **14** – **19** i **21** ispitano je na osam bakterijskih vrsta, četiri Gram-pozitivne: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecali*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* (VRE: rezistentan na vankomicin) i četiri Gram-negativne: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25925), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL). U tablici 1 su prikazani rezultati djelovanja spojeva **14** – **19** i **21**, te antibiotika ceftazidim (CAZ) i ciprofloksacin (CIP).

Rezultati antibakterijskih ispitivanja su pokazali da ispitani spojevi ne pokazuju antibakterijsko djelovanje na Gram-negativne bakterijske vrste. Spojevi **15**, **16** i **18** pokazuju učinkovita djelovanja na Gram-pozitivne bakterijske vrste: *Enterococcus faecali* i *Enterococcus faecium* (VRE). Spoj **16** koji sadrži *p*-metilfenilni supstituent ima učinkovitije djelovanje na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecium* (VRE) (MIC = 53 µg/ml) od spojeva **15** i **18** (MIC = 96 µg/ml).

Tablica 1. Rezultati antibakterijskih ispitivanja za spojeve **14** – **19** i **21**.

Bakterijska vrsta	Supstanca MIC µg/mL							Antibiotici µg/mL	
	14	15	16	17	18	19	21	CAZ	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	8	<0.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	>256	53	64	>256	53	>256	>256	256	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	16	<0.25
<i>Enterococcus faecium</i> VRE	>256	96	53	>256	96	>256	>256	>256	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	1	<0.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25925	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	<0.25	<0.25
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	4	<0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	64	256

Spojevi **15**, **16** i **18** (MIC = 53 $\mu\text{g/ml}$; MIC = 64 $\mu\text{g/ml}$; MIC = 53 $\mu\text{g/ml}$) pokazuju bolju učinkovitost od antibiotika ceftazidim (CAZ) (MIC = 256 $\mu\text{g/ml}$) na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecali*, te su učinkovitiji od oba ispitana antibiotika na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecium* (VRE). Spojevi **15** i **18** (MIC = 53 $\mu\text{g/ml}$) su djelotvorniji od spoja **16** (MIC = 64 $\mu\text{g/ml}$) protiv bakterijske vrste *Enterococcus faecalis*.



Slika 29. Usporedba antibakterijskog djelovanja spojeva **15**, **16** i **18** i antibiotika CAZ i CIP

5. ZAKLJUČCI

- Pechmannovom ciklizacijom pripremljen je klorirani derivat kumarina **1** koji je poslužio kao prekursor za sintezu kumarinskog azida **2**.
- Sintezi azida L-askorbinske kiseline **6** prethodio je sintetski put kojim su priređeni spojevi **3**, **4** i **5**.
- Sintetizirani su različiti terminalni alkini (**7** – **13**) s iskorištenjima 11 – 76 %, koji su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji sa spojevima **2** i **6**.
- Regioselektivnom 1,3-dipolarnom cikloadicijom terminalnih alkina i azida, uspješno su sintetizirani ciljani 1,4-disupstituirani derivati 1,2,3-triazola i kumarina (**14** – **21**), te derivati 1,2,3-triazola i L-askorbinske kiseline (**22** – **23**). Sinteza ciljanih konjugata **14** – **18**, **20** i **22** – **23**) odvijala se primjenom mikrovalova pri temperaturi od 80 °C i 300 W uz katalizatore Cu(0), 1M CuSO₄ u smjesi vode i organskih otapala, a sinteza spoja **19** pri sobnoj temperaturi te je kao katalizator korišten Cu(I) koji nastaje *in situ* iz CuSO₄xH₂O uz reducens natrijev askorbat. Spoj **21** je uspješno pripremljen iz spoja **19** djelovanjem trifluoroctene kiseline.
- Novopripremljenim spojevima potvrđena je struktura primjenom spektroskopije ¹H-NMR i ¹³C-NMR.
- Rezultati ispitivanja antibakterijskog djelovanja spojeva **14** – **19** i **21** na osam bakterijskih vrsta, četiri Gram-pozitivne: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecali*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* (VRE) i četiri Gram-negativne: *Pseudomonas aerigonsa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25925), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) pokazuju da ispitani spojevi ne pokazuju učinkovito djelovanje na Gram-negativne bakterijske vrste. Spojevi **15** (MIC = 53 µg/ml), **16** (MIC = 64 µg/ml) i **18** (MIC = 64 µg/ml) pokazuju bolju učinkovitost od antibiotika ceftazidim (CAZ) (MIC = 256 µg/ml) na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecali*, te su učinkovitiji od oba ispitana antibiotika na Gram-pozitivnu bakterijsku vrstu *Enterococcus faecium* (VRE).

- Antiproliferativna ispitivanja novih spojeva na zloćudne stanice tumora su u tijeku.

6. LITERATURA

1. C. Avendano, J.C. Menendez, *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2008.
2. C. Viegas-Junior, A. Danuello, B.V. da Silva, E.J. Barreiro, C.A. Fraga, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 1829 – 1852.
3. J. M. Contelles, E. Soriano, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, **11**, 2714 – 2715.
4. I. Kosiova, S. Kovackova, P. Kois, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **63**, 312 – 320.
5. K. Wittine, M. Stipković Babić, D. Makuc, J. Plavec, S. Kraljević Pavelić, M. Sedić, K. Pavelić, P. Leyssen, J. Neyts, Jan Balzarini, M. Mintas, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 3675–3685.
6. B. H. J. Bielski, *Chemistry of ascorbic acid radicals*, American Chemical Society, Washington D.C., 1982, 81–100.
7. K. M. Amin, A. A. M. Eissa, S. M. Abou-Seri, F. M. Awadallah, G. S. Hassan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **60**, 187 – 198.
8. K. Aslam, M. K. Khosa, N. Jahan, S. Nosheen, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2010, **23**, 449 – 454.
9. S. Ćavar, F. Kovač, M. Maksimović, *Food Chem.*, 2009, **117**, 135 – 142.
10. S. Saker, L. Nahar, *Chemistry of Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry*, 2007, 363 – 366.
11. S. Saker, L. Nahar, *Chemistry of Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry*, John Wiley and Sons, 2007, 363 – 366.
12. M. Molnar, M. Čačić, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **3**, 55 – 64.
13. J. C. Frisvad, P. Skoube, R. A. Samson, *Syst. Appl. Microbiol.*, 2005, **28**, 442 – 453.
14. B. Ramesh, K. V. Pugalendi, *Yale J. Biol. Med.*, 2005, **78**, 131 – 138.
15. K. Nepali, S. Sharma, M. Sharma, P. M. S. Bedi, K. L. Dhar, *Europ. J. Med. Chem.*, 2014, **77**, 422 – 487.
16. S. Sandhu, Y. Bansal, O. Silakari, G. Bansal, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 3806 – 3814.
17. J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, Fifth Edition, Wiley, 2010.
18. T. Eicher, S. Hauptmann, *The Chemistry of Heterocycles*, Second Edition, Wiley, 2003.
19. W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 1536.
20. E. H. Da Cruz, C. M. Hussene, G. G. Dias, E. B. Diogo, I. M. de Melo, B. L. Rodrigues, M. G. da Silva, W. O. Valença, C. A. Camara, R. N. de Oliveira, Y. G. de Paiva, M. O.

- Goulart, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, Júnior E.N da Silva, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 1608 – 1619.
21. A. H. Kategaonkar, P. V. Shinde, S. K. Pasale, B. B. Shingate, M. S. Shingare, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 3142–3146.
22. S. Kamijo, T. Jin, Z. Huo, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* 2004, **69**, 2386
23. L. V. R. Reddy, P. V. Reddy, N. N. Mishra, P. K. Shukla, G. Yadav, R. Srivastava, A. K. Shaw, *Carbohydrate Research*, 2010, **345**, 1515.
24. P. Cchitpepu, V. R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. chem.*, 2008, **16**, 8427.
25. S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 2696 – 2718.
26. W. Zhang, Z. Li, M. Zhou, F. Wu, X. Hou, H. Luo, X. Han, R. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 799 – 807.
27. L. B. Peterson, B. S. Blagg, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 2010, **20**, 3957.
28. D. D. Soto-Ortega, B. P. Murphy, F. J. Gonzales-Velasquez, K. A. Wilson, F. Xie, Q. Wang, M. A. Moss, *Bioorg. Med. Chem*, 2011, **19**, 2596.
29. T. Gazivoda, M. Plevnik, J. Plavec, S. Kraljević, M. Kralj, K. Pavelić, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, S. Raić-Malić, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 131 – 139.
30. N. Smirnoff, *Ann Bot*, 1996, **78**, 661 – 669.
31. G. R. Buettner, B.A. Jurkiewicz, *Radiation Research*, 1996, **145**, 532 – 541.
32. J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1826**, 443 – 457.
33. K. Wittine, M. Stipković Babić, D. Makuc, J. Plavec, S. Kraljević Pavelić, M. Sedić, K. Pavelić, P. Leyssen, J. Neyts, Jan Balzarini, M. Mintas, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 3675 – 3685.
34. B. H. J. Bielski, Chemistry of ascorbic acid radicals, *Am. Chem. Soc.*, Washington D.C., 1982, 81 – 100.
35. M. M. Khan, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 7104 – 7111.
36. S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, *J. Am. Stud.*, 2003, **22**, 18 – 35.
37. K. Tanaka, T. Hashimoto, S. Tokumara, H. Iguchi, S. Kojo, *J. Nutr.*, 1997, **127**, 2060 – 2064.
38. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng*, 2001, **40**, 2004 – 2021.
39. J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao, P.G. Wang, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012, **7**, 489 – 500.
40. A. Dog, H. Durman, V. Kirmizi, G. Hizal, V. Tunca, *Polym. Chem.*, 2010, **1**, 621 – 623.

41. G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Giovanni Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rew.*, 2008, **28**, 278 – 298.
42. B. Lee, H. Bae Jeon, K. Kwan Soo, *Tet. Lett.*, 2006, **47**, 5105 – 5109.
43. <http://www.organic-chemistry.org>
44. R. Husigen, G. Szeimies, L. Mobius, *Chem. Ber.*, 1967, **100**, 2494.
45. M. M. Majireck, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.*, 2008, **71**, 8680.
46. C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057 – 3064.
47. R. Husigen, G. Szeimies, L. Mobius, *Chem. Ber.*, 1967, **100**, 2494.
48. J. F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2008, **60**, 958 – 959.
49. V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, **1**, 51 – 58.
50. A. Dog, H. Durman, V. Kirmizi, G. Hizal, V. Tunca, *Polym. Chem. I*, 2010, 621 – 623.
51. S. Raić-Malić, D. Svedružić, T. Gazivoda, A. Marunović, A. Hergold-Brundic, A. Nagl, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 4806 – 4811.

7. ŽIVOTOPIS

Ivana Kovačić rođena je 04. travnja 1990. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završila je u Maloj Subotici, nakon čega upisuje Opću gimnaziju u Čakovcu. Maturirala je 2009. godine s odličnim uspjehom i iste godine upisala preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Za vrijeme fakultetskog obrazovanja odradila je stručnu praksu u Plivi d.o.o. u Laboratoriju za istraživanje i razvoj. Završni rad izradila je na Zavodu za fizikalnu kemiju uz mentorstvo izv. prof. dr. sc. Jelene Macan s temom *Utjecaj prirode prekursora na pripremu poroznog SiO₂ sol-gel postupkom*. 2013. godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2014. sudjelovala je na 15. Međunarodnoj školi kromatografije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Popis priopćenja:

- I. Cazin, I. Kovačić, A. Meščić, V. Stepanić, S. Raić-Mailć, 1,2,3-triazole appended L-ascorbic acid with antioxidant properties // 24. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, 21.-24.4.2015. (poster)