

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Nina Markota

**DIZAJN I SINTEZA 1,3,4,-OKSADIAZOLA S KUMARINSKOM
SKUPINOM**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primjenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za kemiju i ekologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstvenopodručje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Opća i anorganska kemija
Tema rada je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Odbora za diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, održanoj 30. 04. 2013.
Mentor: *doc. dr. sc. Milan Čačić*
Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc. Maja Molnar*

DIZAJN I SINTEZA 1,3,4-OKSADIAZOLA S KUMARINSKOM SKUPINOM

Nina Markota 165-DI

Sažetak:

Kumarin (2*H*-kromen-2-on) i njegovi derivati su vrlo važna skupina heterocikličkih organskih spojeva koji se nalaze u različitim biljnim vrstama, a posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti. Zbog izražene biološke aktivnosti intenzivno se istražuju novi putevi i metode sinteze najrazličitijih heterocikličkih prstenastih sustava s kumarinskom jezgrom.

Posebna pozornost ovog rada usmjerena je na dizajn i sintezu novih 1,3,4-oksadiazola. Oksadiazol je važan heterociklički prsten koji predstavlja raznolikost biološke aktivnosti molekula uključujući fungicidalno, bakterijsko, antikancerogeno te antituberkulozno djelovanje. Dobiveni spojevi su pročišćeni prekrizacijom, te su im određene točke tališta i elementarni sastav. Struktura novosintetiziranih spojeva potvrđena je elementarnom mikroanalizom, te ¹H-NMR, IR spektrometrijom i spektrometrijom masa.

Ključne riječi: Kumarini, 1,3,4-oksadiazoli, biološka aktivnost

Rad sadrži: 56 stranica
41 slika
3 tablice
47 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	predsjednik
2. doc. dr. sc. <i>Milan Čačić</i>	član-mentor
3. doc. dr. sc. <i>Maja Molnar</i>	član
4. doc. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i>	zamjena člana

Datum obrane: 18. srpnja 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Chemistry and Ecology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: General and inorganic chemistry
Thesis subject was approved at a meeting of the Committee for final exams and graduation at its session no. VI. held on April 24, 2013.
Mentor: *Milan Čačić, PhD, assistant professor*
Technical assistance: *Maja Molnar, PhD, assistant professor*

DESIGN AND SYNTHESIS 1,3,4-OXADIAZOLES WITH COUMARINE GROUP

Nina Markota 165-DI

Summary:

Coumarin (2H-chromen-2-one) and its derivatives are important group of heterocyclic organic compounds found in many different plant species. They possess a wide spectrum of biological activities and thus the synthesis of various coumarin nucleus-containing heterocyclic ring systems are intensively explored.

This paper gives special attention to design and synthesis of new 1,3,4-oxadiazoles. Oxadiazole is an important heterocyclic ring present in variety of biologically active molecules inclusive of fungicidal, bactericidal, anticancer and antitubercular activities. The reaction progress was monitored with a thin layer chromatography, novel compounds were purified by recrystallization and the melting points were determined, as well as their structure. The structure of newly synthesized compounds is confirmed by elemental microanalysis, ¹H-NMR, IR spectrometry and mass spectrometry.

Key words: Coumarine, 1,3,4-oxadiazoles, biological activity

Thesis contains: 56 pages
41 figures
3 tables
47 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Ivica Strelec</i> , associate prof. | chair person |
| 2. <i>Milan Čačić</i> , assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Maja Molnar</i> , associate prof. | member |
| 4. <i>Dajana Sokač-Gašo</i> , associate prof. | stand-in |

Defense date: July 18, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovom se prilikom zahvaljujem svim kolegama i djelatnicima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta koji su bili na raspolaganju i spremni pomoći sve godine studiranja.

Posebno želim istaknuti mentora, doc. dr. sc. Milana Čačića zbog pružene pomoći i prenesenog znanja tijekom izrade diplomskog rada kao i tijekom proteklih akademskih godina.

Iznimno zahvaljujem roditeljima koji su mi omogućili fakultetsko školovanje. Hvala im na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju. Naposljetku, hvala svima onima koji su na bilo koji način pridonijeli da fakultet uspješno privedem kraju.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KUMARINI	4
2.1.1. Struktura i primjena kumarina.....	4
2.1.2. Derivati kumarina	6
2.1.3. Podjela kumarina.....	9
2.1.4. Dobivanje kumarina.....	10
2.1.4.1. Sinteza kumarina u biljkama	10
2.1.4.2. Laboratorijska sinteza kumarina.....	11
2.1.5. Kemijska svojstva kumarina i hidroksikumarina	14
2.1.5.1. Kemijska svojstva kumarina	14
2.1.5.2. Kemijska svojstva hidroksikumarina.....	15
2.1.6. Fizikalna svojstva kumarina i hidroksikumarina	16
2.1.6.1. Fluorescencija	16
2.1.6.2. UV spektrometrija.....	18
2.1.6.3. IR spektrometrija	19
2.1.6.4. Spektrometrija masa	20
2.1.6.5. ¹ H-NMR spektrometrija	21
2.1.7. Biološka svojstva kumarina i hidroksikumarina	23
2.2. 7-HIDROKSIKUMARIN-4-OCTENA KISELINA	24
2.2.1. Hidrazidi karboksilnih kiselina.....	24
2.2.1.1. Dobivanje hidrazida.....	24
2.2.1.2. Svojstva i primjena hidrazida.....	25
2.3. HETEROCIKLIČKI SPOJEVI.....	26
2.3.1. Peteročlani heterocikli	27
2.4. 1,3,4-OKSADIAZOLI.....	28
2.4.1. Farmakološka aktivnost 1,3,4-oksadiazola.....	29
2.4.1.1. Antimikrobno i antiepileptično djelovanje.....	29
2.4.1.2. Antivirusno i antitumorsko djelovanje	30
2.4.2. Metode sinteza 2,5-disupstituiranih 1,3,4-oksadiazola	30
2.4.2.1. Metode sinteza 5-supstituiranih-2-amino-1,3,4-oksadiazola	30
2.4.2.2. Metode sinteze za 5-supstituirani-1,3,4-oksadiazol-2-tiola.....	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	36
3.1. ZADATAK DIPLOMSKOG RADA	37
3.2. MATERIJALI I METODE.....	37
3.3. SHEMATSKI PRIKAZ ZADATKA.....	38
3.4. SINTEZA (7-HIDROKSI-2-OKSO-2 <i>H</i> -KROMEN-4-IL) OCTENE KISELINE	39
3.5. SINTEZA (7-HIDROKSI-2-OKSO-2 <i>H</i> -KROMEN-4-IL) METILNOG ESTERA OCTENE KISELINE.....	40
3.6. SINTEZA HIDRAZIDA NA BAZI (7-HIDROKSI-2-OKSO-2 <i>H</i> -KROMEN-4-IL) OCTENE KISELINE.....	41
3.7. SINTEZA 7-HIDROKSI-4-((5-MERKAPTO-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)METIL) -2 <i>H</i> -KROMEN-2-ONA.....	42
3.8. SINTEZA 7-HIDROKSI-4-((5-ALKILTIO-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)METIL) -2 <i>H</i> -KROMEN-2-ONA.....	43
3.9. SINTEZA N'-FORMIL-2-(7-HIDROKSI-2-OKSO-2 <i>H</i> -KROMEN-4-IL) ACETOHIDRAZIDA	45
3.10. SINTEZA 4-((1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)METIL)-7-HIDROKSI-2 <i>H</i> -KROMEN -2-ONA	46
4. REZULTATI I RASPRAVA	47
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA	52

1.UVOD

Kumarin (2H-kromen-2-on) i njegovi derivati su heterociklički spojevi. Nalaze se u različitim biljnim vrstama, a mnogi od njih pokazuju značajnu biološku aktivnost. Upravo zbog tog svojstva istražuju se novi putevi i metode sinteze različitih kumarinskih struktura.

Zbog svoje aromatičnosti nekada se dodavao u hranu kao čista tvar, zbog slatko-svježeg mirisa koji podsjeća na sijeno i vaniliju, te okusa s gorkim podtonom. Zbog svojih organoleptičkih svojstava bio je omiljen dodatak duhanskim aromama, a kao dodatak koristi se i u pastama za zube, sapunima te parfemima.

Zbog svoje izražene biološke i fiziološke aktivnosti mnogi kumarini se mogu upotrebljavati kao ljekoviti preparati s hipotermičkim, antikoagulativnim, antimikrobnim te protuupalnim djelovanjem.

U ovom diplomskom radu naglasak je stavljen na sintezu 1,3,4-oksadiazola sa kumarinskom jezgrom čija će biološka aktivnost biti naknadno ispitana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KUMARINI

2.1.1. Struktura i primjena kumarina

Kumarini su prirodni spojevi široko zastupljeni u biljnom svijetu. Nalazimo ih u cimetu, lavandi, jagodama, slatkoj djetelini, trešnjama te u još nekim biljkama. Također mogu biti i produkti metabolizma životinja ili se dobivaju sintetskim putem (Vogel, 1820.).



a)



b)



c)

Slika 1 Prirodni izvori kumarina: slatka djetelina (a), lavanda (b) i jagoda (c)

U prirodi je nađeno oko 500 spojeva, jednostavnih derivata kumarina koji se uglavnom nalaze u slobodnom obliku te vrlo mali broj u formi glikozida.



a)



b)

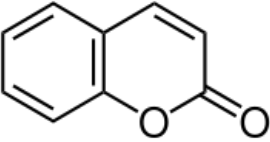
Slika 2 Drvo tonkovca *Dipteryx odorata* (a) i plodovi tonkovca (b)

Kumarin je prvi puta izoliran 1829. godine iz plodova tropskog drveta tonkovca (*Dipteryx odorata*), a izolirao ga je A. Vogel. Znanstvena istraživanja su pokazala da već vrlo male doze kumarina mogu značajno oštetiti jetra i bubrege, posebno kod osjetljivih ljudi. Dokazano je njegovo hepatotoksično djelovanje (Vogel, 1820.).

Zbog moguće opasnosti po zdravlje udio kumarina u hrani i zakonski je ograničen. Njegova koncentracija u prehrambenim proizvodima, u koje može dospjeti kao prirodna sastavnica nekih prirodnih aroma i biljnih ekstrakata, ograničena je na maksimalnih 2 mg/kg. Izuzetno je dopušteno do 10 mg/kg u određenim vrstama karamela, 50 mg/kg u gumama za žvakanje i 10 mg/l u alkoholnim pićima.

Kumarin (2*H*-kromen-2-on) je prirodna komponenta koja posjeduje intenzivnu aromu svježeg sijena. Zajedno s lavandom i hrastovom mahovinom čini osnovu mirisa "fougere" - suhu travnato-drvenastu aromu. Sam naziv „coumarin“ potiče od francuskog „coumarou“ što znači „mahune Tonke". Zaslužan za njegovu sintezu (1868.) je engleski kemičar W. H. Perkin koji je uspio dobiti kumarin zagrijavanjem aldehida s anhidridom, a danas ovaj način dobivanja kumarina nosi naziv Perkinova sinteza (Lin i sur., 1798.).

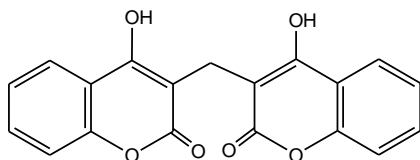
Tablica 1 Osnovne fizikalno-kemijske karakteristike kumarina

KUMARIN	
Kemijsko ime (IUPAC)	2 <i>H</i> -kromen-2-on
Kemijska formula	C ₉ H ₆ O ₂
Molarna masa	146,14 g/mol
Točka tališta	71 °C
Točka vrelišta	301 °C
Gustoća	0,935 g/cm ³
Agregatno stanje	bezbojni prah
Topljivost	1,7 g/l (T _{H₂O} = 20 °C)
LD ₅₀	293 mg/kg (štakori)
	

2.1.2. Derivati kumarina

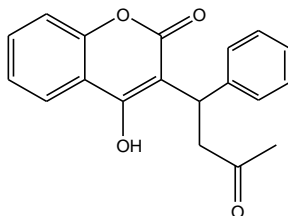
U prirodi je pronađen značajan broj spojeva s kumarinskom jezgrom. Kumarinski derivati se nalaze u različitim dijelovima biljaka – više u korjenju, kori i plodovima, a u manjoj mjeri se javljaju u listovima i stablu (Kuznecova, 1967.).

Jedan od prirodnih derivata kumarina je dikumarol odnosno 3,3-metilen-bis-4-dihidroksikumarin, koji je antikoagulans. K. P. Link i suradnici su ga izolirali 1941. godine. Dikumarol je antagonist vitamina K, on djeluje tako da sprječava odnosno inhibira sintezu protrombina u jetri, čime se produžava vrijeme normalne koagulacije krvi. Protrombin izaziva grušanje krvi jer se pretvara u netopljivi trombin.



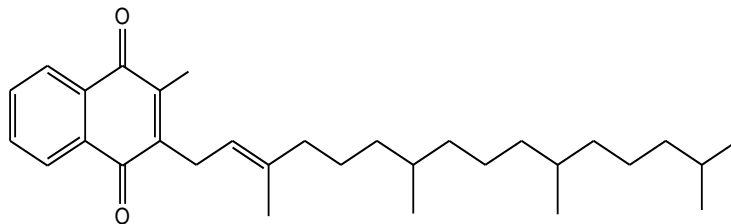
Slika 3 Dikumarol

Još jedan antikoagulans s kumarinskom jezgrom je i varfarin ili 4-hidroksi-3-(3-okso-1-fenilbutil)-2*H*-kromen-2-on, koji spada u skupinu 4-hidroksikumarina. Varfarin je prvotno korišten kao otrov za štakore, ali su ga s vremenom zamijenili učinkovitiji i brži otrovi (Borges i sur., 2005.).



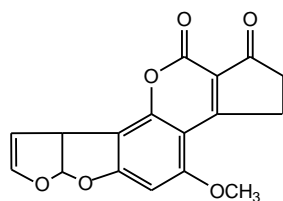
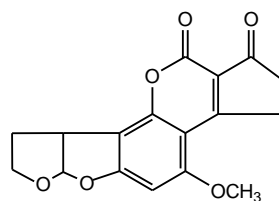
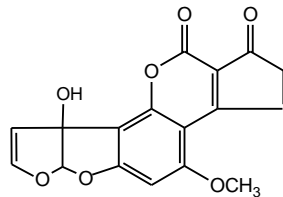
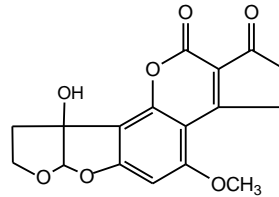
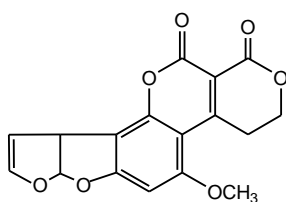
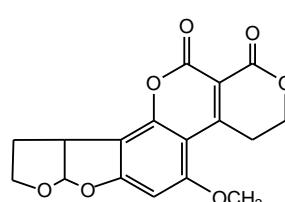
Slika 4 Varfarin

Prema djelovanju spada među antagoniste vitamina K ((*E*)-2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametilheksadek-2-enil) naftalen-1,4-diona), koji je neophodan za normalnu sintezu faktora zgrušavanja II, VII, IX i X. Namirnice koje sadrže vitamin K (špinat, brokula, cvjetača) mogu stupiti u interakcije s varfarinom i smanjiti antikoagulantni učinak.



Slika 5 Vitamin K

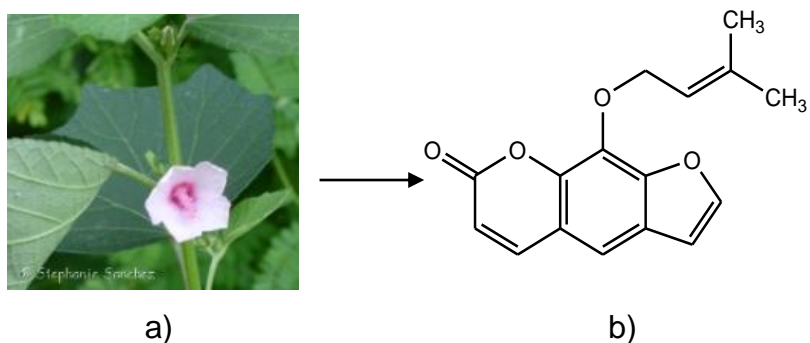
Za razliku od prethodno navedenih spojeva, u prirodi se javlja još jedna serija derivata kumarina koji su zbog svoje kancerogenosti štetni za zdravlje kako ljudi tako i životinja. To su aflatoksin, toksični metaboliti plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*.

AFLATOKSIN B₁AFLATOKSIN B₂AFLATOKSIN M₁AFLATOKSIN M₂AFLATOKSIN G₁AFLATOKSIN G₂

Slika 6 Strukture pojedinih aflatoksina

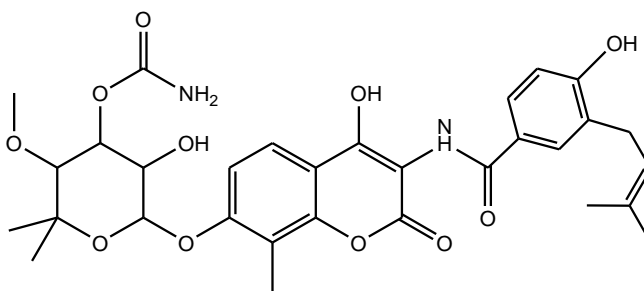
Ove plijesni se pojavljuju na uskladištenom kukuruzu, žitu, kikirikiju. Aflatoksini su lipofilni, termostabilni spojevi koji spadaju u skupinu mikotoksina. Oni su osjetljivi na UV-svjetlo pod kojim pokazuju karakterističnu plavu ili zelenu fluorescenciju prema kojoj su dobili i ime (B – blue → plava fluorescencija; G – green → zelena fluorescencija). Zaraziti se možemo direktno, konzumiranjem hrane kontaminirane navedenim plijesnimima i indirektno, konzumiranjem mlijeka životinja koje su hranjene plijesnivim krmivom. Osim u mlijeku, aflatoksini se mogu naći i u urinu i fekalijama. Aflatoksini mlijeka (M_1 i M_2) su hidroksilirani derivati aflatoksina B_1 i B_2 . Izrazitu kancerogenost ima aflatoksin B_1 , dok su aflatoksini G_1 , B_2 , M_1 slabije kancerogeni; G_2 i M_2 nemaju dokazanu kancerogenost (De Long i sur., 1964.).

Imperatorin ili 9-(3-metilbut-2-enoksi)-7-furo[3,2-g] kromenon je također spoj s kumarinskom jezgrom koji se u medicini koristi kao lijek s antikancerogenim svojstvima, a izoliran je iz biljke *Urena lobata*.



Slika 7 *Urena lobata* (a) i iz nje izolirani imperatorin (b)

Još jedan od derivata kumarina koji pokazuje bakteriostatsko djelovanje je i novobiocin ili 5-hidroksi-6-(4-hidroksi-3-(4-hidroksi-3-(3-metilbut-2-enil)benzamid)-8-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)-3-metoksi-2,2-dimetil-tetrahidro-2*H*-piran-4-il karbamat, koji se nekada koristio za liječenje tuberkuloze (Karah i sur., 2000.), a inhibira sintezu RNA.



Slika 8 Novobiocin

2.1.3. Podjela kumarina

Prema prisutnim supstituentima kumarini se mogu podijeliti na slijedeće grupe:

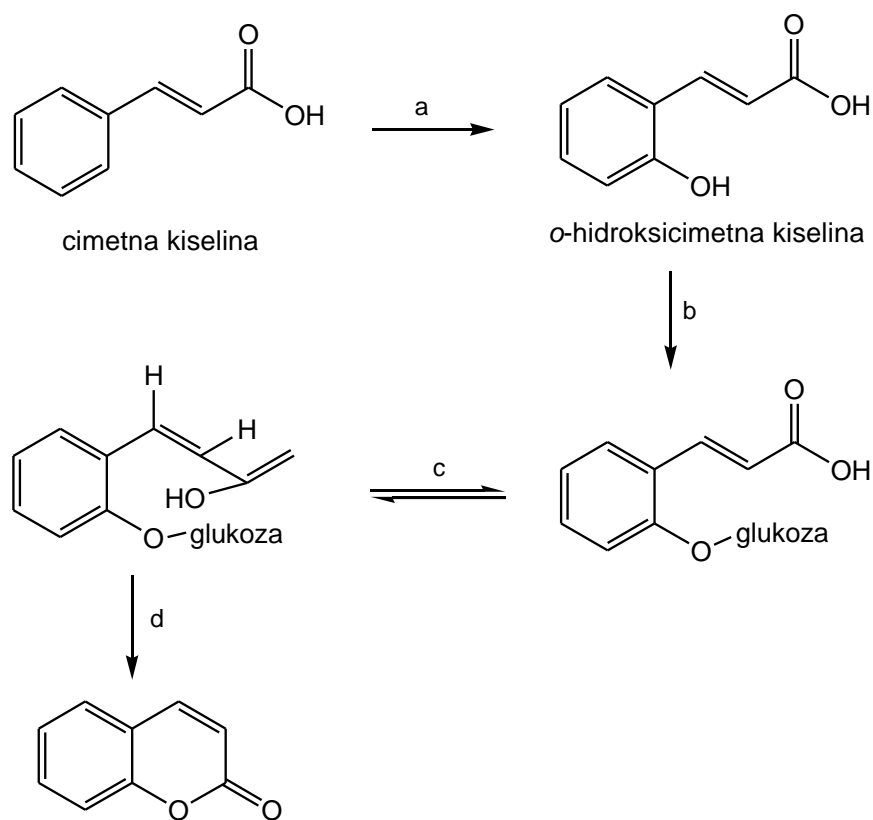
1. Kumarini, hidrosikumarini i glikozidi kumarina
2. Hidroksi-, metoksi- (aloksi-) i metilenhidroksi kumarini
 - a) s hidroksilnim ili alkoksilnim skupinama na benzenskom prstenu
 - b) s hidroksilnim ili alkoksilnim skupinama na α -pironskom prstenu
 - c) hidroksi ili metoksi kumarini alkilirani u benzenskom ili pironskom prstenu
3. Furokumarini ili kumaron- α -pironi, koji sadrže supstituente u benzenskom, furanskom ili pironskom prstenu
 - a) derivati psoralena tj. furokumarini kod kojih je furanska jezgra kondenzirana s kumarinom u položaju 6,7
 - b) derivati angelicina tj. furokumarini kod kojih je furanska jezgra kondenzirana s kumarinom u položaju 7,8
4. Piranokumarini ili kromeno- α -pironi koji sadrže prsten 2,2-dimetil pirana, kondenziran s kumarinom u položaju 5,6 ili položaju 7,8
5. 3,4-Benzokumarini
6. Kumarini s benzofuranskim prstenom kondenziranim s kumarinom u položaju 3,4 (kumestrol)
7. Složeniji spojevi u kojima dolazi kumarinski sustav (aflatoksini, novobiocin)

Najznačajniji derivati kumarina u prirodi su dikumarol, amarezinol, kumestrol i antibiotik novobiocin. Derivati kumarina su se koristili kao rodenticidi, najviše varfarin (Merchart i Desai, 1973.).

2.1.4. Dobivanje kumarina

2.1.4.1. Biosinteza kumarina u biljkama

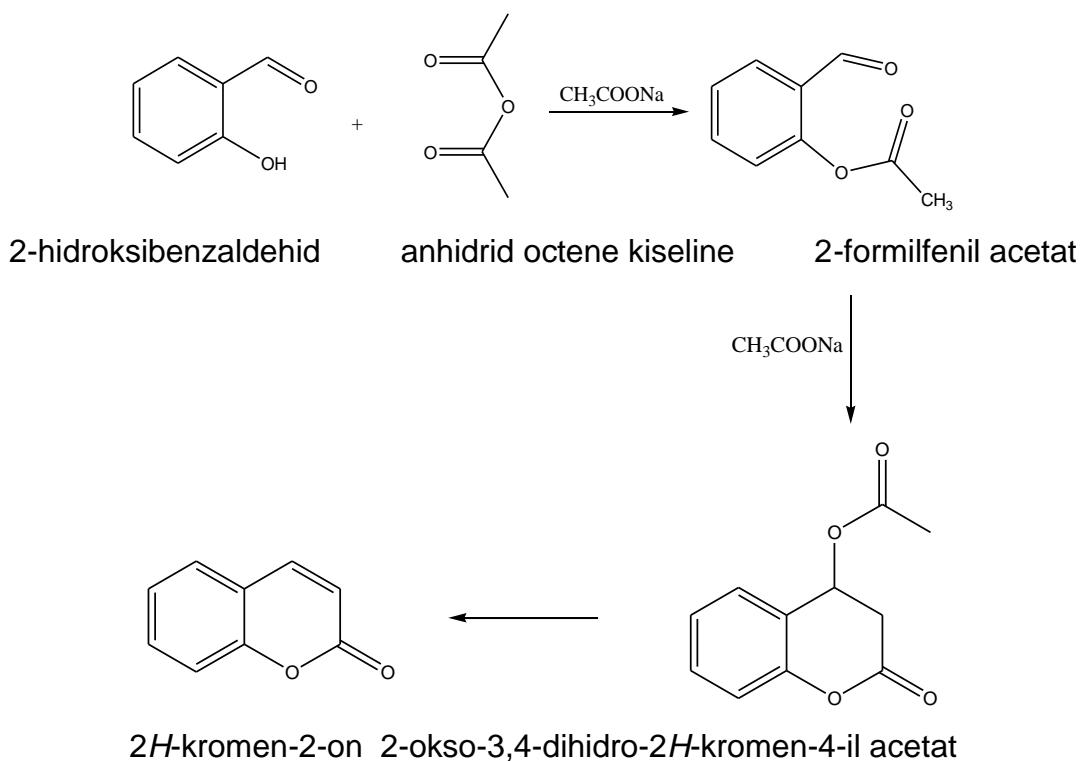
Kumarin i njegovi derivati se biosintetiziraju u biljkama i to iz cimetine kiseline koja se sintetizira u šikimatnom ciklusu. Prvo se odvija hidroksilacija benzenske jezgre u *orto*- položaju (a), zatim se na kisik veže glukoza u *orto*- položaju (b) te dolazi do izomerizacije dvostruke veze bočnog lanca pomoću enzima izomeraze (c). Ovim postupkom nastaje *o*-kumarinska kiselina na koju je vezana glukoza. Otcjepljenjem glukoze i laktonizacijom dolazi do zatvaranja pironskog prstena i nastanka kumarina (d). Ovdje je glukoza prijenosna grupa koja pomaže pri *cis-trans* izomeriji.



Slika 9 Biosinteza kumarina u biljkama

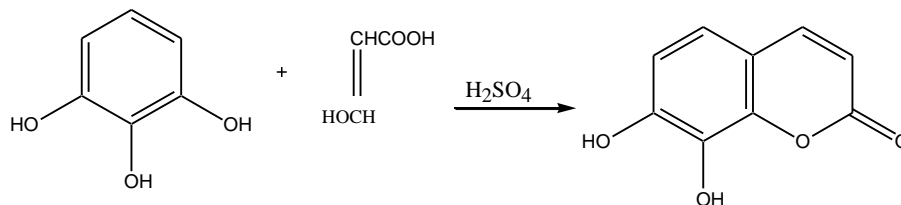
2.1.4.2. Laboratorijska sinteza kumarina

1. **Perkinova sinteza:** sinteza kumarina reakcijom salicilnog aldehida (2-hidroksibenzaldehida) i anhidrida octene kiseline (etanoil etanoata) uz natrijev acetat, pri čemu dolazi do aldolne kondenzacije u kojoj natrijev acetat ima ulogu bazičnog katalizatora. U reakciji nastaje intermedijer, hidroksicimetna kiselina koja spontano prelazi u lakton odnosno kumarin (Čačić, 1982.).



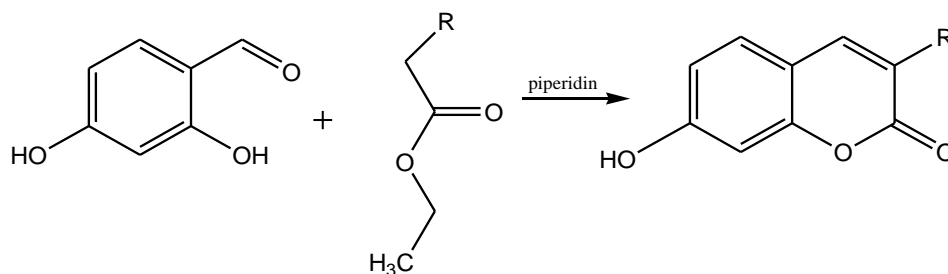
Slika 10 Perkinova sinteza kumarina

2. **Pechmanova sinteza:** reakcija koja se temelji na uzajamnom djelovanju fenola s jabučnom kiselinom ili β -ketoesterima u prisustvu sumporne kiseline ili drugih kondenzirajućih agenasa. Tijek reakcije ovisi o prirodni fenola, strukturi β -ketoestera, te o kondenzirajućem agensu (Kočić, 2000.).



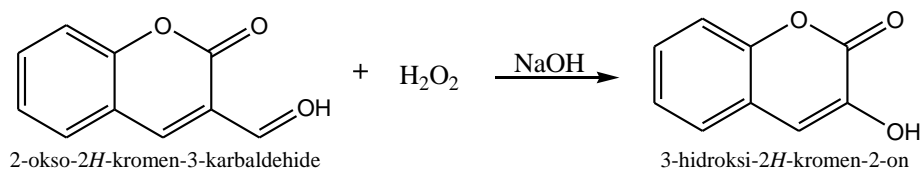
Slika 11 Pechmanova sinteza

3. **Knoevenagleova sinteza:** sinteza kumarina zasniva se na reakciji *o*-hidroksibenzaldehida s etil-malonatom, etil-acetatom ili etil-cijanoacetatom u prisutnosti piridina ili piperidina. Ovisno o supstratu nastaju različiti derivati kumarina (Šarkanj, 2007.).



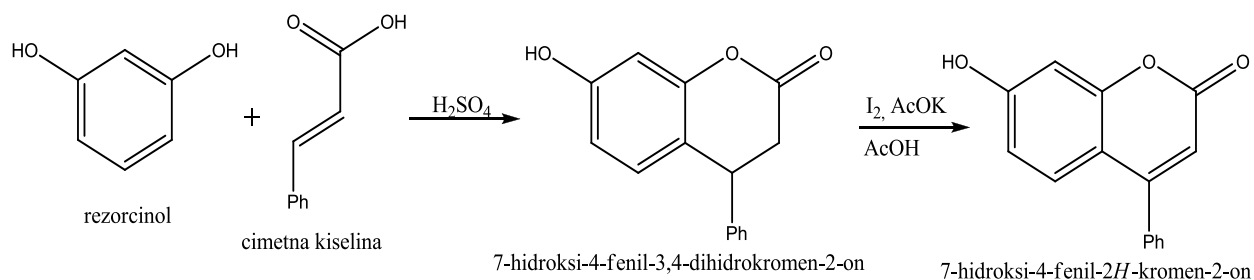
Slika 12 Knoevenagleova sinteza kumarina i njegovih derivata

4. **Dackinova sinteza:** reakcija koja se temelji na djelovanju vodikovog peroksida na formil ili acetil kumarine u lužnatom mediju pri čemu se dobiju hidroksikumarini (Šarkanj, 2007.).



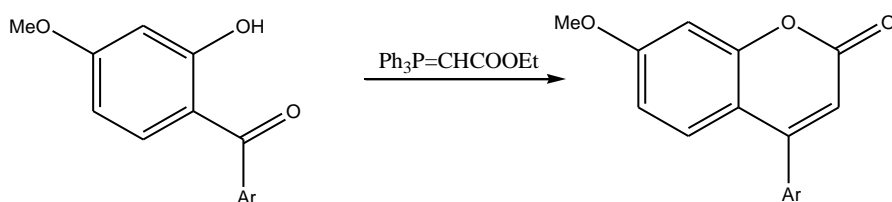
Slika 13 Dackinova sinteza hidroksikumarina

5. **Ponndorfova reakcija:** reakcijom fenola s maleinskim ili fumarnim kiselinama uz H_2SO_4 na temperaturi 150 – 160 °C nastaje 3,4-dihidroksikumarin. Dehidrogenacijom 3,4-dihidroksikumarina s jodom i kalijevim acetatom u vrućoj octenoj kiselini dobiva se 7-acetoksi-4-fenilkumarin (Garazd i sur., 2005.).



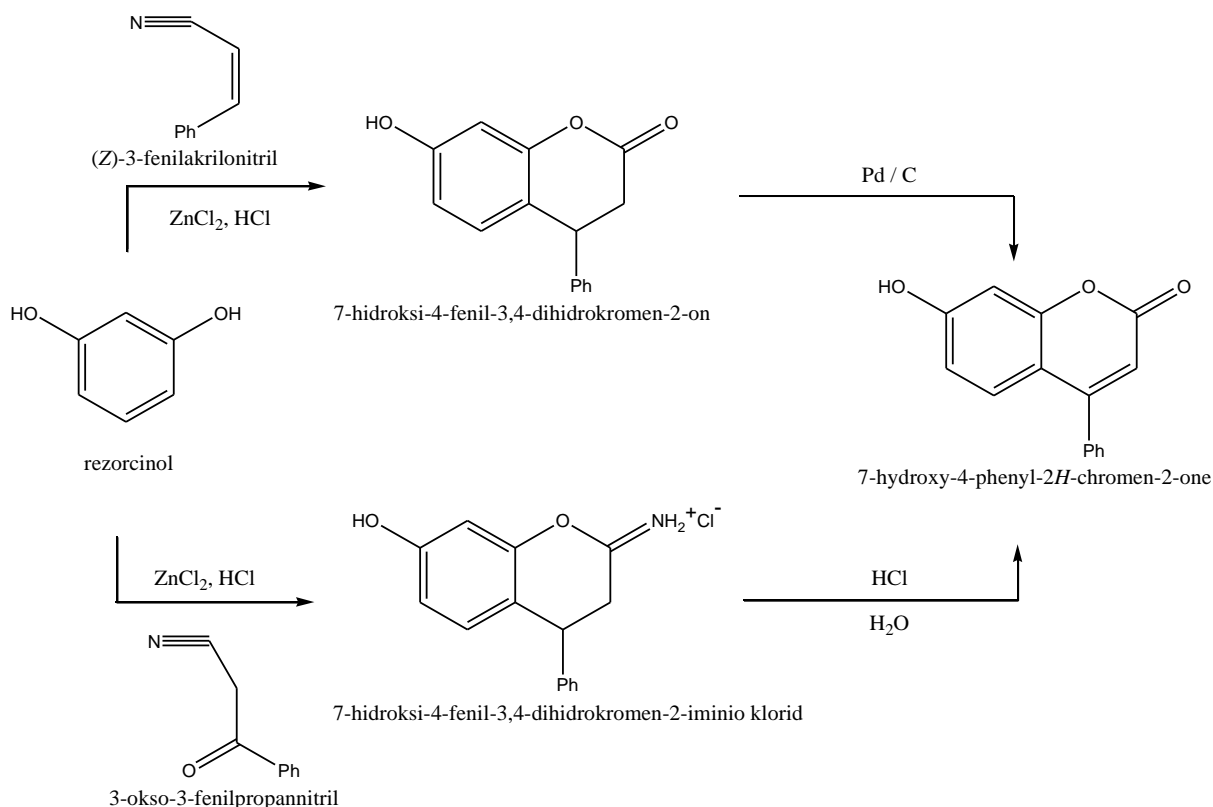
Slika 14 Ponndorfova reakcija sinteze kumarina

6. **Wittigova sinteza:** sinteza kumarina utemeljena na Wittigovim reakcijama uključuje kondenzaciju 2-hidroksibenzofenona, etoksikarbonil-metilen-trifenilfosfina u apsolutnom benzenu. Metoksi derivati 4-fenilkumarina su pripremljeni koristeći 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon kao početni materijal (Garazd i sur., 2005.).



Slika 15 Wittigova sinteza kumarina

7. **Houben-Hoeschova sinteza:** sinteza kao reagens koristi ariloacetonitril, pri čemu reagira siminokumarinima koji kiselom hidrolizom daju 4-arilkumarine s visokim iskorištenjima. Kondenzacijom rezorcinola s nitrilom cimetne kiseline uz $ZnCl_2$ ili $AlCl_3$ i HCl nastaje 3,4-dihidroksikumarin. Dehidrogenacijom 3,4-dihidroksikumarina, grijanjem u difenil eteru s 10% Pd na ugljenu dobiva se 7-hidroksi-4-fenilkumarin (Garazd i sur., 2005.).



Slika 16 Houben-Hoeschova sinteza kumarina

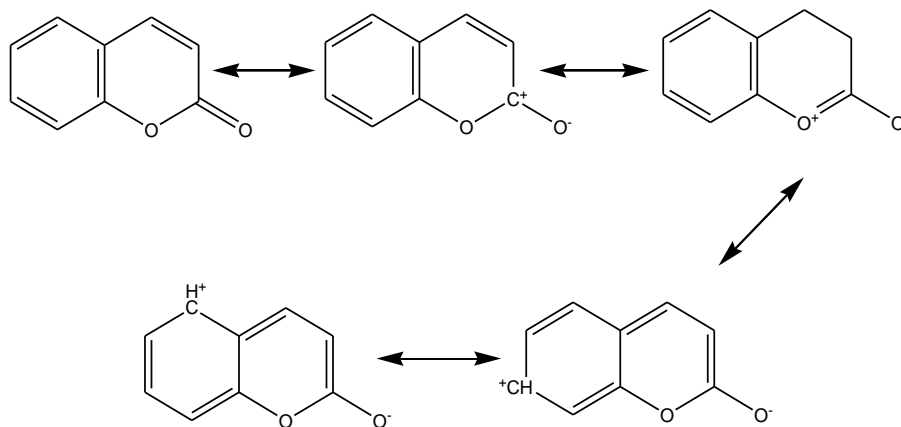
2.1.5. Kemijska svojstva kumarina i hidroksikumarina

2.1.5.1. Kemijska svojstva kumarina

Kumarin se sastoji od kondenzirane benzenske jezgre s heterocikličkim α -pironskim prstenom, a reaktivnost prstena je uvjetovana prisustvom karbonilne skupine, te 3,4-dvostrukom vezom. U molekuli kumarina ne dolazi do aromatizacije kumarinskog sustava u smislu potpune stabilizacije, nego dolazi do djelomične delokalizacije dvostruke veze iz položaja 3,4 kumarinskog sustava, što je utvrđeno spektrofotometrijskim istraživanjima (Kuleš, 1978.).

J. Wratil, te kasnije R. Patzak utvrdili su polarografsku aktivnost dvostruke veze na pironskom prstenu (Patzak i Neugebauer, 1951.). Budući da ta veza apsorbira svjetlost valne duljine veće od 300 nm, može se zaključiti da u hidroksikumarinima, kao i u samom kumarinu, ne dolazi do potpune aromatizacije, odnosno delokalizacije dvostruke veze na 3,4-položaju laktorskog prstena.

Ukoliko je dvostruka veza u spojevima delokalizirana, tada se javlja polarografska indiferentnost. Polarizacija π -veze karbonilne skupine dovodi do preraspodjele elektronske gustoće što uzrokuje nastanak rezonantnih oblika (Slika 17).



Slika 17 Rezonantni oblici kumarina

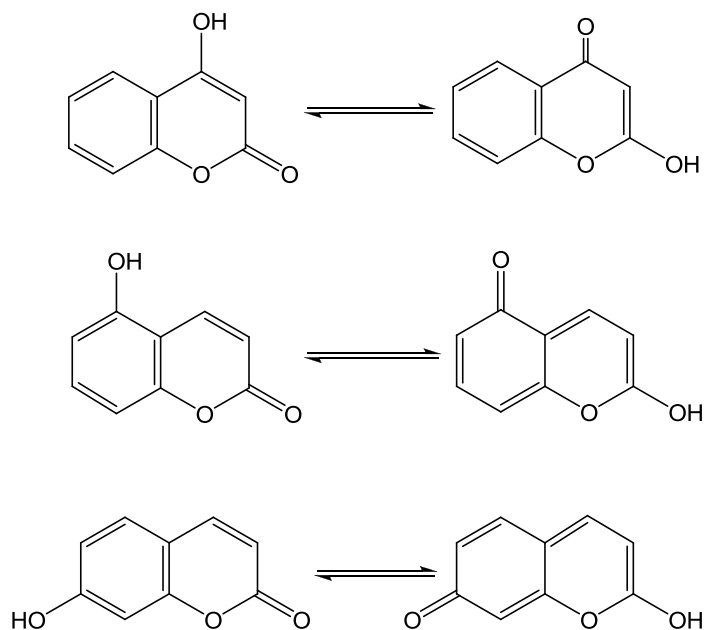
Kumarin posjeduje približno 40% aromatičnosti benzena, dok 7-hidroksikumarin-4-octena kiselina, koja predstavlja derivat kumarina, ima 38%-tnu aromatičnost benzena.

Proširenjem sustava konjugiranih dvostrukih veza na bočni lanac dovodi do aromatizacije kumarinskog sustava u smislu potpune stabilizacije, npr. kod varfarina. Ovakvi spojevi su polarografski aktivni s maksimumom apsorpcije u UV-području ispod 300 nm (Čačić, 1982.).

2.1.5.2. Kemijska svojstva hidroksikumarina

Kumarini koji u svojoj strukturi sadrže hidroksilnu skupinu nazivamo hidroksikumarinima. Hidroksilna skupina može biti smještena na pironskom i benzenskom prstenu. Kod hidroksikumarina α -pironski prsten ulazi u reakcije supstitucije pod blagim uvjetima, stvarajući 3-supstituirane hidroksikumarine jer je benzenski prsten hidroksikumarina manje reaktivan od benzenskog prstena derivata benzena.

Zapažena je i pojava tautomerije za 4-, 5- i 7-hidroksikumarine (Slika 18). Prvi koji su zapazili ovu pojavu kod hidroksikumarina bili su C. Huebner i K. P. Link (Huebner i Link, 1945.).



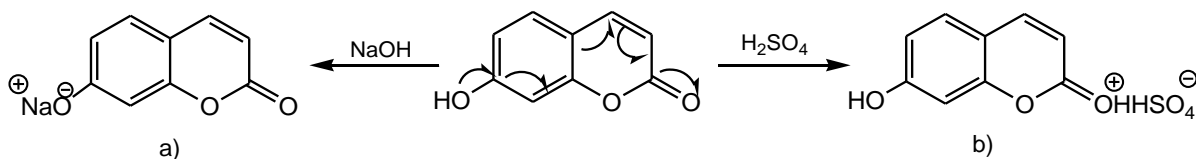
Slika 18 Kumarin-kromonska tautomerija: 4-hidroksikumarina
5-hidroksikumarina
7-hidroksikumarina

Kiselost hidroksikumarina ovisi o gustoći elektrona na atomima ugljika i kisika. Što je manja gustoća elektrona na atomu kisika, lakše se odcjepljuje proton i spoj ima veću kiselost. Izraženu kiselost ima 4-hidroksikumarin, srednju 5- i 7-hidroksikumarin, a najslabiju 6- i 8-hidroksikumarin.

2.1.6. Fizikalna svojstva kumarina i hidroksikumarina

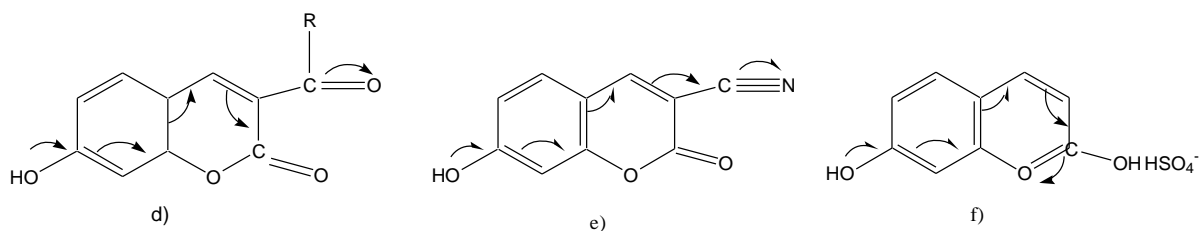
2.1.6.1. Fluorescencija

Spojevi kumarina pokazuju karakteristično svojstvo fluorescencije u baznim i neutralnim otopinama te u koncentriranoj sumpornoj kiselini, posebno u UV-području. Ovo svojstvo je posebno izraženo kod derivata 7-hidroksikumarina (umbeliferona), a povezano je s izmjenom njegove polarizacije u lužnatoj otopini (a) i u sulfatnoj kiselini (c) (Balial i sur., 1942.).



Slika 19 Promjena polarizacije normalne strukture 7-hidroksikumarina u lužnatom (a) i kiselom mediju (b)

Na intenzitet fluorescencije znatno utječe mjesto supstitucije kao i sam karakter supstituenta. Uvođenjem elektronakceptorskih grupa u položaju 3 na kumarinskom prstenu (karbonilna, cijano skupina) dolazi do premještanja elektrona u pironskom prstenu. Posljedica toga je fluorescencija tvari i u neutralnim otopinama.



Slika 20 Premještanje elektrona u pironskom prstenu uvođenjem elektronakceptorske grupe u položaj 3 (d – karbonilna grupa u položaju 3; e – cijano grupa na položaju 3; f – 7-hidroksikumarin u kiselom mediju)

Ako se te grupe nalaze u položaju 4, tada ne dolazi do fluorescencije. Kemijska struktura 7-hidroksikumarina ima neke specifičnosti koje potpomažu apsorpciju svjetla.

U te specifičnosti se ubraja pojava postojanja spojnih veza, sposobnost stvaranja *orto*- i *para*-kinoidnih prstenova, pojava mezomernog efekta te sklonost formiranju međumolekularnih vodikovih veza. Fluorescenciju slabe sve izmjene u molekuli koje spriječavaju premještanje elektrona u pironskom prstenu ili ona u potpunosti nestaje. Istovremeno, sve izmjene koje pomažu premještanje elektrona u pironskom prstenu dovode do pojačanja fluorescencije. U krutom stanju fluoresciraju uglavnom derivati 7-hidroksikumarina, dok fluorescencija kumarinskih derivata u vodenim otopinama obično ovisi o koncentraciji vodikovih iona (Kočić, 2000.).

2.1.6.2. UV spektrometrija

UV spektrometrija je metoda analize koja daje odgovore na strukturalna pitanja, bavi se proučavanjem izomerije te olakšava identifikaciju prirodnih kumarina. Ova metoda se zasniva na apsorpciji ultraljubičastog zračenja (200 – 400 nm) koje prolazi kroz uzorak. Apsorpcijski spektar kumarina pokazuje ovisnost o pH otopine te dolazi do batokromnog pomaka. Osnove apsorpcijske vrpce nalaze se u području od 290 do 350 nm te od 210 do 275 nm, a uvjetovane su kromoforima koji uključuju međusobnu povezanost pironskog i benzenskog prstena.

Analiziran je utjecaj pH na UV spektre nekih hidroksikumarina (Shah i Bafna, 1963.), a vrijednosti su prikazane u Tablici 2.

Tablica 2 UV spektri kumarina i hidroksikumarina

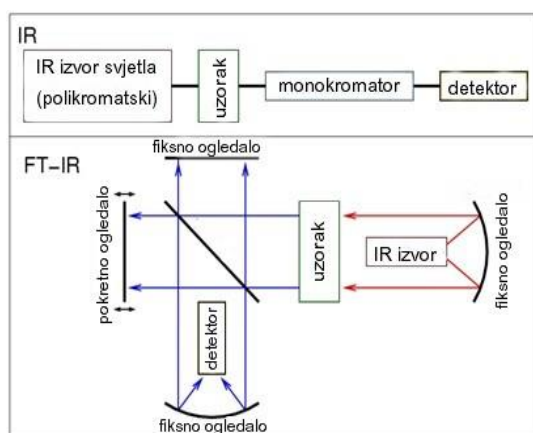
Spoj	Otapalo	pH	λ_{\max}/nm ($\log \epsilon$)
kumarin	etanol	-	274 (4,10); 309 (3,73)
	n-heksan	-	271 (4,10); 282 (4,05); 311 (3,67)
4-hidroksikumarin	metanol	-	270 (3,93); 280 (4,01); 302 (3,96)
	10% metanol	1-3	270 (4,00); 280 (4,01); 300 (3,70)
	10% metanol	6-7	286 (4,11); 294 (4,08)

UV spektar derivata kumarina ovisi o karakteru i položaju supstituenata u pironskom i benzenskom prstenu. Kod derivata kumarina supstituiranih u benzenskom prstenu, ovisno o položaju supstituenata dolazi kod UV spektra do pomaka zone apsorpcije. Hidroksilna grupa u položaju 5 ili 8 izaziva hipsokromni pomak, dok ista ta grupa u položaju 6 ili 7 dovodi do batokromnog pomaka.

Pomoću UV spektrometrije rješavaju se strukturalna pitanja, proučava izometrija, olakšava identifikacija prirodnih kumarina. Na osnovi promjene intenziteta apsorpcije u UV području razrađena je kvantitativna metoda za određivanje nekih derivata kumarina biljnog porijekla.

2.1.6.3. IR spektrometrija

IR spektrometrija ima veliku primjenu u organskoj kemiji i koristi se u određivanju strukture kemijskih spojeva. Koristi se za utvrđivanje prisutnosti neke tvari u uzorku (kvalitativno) i u kojoj količini (kvantitativno). ApSORpcija energija različitih područja EM zračenja na različite načine pobuđuje molekulu. Zračnje u infracrvenom (IR) području od 2 500 do 15 000 nm odgovara energiji koja izaziva molekulске vibracije, dok se blisko infracrveno područje (NIR) proteže u rasponu od 800 do 2 500 nm. Uzorak izložen infracrvenom zračenju uz kontinuiranu promjenu njegove valne duljine, apsorbira u spektrometru upadno zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskim vibracijama.



Slika 21 Shematski prikaz rada IR spektrometra

Evidentiranjem apSORpcije zračenja dobivamo infracrveni spektar, a kao jedinica se upotrebljava valni broj koji označava frekvenciju, ali se ne izražava u hercima (Hz) već u recipročnim centimetrima (cm^{-1}), odnosno on predstavlja broj valova po centimetru (Morrison i Boyd, 1979.).

Kod analize IR spektara kumarinskih spojeva bitna su dva područja:

- $2\ 500 - 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ - područje spektra gdje se pojavljuju istežanja O-H i C-H veza
- $1\ 490 - 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$ - područje spektra gdje se pojavljuju istežanja C=O i C=C veza

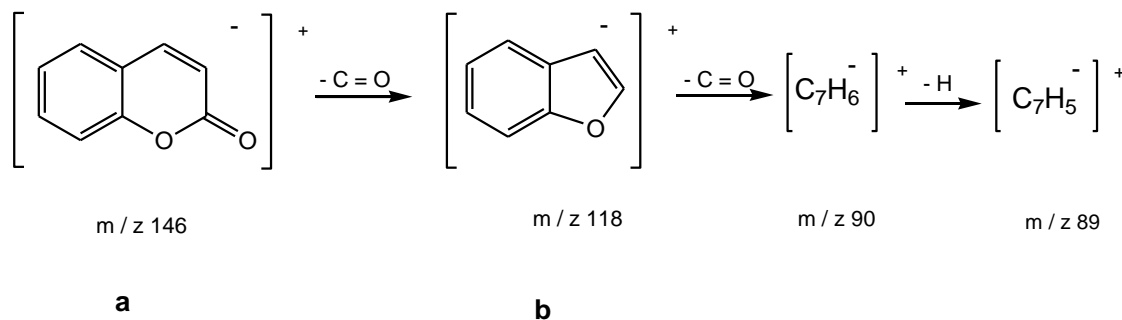
Tablica 3 Razlike apsorpcija u IR-spekttru između kumarina i hidroksikumarina

SPOJ	$\nu_{\text{OH}} / \text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{CH}} / \text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{C=O}} / \text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{C=C}} / \text{cm}^{-1}$
Kumarin	-----	3115 s, 3058 si, 3001 s	1711 vi	1625 si, 1608 si, 1567 s
4-hidroksikumarin	3100 s	-----	1713 vi, 1658 p	1615 i, 1565 si, 1522 si

Značenje: **i**=intezivna, **si**=srednje intezivna, **vi**=vrlo intezivna vrpca
s=slaba, **vs**=vrlo slaba, **p**=pregib

2.1.6.4. Spektrometrija masa

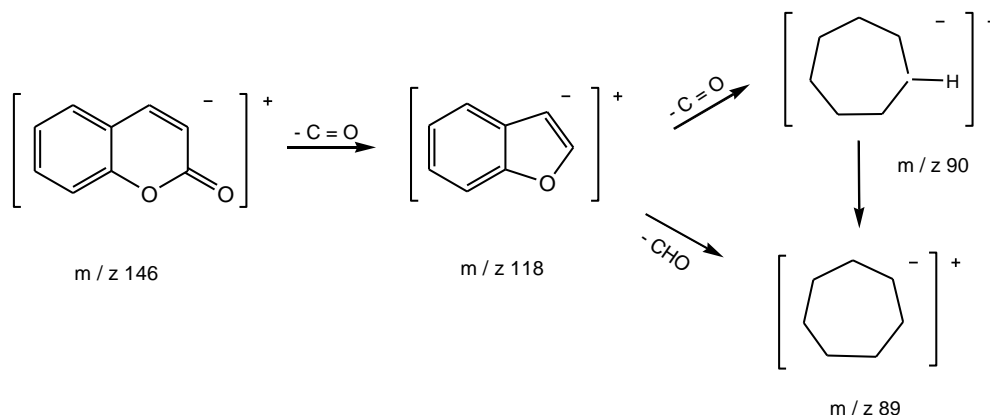
Spektri masa nastaju uslijed ionizacije kod izloženosti uzorka snopu elektrona koji ioniziraju atome gdje dolazi do njihovog sudara i odstranjujući jedan ili više elektrona dolazi do pojave spektra masa. Spektar masa pokazuje omjere *masa/naboj* ioniziranih čestica (m/z). Uslijed povećanja energije elektrona spoja dolazi do povećanja energije ionizacije pa s time u svezi dolazi do fragmentacije iona. Kod spektara masa hidroksikumarina brža je eliminacija CO-skupine. Prvi puta su 1963. godine snimljeni spektri masa kumarina.

**Slika 22** Spektrometrija masa kumarina

Spektar masa pokazuje omjer mase i naboja (m/z) s obzirom na relativan intenzitet pojedinog fragmenta. Najintenzivniji signal (najviši), nazvan je osnovni signal, to je standard prema kojem se izražava udio ostalih signala.

Osnovnom se signalu pripisuje vrijednost intenziteta 100. Suvremeni spektrometri masa, s pripojenim računalnim sustavom, daju potpuno iscrtan spektar ili popis fragmenata m/z i odgovarajuće relativne intenzitete.

Kod kumarina susrećemo se sa pet signala: dva signala dobivena dvostrukim cijepanjem m/z 28 (m/z 118 i m/z 90) te fragment dobiven cijepanjem m/z 29, (m/z 89), molekularni ion m/z 146 (a), a peti signal predstavlja cijepanje aromatskog prstena. Rezultati fragmentacije su da je dobiven identičan signal m/z 118 iz čega se vidi da molekularni ion kumarina gubi CO grupu i prelazi u benzofuran, a potom atom vodika ili CHO grupu (March, 1985.).



Slika 23 Fragmentacija molekule kumarina u spektru masa

2.1.6.5. $^1\text{H-NMR}$ spektrometrija

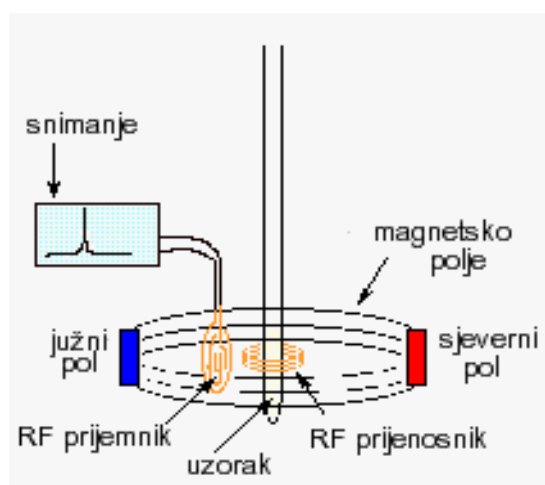
Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) proučava radiovalno zračenje koje djeluje na spinove jezgara u magnetskom polju. Apsorpcija ili emisija radiovalova mijenja orijentaciju jezgre u magnetskom polju. Elektronski omotači zasjenjuju magnetsko polje pa svaka jezgra u atomu s različitom elektronskom strukturom ima drugačiji odziv u NMR spektru.

$^1\text{H-NMR}$ metoda spektrometrije daje najbolje rezultate kod utvrđivanja građe kumarina, furokumarina te na taj način omogućava detaljnu analizu spoja.

Jezgre atoma vodika nekog uzorka smještenog u snažno magnetsko polje, apsorbiraju elektromagnetsko zračenje. Spektri su puno složeniji od drugih vrsta apsorpcijskih spektara i oni se sastoje od niza signala koji se uspoređuju sa signalom standardnog spoja (uglavnom tetrametilsilana-TMS).

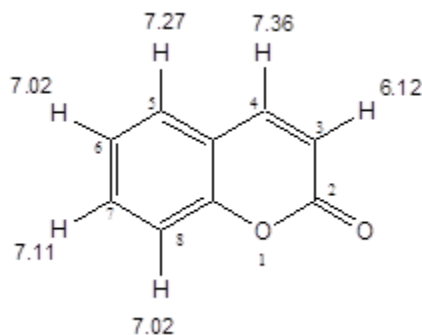
Položaj signala nekog protona u odnosu na signal protona u standardu ukazuje na vrstu protona i naziva se kemijski pomak. Površina koju zatvara krivulja signala otkriva broj protona koji se nalaze u spoju. U $^1\text{H-NMR}$ spektru kumarinskog prstena, u području aromatskih protona pojavljuju se dva dubleta od H-3 i H-4 protona. Obzirom na raspodjelu π -

elektronskih naboja u molekuli kumarina, veći kemijski pomak mora imati H-3, a manji H-4 (Čačić, 1982.).



Slika 24 Shema spektrometra nuklearne magnetske rezonancije

NMR spektrometar se sastoji od velikog magneta koji stvara magnetsko polje i dviju zavojnica. Jedna služi za proizvodnju uzbudnog radiovalnog zračenja, a druga ima funkciju detektora. Razlučivanje instrumenta ovisi o jakosti magnetskog polja tako da se danas koriste super jaki magneti jakosti i do 20 T.



Slika 25 Rezultati ^1H -NMR analize kumarina

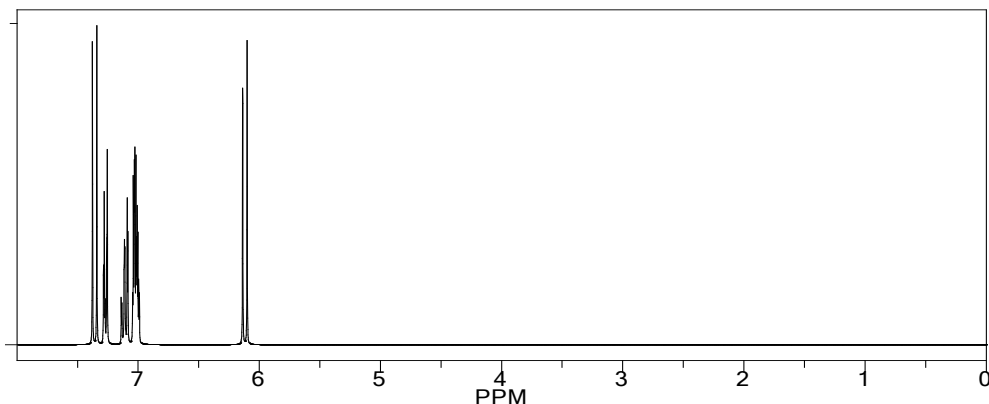
Otapalo: CCl_4 (tetraklorogljik)

Kemijski pomak: δ/ppm

6,12 (H-3); 7,36 (H-4); 7,27 (H-5); 7,02 (H-6); 7,11 (H-7); 7,02 (H-8)

Konstanta vezanja: J/Hz

8,5 ($J_{5,6}$); 2,0 ($J_{5,7}$); 0,0 ($J_{5,8}$); 8,6 ($J_{6,7}$); 1,8 ($J_{6,8}$); 8,5 ($J_{7,8}$)



Slika 26 $^1\text{H-NMR}$ analiza 2H-kromen-2-ona

2.1.7. Biološka svojstva kumarina i hidroksikumarina

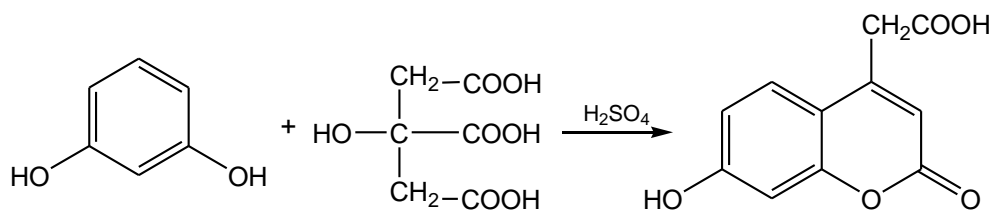
Mnogi prirodni kumarini i hidroksikumarini su biološki aktivni spojevi te imaju raznovrsno djelovanje na organizam. Njihova biološka svojstva povezana su s postojanjem laktonskog prstena, dvostruke veze u 3,4-položaju te različitim karakterom i položajem supstituenata. Upravo zbog toga se koriste u svojstvu efikasnih lijekova kod niza bolesti (Lacy i O'Kennedy, 2004.).

Farmakološka i biološka svojstva kumarina

- inhibicija klijanja sjemena i rasta korijena
- spazmolitičko djelovanje
- narkotičko djelovanje
- paraliza CNS
- stimulacija CNS
- stimuliranje disanja
- diuretičko djelovanje
- antikoagulacijski efekt
- djelovanje na propusnost kapilara
- insekticidno djelovanje
- bakteriostatička i antifungalna svojstva
- hipotermičko djelovanje
- širenje žila

2.2. 7-HIDROKSIKUMARIN-4-OCTENA KISELINA

W. Baker i suradnici (1950.) su razradili metodu dobivanja 7-hidroksikumarin-4-octene kiseline iz limunske kiseline i rezorcinola uz djelovanje koncentrirane sumporne kiseline. Na povišenoj temperaturi (60-75 °C) dolazi do stvaranja aceton dikarboksilne kiseline koja reagira s rezorcinolom. Vrlo je važno, da prilikom dodavanja rezorcinola, temperaturu reakcijske smjese održavati ispod 0 °C, jer ako temperatura prijeđe +5 °C dolazi do stvaranja čitavog niza smolastih nusprodukata.

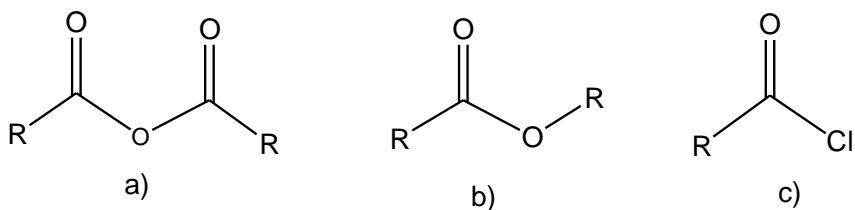


Slika 27 Dobivanje 7-hidroksikumarin-4-octene kiseline

2.2.1. Hidrazidi karboksilnih kiselina

2.2.1.1. Dobivanje hidrazida

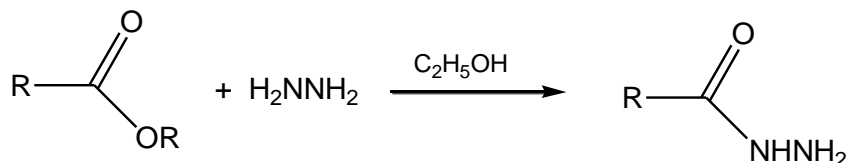
Hidrazidi nastaju reakcijom hidrazina s derivatima karboksilnih kiselina od kojih se najviše koriste anhidridi (RCH_2O_3R'), esteri ($RCOOR'$) i kiselinski kloridi ($RCOCl$).



Slika 28 Anhidridi karboksilnih kiselina (a), esteri karboksilnih kiselina (b) i kloridi karboksilnih kiselina (c)

Hidrazidi mogu biti alifatski i aromatski, monoacil i diacil hidrazidi što ovisi o strukturi karboksilne skupine iz koje nastaju.

Hidrazidi karboksilnih kiselina se dobivaju reakcijom kiselinskih estera s hidrazinom u otopini etilnog alkohola, zagrijavanjem uz refluksiranje. Reakciju je moguće provesti i pri sobnoj temperaturi pri čemu se kao otapalo koristi metanol (El-Ansary i sur., 1992.).



Slika 29 Dobivanje hidrazida karboksilnih kiselina

2.2.1.2. Svojstva i primjena hidrazida

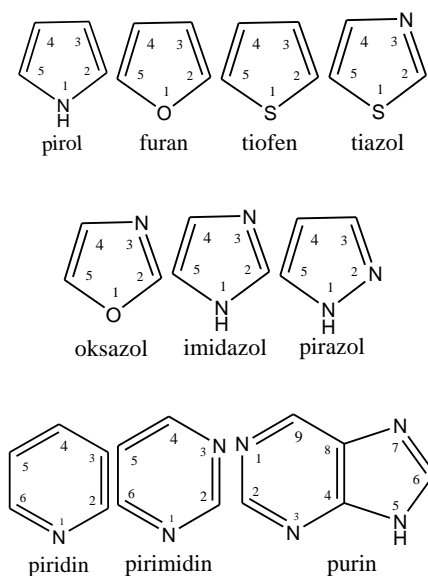
Neki od kiselinskih hidrazida na bazi kumarina fluoresciraju pod UV zračenjem te se mogu detektirati upotrebom UV lampe. Određivanje je moguće u području ultraljubičastog i vidljivog spektra. Također posjeduju svojstvo kemiluminiscencije tj. emisije svjetla bez isijavanja topline, što omogućava lakšu identifikaciju hidrazida (Lever, 1972.).

Hidrazidi karboksilnih kiselina, posebno hidrazidi na bazi kumarina, posjeduju antifungalno i antibakterijsko djelovanje. Hidrazid maleinske kiseline se primjenjuje u području agrotehnike za inhibiciju klijanja, hidrazid izonikotinske kiseline ima razarajuće djelovanje na mikroorganizme pa je jedan od najznačajnijih tuberkulostatika. U prehrambenoj industriji neki hidrazidi se koriste kao analitički reagensi za određivanje sadržaja ugljikohidrata.

2.3. HETEROCIKLIČKI SPOJEVI

Heterociklički spoj je onaj koji ima prsten načinjen od raznolikih atoma, a ne samo atoma iste vrste.

Do sada su razmatrani prsteni organskih spojeva koji su se sastojali isključivo od ugljikovih atoma npr.: benzen, naftalen, cikloheksanol, ciklopentadien. Takvi se spojevi zovu homociklički ili aliciklički. Međutim, postoje prstenovi kojima se uz ugljikov atom nalaze i drugi atomi, od kojih su najčešći: dušik, kisik ili sumpor. Na primjer:



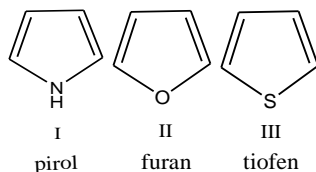
Slika 30 Strukturne formule heterocikličkih spojeva

Pri označavanju mjesta u prstenu pravilo je da se heteroatomima daje što je mogući manji broj, kako je prikazano gore na strukturnim formulama raznoraznih heterocikličkih spojeva.

Heterocikličke spojeve nalazimo posvuda. Ugljikohidrati su heterociklički spojevi; to su i klorofil i hemin, koji daju zelenu boju lista i crvenu boju krvi te omogućavaju život biljkama i životinjama. Heterociklički spojevi sačinjavaju reaktivna mjesta u mnogim enzimima i koenzimima. Konačno, nasljednost proizlazi iz redoslijeda vezanja nekoliko heterocikličkih prstena na duge lance nukleinskih kiselina (Morrison i Boyd, 1972.).

2.3.1. Peteročlani heterocikli

Najjednostavniji peteročlani heterociklički spojevi su pirol, furan i tiofen, a svaki od njih ima jedan heteroatom.



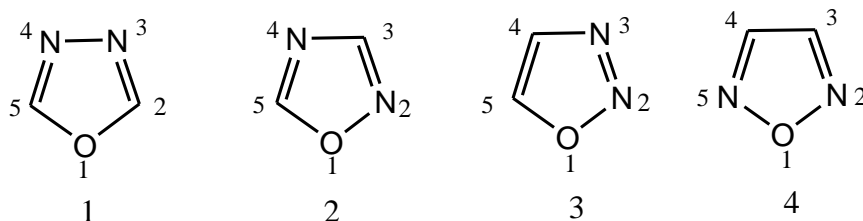
Slika 31 Strukturne formule peteročlanih heterocikla

Prema općenitim strukturama I, II i III, ovi spojevi bi trebali imati svojstva konjugiranog diena i amina, etera ili sulfida (tioetera). Osim što podliježu nekim reakcijama adicije, ti heterociklički spojevi nemaju očekivana svojstva. Tako npr. tiofen ne podliježe oksidaciji, koja je tipična za sulfide, a pirol nije bazičan, što je karakteristično svojstvo amina.

Umjesto toga ti heterociklički spojevi i njihovi derivati vrlo često podliježu elektrofilnoj supstituciji: nitriranju, sulfoniranju, halogeniranju, Friedel-Craftsovoj reakciji aciliranja, pa čak i Reimer-Tiemannovoj reakciji i kopuliranju s diazonijevim solima. Topline sagorijevanja ukazuju na stabilnost uslijed rezonancije u iznosu od 22 do 28 kcal/mol, što je manje od vrijednosti za benzen (36 kcal/mol), ali je znatno više od vrijednosti za većinu konjugiranih diena (oko 3 kcal/mol). Na temelju tih svojstava pirol, furan i tiofen moramo smatrati aromatskim spojevima. Prema tome formule I, II i III ne odgovaraju u cijelosti njihovoj strukturi (Morrison i Boyd, 1972.).

2.4. 1,3,4,-OKSADIAZOLI

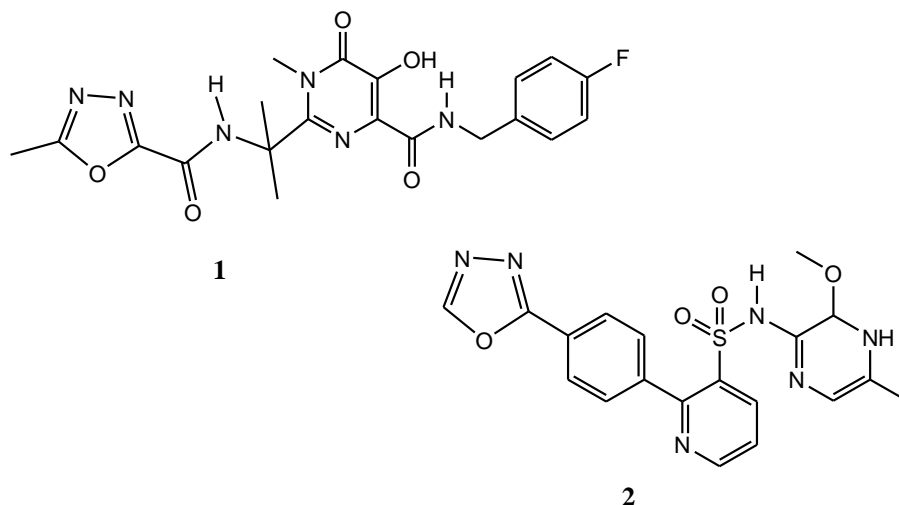
1,3,4-Oksadiazoli (1) su heterociklički spojevi koji sadrže jedan kisikov atom i dva dušikova atoma u peteročlanom prstenu. Dobivaju se iz furana supstitucijom dvije metilne skupine (=CH) s dva dušika piridinskog tipa (-N=) (Böstrom i sur.,2012.). Poznata su tri izomera: 1,2,4-oksadiazol (2), 1,2,3-oksadiazol (3) i 1,2,5-oksadiazol (4). Međutim, 1,3,4-oksadiazol i 1,2,4-oksadiazol su poznatiji, i šire proučavani zbog svojih kemijskih i bioloških svojstava.



Slika 32 Izomeri oksadiazola

Među heterolitičkim spojevima, 1,3,4-oksadiazoli su postali važan konstitucijski motiv za razvitak novih lijekova. Spojevi koji posjeduju jezgru 1,3,4-oksadiazola imaju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antibakterijska, antifungalna, analgetička, protuupalna, antivirusna, antikancerogena, antihipertenzivna, antiepileptična i antidijabetska svojstva (Böstrom i sur.,2012.).

Također je prisutan interes za njih u medicinskoj kemiji kao surogati (bioizoesteri) za karboksilne kiseline, estere i karboksiamide (Böstrom i sur.,2012.). Reaktivnost 1,3,4-oksadiazola očituje se u kemijskim reakcijama kod dizajniranja i sinteze ciljanih struktura za koje se pretpostavlja da će imati značajnu biološku aktivnost. Prikazana su dva primjera spojeva koji sadrže 1,3,4-oksadiazole, a trenutno se koriste u kliničkoj medicini: Raltegravir® (1), antivirusni lijek i Zibotentan® (2) antikancerogeni lijek (Savarino, 2006.; James i Growcott, 2009.).



Slika 33 Strukture lijekova koji sadrže 1,3,4-oksadiazolnu jezgru

Sinteza novih derivata 1,3,4-oksadiazola, i istraživanje njihovih kemijskih svojstava i biološkog ponašanja ubrzala se u zadnja dva desetljeća. Zadnjih godina znatno je porastao broj znanstvenih istraživanja vezano za te spojeve.

2.4.1. Farmakološka aktivnost 1,3,4-oksadiazola

2.4.1.1. Antimikrobno i antiepileptično djelovanje

Nedavna pojava infekcijskih bolesti otporne na postojeće lijekove stvorila je potrebu za nove, sigurnije i efikasnije antimikrobne agente. Postoji nekolicina znanstvenika koji izvještavaju o odličnoj antimikrobnoj aktivnosti spojeva koji sadrže 1,3,4-oksadiazolni prsten. Tako su Oliveria i suradnici (2012.) izvjestili o sintezi i antistafilokoknoj aktivnosti 1,3,4-oksadiazola na *Staphylococcus aureus*, koji je pokazao 2-8 puta veću aktivnost od standardnog lijeka kloramfenikola.

Patel i Patel (2010.) opisali su antibakterijsku aktivnost niza derivata, koji sadrže jezgru 1,3,4-oksadiazola, protiv gram-pozitivnih (*Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) i gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) koristeći ampilicin kao standardni lijek. Ispitivani spojevi pokazali su 2-5 puta bolju aktivnost od ampilicina.

Također je ispitivana antifungalna aktivnost disupstituiranih oksadiazola, koji sadrže triazolnu jedinicu na poziciji 5 oksadiazolnog prstena. Vrste plijesni koje su ispitivane su:

Candida albicans, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* i *Cryptococcus neoformans*. Mikonazol i flukonazol korišteni su kao standardi za usporedbu. Standardi sadrže metil sulfonsku ($R=SO_2CH_3$) grupu vezanu za dušik piperidinskog prstena, i Cl ili OH (R_1) grupe (Fuloria i sur., 2009.)

Kashaw i suradnici (2010.) ustanovili su da uvođenje amino grupe u položaj 21,3,4-oksadiazolnog prstena i substituiranog fluora na *para* poziciju benzilno grupe utječe na povećanje antiepileptične aktivnosti (Zarghi i sur., 2005.).

2.4.1.2. Antivirusno i antitumorsko djelovanje

16. listopada 2007. godine, američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je upotrebu raltegravira za liječenje virusa humane imunodeficijencije (HIV), u kombinaciji s drugim antiretrovirusnim lijekovima kod odraslih pacijenata kojima je dokazana virusna replikacija. Raltegravir je prototip nove klase antivirusnih lijekova poznatih kao inhibitora integraze (Temesgen i Siraj, 2008.).

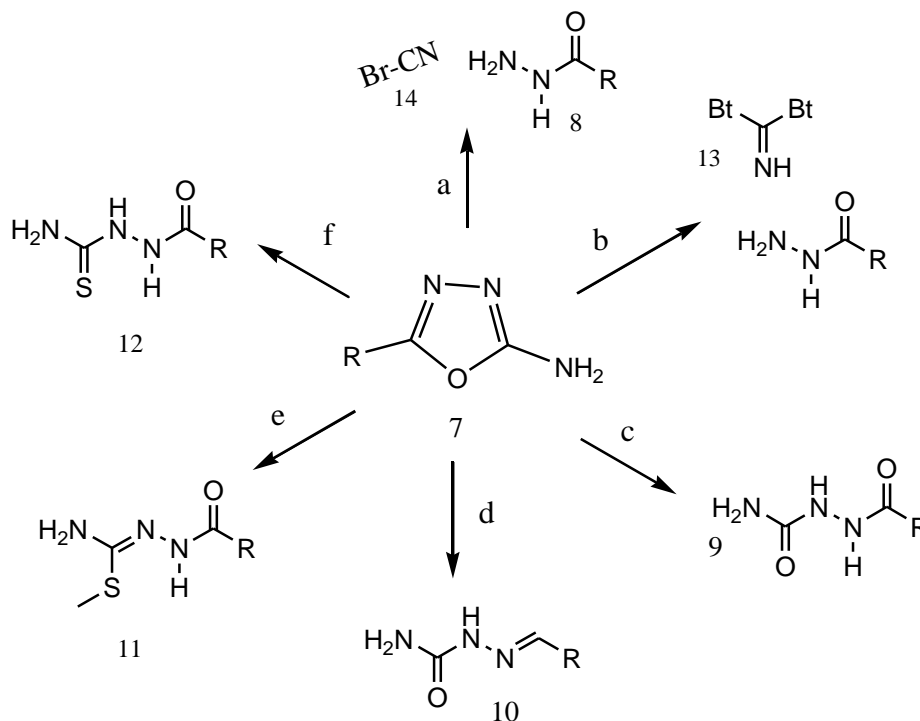
Ouyang i suradnici (2006.), te Toma i suradnici (2010.) sintetizirali su i vrednovali razne derivate 1,3,4-oksadiazola na njihovu sposobnost da inhibiraju polimerizaciju tubulina i blokiraju mitotičku podjelu tumorskih stanica. Ispitivani spojevi pokazali su snažno djelovanje. *In vitro* studije tih spojeva dokazale su da njihova nano-koncentracija može prekinuti mitozu kod karcinoma dojke i pločastih stanica tumora.

2.4.2. Metode sinteza 2,5-disupstituiranih 1,3,4-oksadiazola

2.4.2.1. Metode sinteza 5-supstituiranih-2-amino-1,3,4-oksadiazola

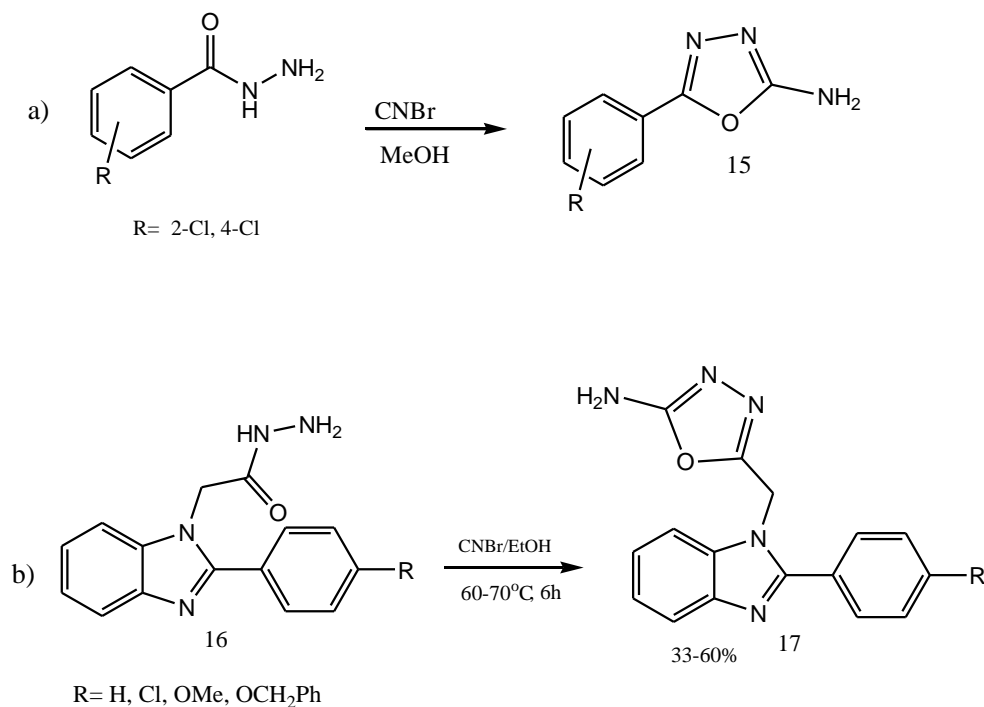
Neke od metoda za dobivanje 5-supstituiranog-2-amino-1,3,4 -oksadiazola **7** su navedene na Slici 34. Metode **a** i **b** koriste acilhidrazidni intermedijer **8**, pripremljen od odgovarajućeg estera i hidrazin hidrata, koji može reagirati s cijano bromidom (**14**), ili di(benzotriazol-1-il) metaniminom (**23**). Dehidracija acilsemikarbazida **9** također se vrlo često koristi, uz nešto drukčije uvjete (metoda **c**). Aciltiosemikarbazidni intermedijeri **11** i **12** korišteni su u različitim putevima da bi se dobio željeni heterocikl putem oksidacijske reakcije ciklizacije s jodom, na povišenim temperaturama, ili uz pomoć derivata karbodiama (metoda **e** i **f**).

Semikarbazoni **10** se također mogu lako ciklizirati u odgovarajuće 1,3,4-oksadiazole (metoda **d**).



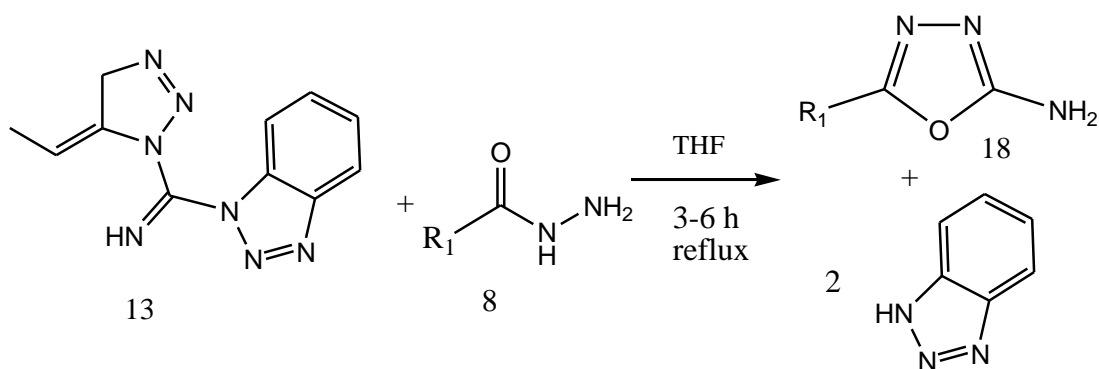
Slika 34 Retrosintetska analiza 5-supstituiranih-2-amino-1,3,4-oksadiazola.

Korištenjem pristupa **a**, Patel i Patel (2010.) sintetizirali su 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazol **15** iskorištenja od 62 do 70%. Ovi spojevi se koriste kao međuprodukti za sintezu novih derivata kinazolinona (**a**). Kerimov i suradnici (2012.) sintetizirali su nove 2-amino-1,3,4-oksadiazole **17** uz 33-60%-tno iskorištenje iz reakcije između 2-(2-(4-supstituirani-fenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il) acetohidrazida (**16**), i cijano bromida, (**b**).



Slika 35 Sinteza 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazola iz acilhidrazida i cijano bromida.

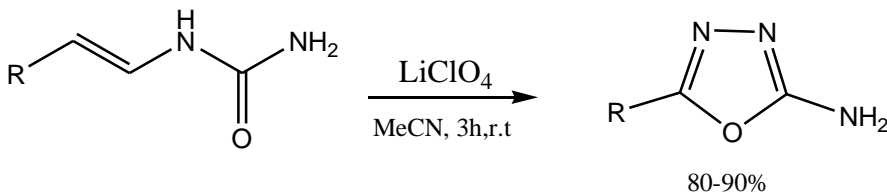
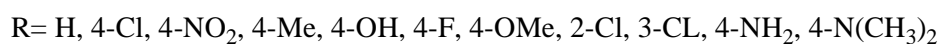
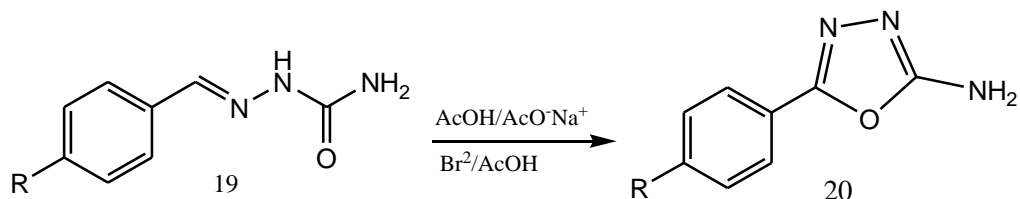
Katritzky i suradnici (2002.) pripremili su 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazol (**18**) u visokom iskorištenju reakcijom između di(benzotriazol-1-il)metanimine (**13**), i acilhidrazida **8** sintetskim putem **b** (Slika 36).



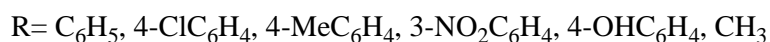
R₁= Ph, 4-t-BuC₆H₄, 4-NH₂C₆H₄, 4-OHC₆H₄, 4-NO₂C₆H₄, 4-ClC₆H₄, 2-ClC₆H₄, 4-Piridil, EtO

Slika 36 Sinteza 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazola iz acilhidrazidadi(benzotriazol-1-il)metanimina.

Oksidativna ciklizacija semikarbazona (**19**) s bromom u octenoj kiselinu je jedan od često korištenih pristupa za pripremu 5-supstituiranih-1,3,4-oksadiazol-2-amina (**20,a**) (Rajak i sur., 2011.; Gupta i sur., 2008.). Elektro-ciklizacija semikarbazona (**21**) do odgovarajućih 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazola (**22**) nastala je kao alternativna metoda (**b**) (Sharma i sur., 2010.; Lotfi i sur., 2011.).

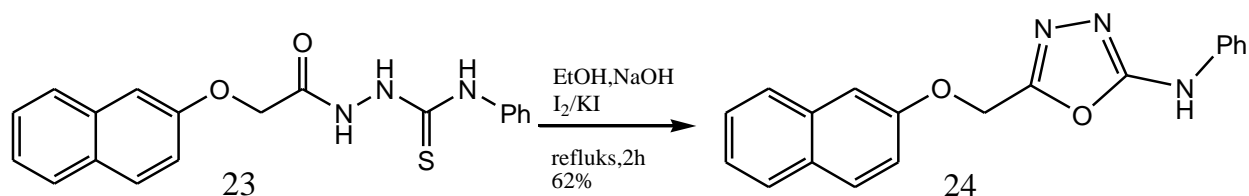


80-90%



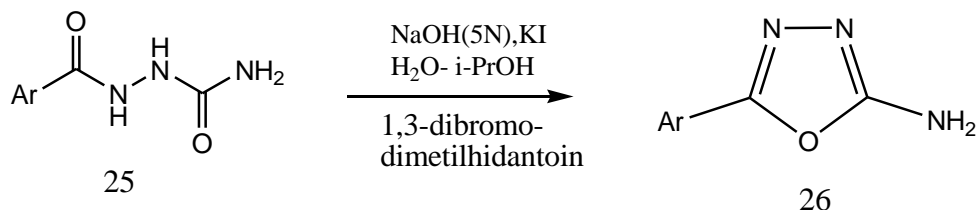
Slika 37 Dobivanje 5-supstituiranog-1,3,4-oksadiazol-2-amina reakcijom ciklizacije iz semikarbazida.

Još jedan zanimljiv pristup za sintezu 5-supstituiranih-2-amino-1,3,4-oksadiazola je reakcija ciklizacije aciltiosemikarbazida jodom kao oksidirajućim sredstvom. El-Sayed i suradnici (2012.) proveli su sintezu 5-((naftalen-2-iloksi)metil)-N-fenil-1,3,4-oksadiazol-2-amina (**24**) u 62%-tnom iskorištenju, grijanjem spoja **23** u etanolu u prisutnosti natrijevog hidroksida i joda (uz KI) (Slika 38).



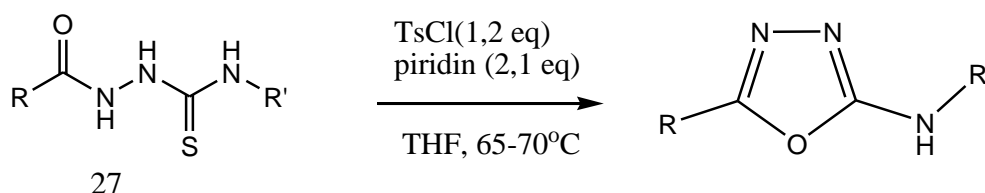
Slika 38 Sintaza 1,3,4-oksadiazol-2-amina reakcijom ciklizacije aciltiosemikarbazida uz pomoć joda.

Rivera i suradnici (2006.) izvjestili su da je 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoin učinkovito oksidacijsko sredstvo za reakciju ciklizacije aciltiosemikarbazida. Spoj **25** se ciklizira u 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazol (**26**) u odličnom iskorištenju. Glavna prednost ovog postupka je da su korišteni reagensi koji su jeftini i sigurni za rad. Nadalje, to je primjenjivo na sinteze u kojima se ne mogu koristiti druga oksidacijska sredstva.



Slika 39 Sinteza 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazola s aciltiosemikarbazidima i 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoinom.

Općenito, 5-aril(alkil)-2-amino-1,3,4-oksadiazoli se mogu pripremiti dehidratacijom derivata semikarbazida ili tiosemikarbazida koristeći POCl₃ (fosforov oksiklorid) kao sredstvo za dehidrataciju. Dolman i suradnici (2006.) opisali su novu metodu za sintezu 5-aril(alkil)-2-amino-1,3,4-oksadiazola (**28**) iz acilsemikarbazida (**27**) (X=O) i aciltiosemikarbazida (**27**) (X=S) uz pomoć tosil klorida. Iskorištenja od 97-99% dobivena su prilikom korištenja derivata tiosemikarbazida koji su reaktivniji od odgovarajućih derivata semikarbazida (Slika 40).

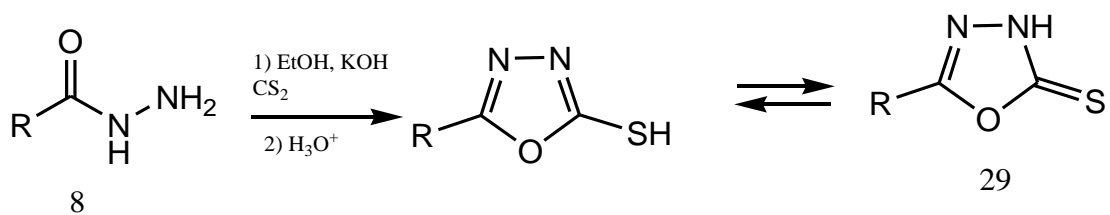


Slika 40 Sinteza 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazola iz aciltiosemikarbazida.

2.4.2.2. Metode sinteze za 5-supstituirani-1,3,4-oksadiazol-2-tiol

Glavni put sinteze 5-supstituiranog-1,3,4-oksadiazol-2-tiola(tiona) i (**29**) uključuje početnu reakciju između acilhidrazida (**8**) i ugljikovog disulfida u otopini alkohola, uz zakiseljavanje reakcijske smjese (Slika 41). Veliki broj derivata 1,3,4-oksadiazola pripremljen

na ovaj način opisan je u posljednjih nekoliko godina. Postojanje tiol-tion tautomerije je poznato za spoj **29**, pri čemu jedan od tautomernih oblika obično prevladava (Koparir i sur.,2005.).



Slika 41 Sinteza 5-supstituiranih-1,3,4-oksadiazol-2-tiola.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je sinteza 1,3,4-oksadiazolnog sustava u položaju 4-kumarinske jezgre. Dobivene spojeve potrebno je pročistiti do analitičke čistoće što se potvrđuje kromatografijom na tankom sloju. Potvrda njihove strukture i identifikacija određuje se na osnovi analitičkih podataka C,H,N elementarne mikroanalize i spektralnim podacima dobivenim IR-, ¹H-NMR spektrometrijom i spektrometrijom masa.

3.2. MATERIJALI I METODE

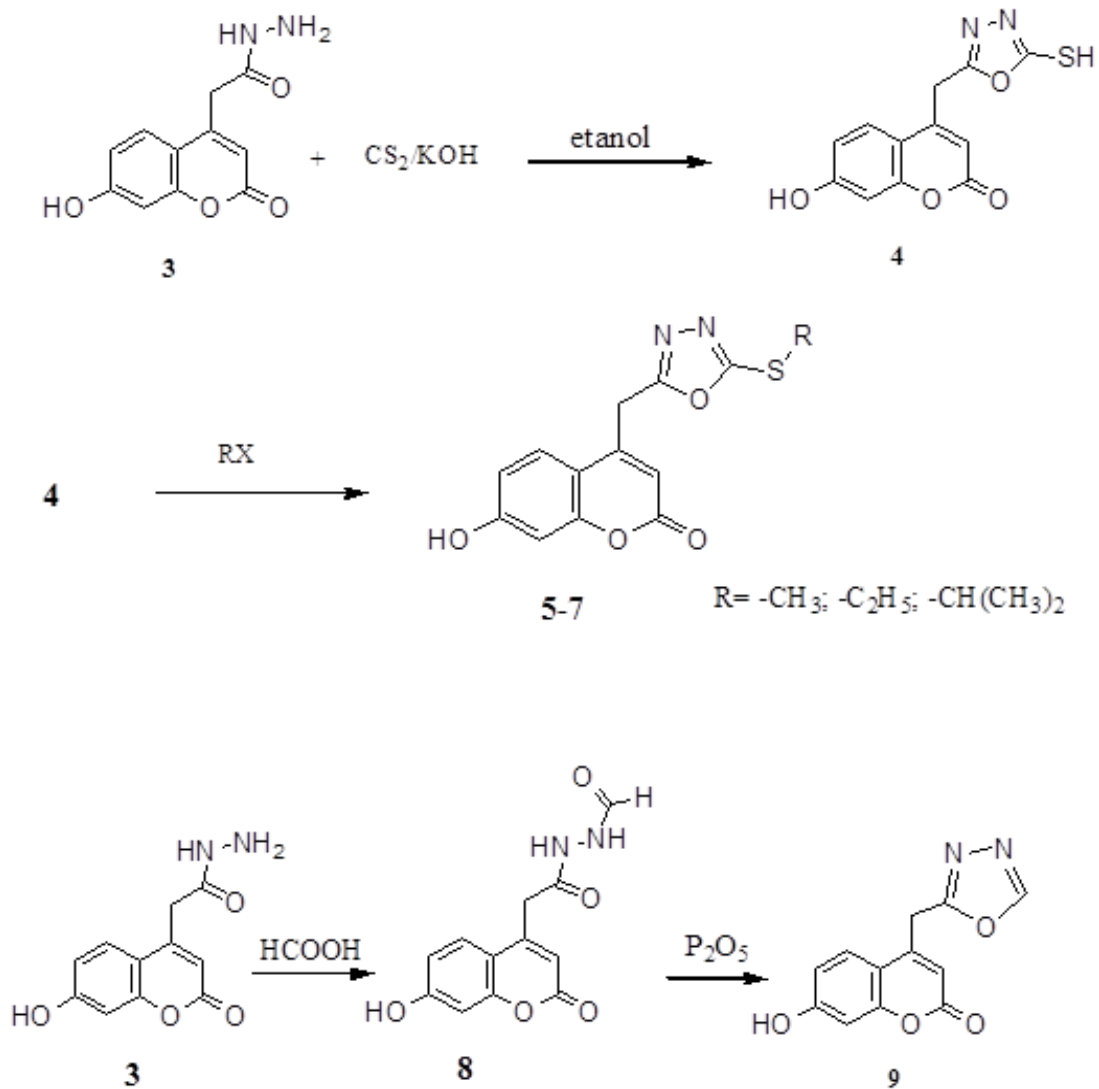
Za kromatografiju na tankom sloju upotrebljen je silikogel HF₂₅₄ kao stacionarna faza, a kao mobilna faza otopina sastava: benzen : aceton : octena kiselina (8 : 1 : 1). Za detekciju mrlja kod kromatografije na tankom sloju korišteno je UV svjetlo valnih duljina 254 i 365 nm.

Točke tališta određene su na uređaju Electrothermal.

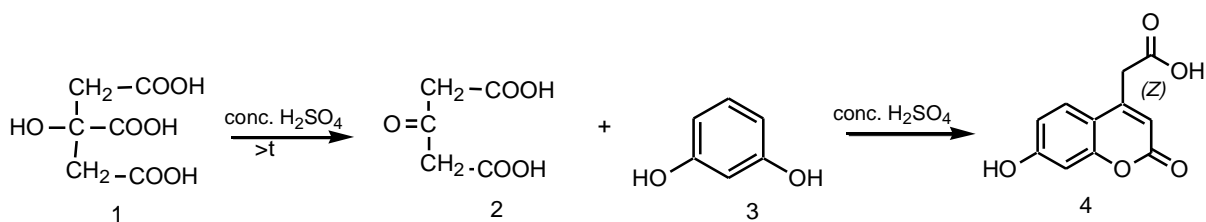
¹H-NMR spektri su snimljeni na Bruker spektrometru u (DMSO-d₆), dok je kao interni standard korišten tetrametilsilan (TMS). IR spektri su snimljeni na FT-IR spektrometru u krutom kalijevom bromidu.

¹H-NMR spektrometrija i elementarna analiza napravljene su na Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu, a IR spektrometrija na Odjelu za kemiju Sveučilišta u Osijeku.

3.3. SHEMATSKI PRIKAZ ZADATKA



3.4. SINTEZA (7-HIDROKSI-2-OKSO-2*H*-KROMEN-4-IL) OCTENE KISELINE



Fino usitnjena limunska kiselina (**1**) (100 g) i koncentrirana sumporna kiselina (135 mL) se mućkaju 30 minuta, zatim se reakcijska smjesa zagrije na 60-70°C. Ta temperatura se održava tijekom 30 minuta (za to vrijeme se razvija CO_2). Potom se smjesa ohladi na sobnu temperaturu, a zatim na -5°C . Rezorcinol (45 g) se dodaje tijekom pola sata pri konstantnoj temperaturi nižoj od 5°C , a nakon toga se dodaje koncentrirana sumporna kiselina (58 mL) u malim količinama u trajanju od 30 minuta. Nakon toga reakcijska smjesa se stavi u hladnjak do sljedećeg dana.

Reakcijska smjesa se potom ulije u smjesu vode i leda. Nastali kristali se odfiltriraju, isperu vodom, pri čemu nastaju bijeli talog 7-hidroksikumarin-4-octene kiseline (**4**). Prekristalizacijom iz etanola se dobiju bijeli igličasti kristali.

Iskorištenje: 81 % ; $T_t = 208 - 211^\circ\text{C}$; $R_f = 0,42$

Bruto formula: $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$ ($M_r = 220$)

Elementarna analiza $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$:

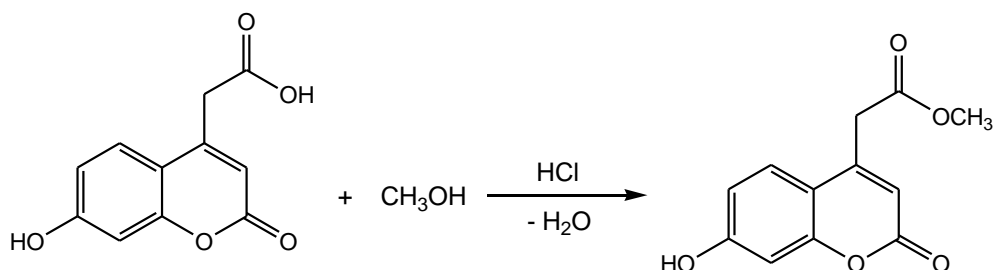
Računato: % C = 60,00; H = 3,64

Nađeno: % C = 60,07; H = 3,62

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta(\text{ppm})$: 4,16 (s, 2H iz CH_2 u položaju 4); 6,02 (s, H-3); 6,73 (s, H-8); 6,79 (d, H-6); 7,63 (d, H-5); 10,61 (s, 1H iz OH u položaju 7); 13,2 (s, 1H iz COOH).

3.5. SINTEZA (7-HIDROKSI-2-OKSO-2H-KROMEN-4-IL) METILNOG ESTERA OCTENE KISELINE

U 60 mL metanola uz dodatak koncentrirane klorovodične kiseline (5 - 10 mL) otopi se 10 g (7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-4-il) octene kiseline. Reakcijska smjesa se refluksira 2 - 3 sata. Hlađenjem ester kristalizira, a dobiveni kristali se odfiltriraju na lijevku po Buchneru, pa potom prekrizaliziraju iz etanola.



Iskorištenje : 60 %; $T_t = 173 - 174 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,51$

Bruto formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ($M_r = 234,05$)

Elementarna analiza $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$:

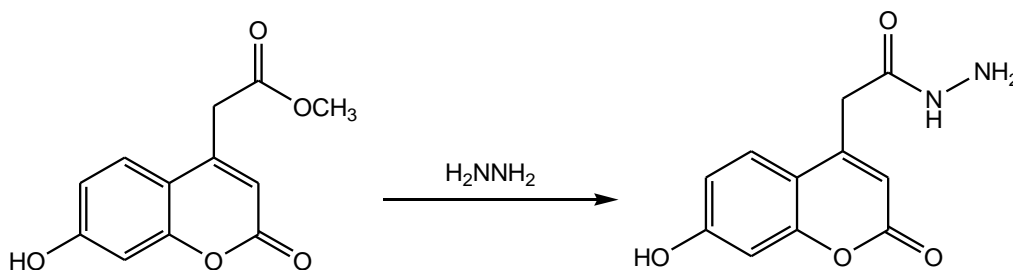
Računato: % C = 61,54; H = 4,30

Nađeno: % C = 61,55; H = 4,28

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta(\text{ppm})$: 3,76 (s, 3H, OCH_3); 4,16 (s, 2H iz CH_2 u položaju 4); 6,02 (s, H-3); 6,73 (s, H-8); 6,79 (d, H-6); 7,63 (d, H-5); 10,61 (s, 1H iz OH u položaju 7).

3.6. SINTEZA HIDRAZIDA NA BAZI (7-HIDROKSI-2-OKSO-2H-KROMEN-4-IL) OCTENE KISELINE

U metanolu (120 mL) uz dodatak 80% hidrazin hidrata (12 mL) otopi se 12,40 g (7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-4-il) metil estera octene kiseline. Reakcijska smjesa se ostavi preko noći na temperaturi od 25 °C. Dobiveni talog se profiltrira, ispere u metanolu i prekrizalizira iz razrijeđene octene kiseline ili vode.



Iskorištenje: 70 %; $T_f = 246$ °C; $R_f = 020$

Bruto formula: C₁₁H₁₀N₂O₄ (Mr = 234,21)

Elementarna analiza C₁₁H₁₀N₂O₄:

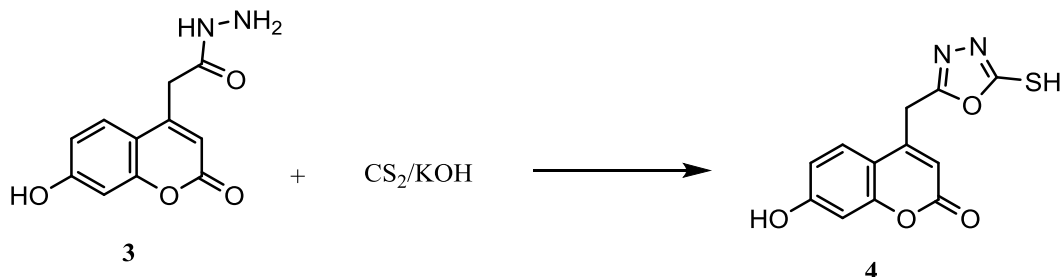
Računato: % C = 56,41; H = 4,30; N = 11,96

Nađeno: % C = 56,40; H = 4,32; N = 11,91

IR spektar (KBr-pastila): 3317, 3269, 3063, 2594, 1711, 1640, 1621, 1565, 1377, 1326 i 1141 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ(ppm): 3,34 (s, 2H, NH₂); 4,23 (s, 2H, CH₂); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,79 (s, 1H, H-8); 6,80 (d, 1H, H-6); 7,63 (s, 1H, H-5); 9,32 (s, 1H, NH); 10,52 (s, 1H, OH).

3.7. SINTEZA 7-HIDROKSI-4-((5-MERKAPTO-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)METIL)-2H-KROMEN-2-ONA



U otopinu hidrazida **3** (2,34 g, 10 mmol) u 150 mL metanola (150 mL) doda se otopina kalijevog hidroksida (0,84 g, 15 mmol) u etanolu (10 mL), potom 20 mL ugljikova disulfida. Reakcijska smjesa se zagrijava pod refluksom tijekom 6 sati, zatim se koncentrira, zakiseli s razrijeđenom HCl (15%-tna vodena otopina) i dobivena kruta tvar se filtrira, ispere s vodom i prekrizalizira iz smjese DMF-H₂O.

Iskorištenje: 78 %; T_f = 234 – 235 °C; R_f = 0,32

Bruto formula: C₁₂H₈N₂O₄S (Mr = 276,02)

Elementarna analiza C₁₂H₈N₂O₄S:

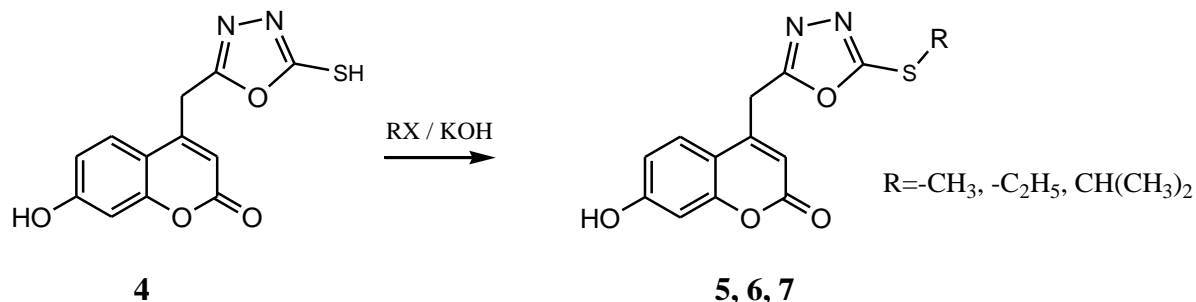
Računato: % C = 52,17; H = 2,92; N = 10,14

Nađeno: % C = 52,14; H = 2,90; N = 9,99

IR-spektar (KBr-pastila): 3389, 3090, 3052, 2961, 2929, 2603, 1716, 1621, 1605, 1561, 1477, 1401, 1321, 1206 i 1133 cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ(ppm): 3,38 (br s, 1H, -SH), 4,06 (s, 2H, CH₂), 6,30 (s, 1H, H-3), 6,76 (s, 1H, H-8), 6,81 (d, 1H, H-6), 7,65 (d, 1H, H-5), 10,56 (br s, 1H, OH).

3.8. SINTEZA 7-HIDROKSI-4-((5-ALKILTIO-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)METIL)-2H-KROMEN-2-ONA



Otopini spoja **4** (0,01 mol) u 20 mL apsolutnog etanola, dodaje se kalijev hidroksid (0,01 mol, 0,56 g), nakon čega se otopina refluksira 30 minuta.

U reakcijsku smjesu dokapava se odgovarajući alkil halid (0,01 mola), nakon čega slijedi refluksiranje 2 sata. Nakon hlađenja, smjesa se filtrira, a filtrat izlije u ledeno hladnu vodu. Sirovi produkt **5-7** se ofiltrira i prekrizalizira iz smjese etanol-vode.

5) 7-hidroksi-4-((5-(metiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2H-kromen-2-ona

Iskorištenje: 78 %; $T_f = 228 - 230 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,32$

Bruto formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($M_r = 290,04$)

Elementarna analiza $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$:

Računato: % C = 53,79; H = 3,47; N = 9,65

Nađeno: % C = 53,74; H = 3,50; N = 9,59

IR-spektar (KBr-pastila): 3372, 3090, 3052, 2961, 2929, 2603, 1686, 1621, 1605, 1561, 1477, 1401, 1321, 1206 i 1130 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta(\text{ppm})$: 1,42 (t, 1H); 3,38 (br s, 1H, -SH), 4,06 (s, 2H, CH_2), 6,30 (s, 1H, H-3), 6,76 (s, 1H, H-8), 6,81 (d, 1H, H-6), 7,65 (d, 1H, H-5), 10,56 (br s, 1H, OH).

6) 7-hidroksi-4-((5-(metiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)etil)-2H-kromen-2-ona

Iskorištenje: 78 %; $T_t = 224 - 225$ °C; $R_f = 0,36$

Bruto formula: $C_{14}H_{12}N_2O_4S$ ($M_r = 304,05$)

Elementarna analiza $C_{14}H_{12}N_2O_4S$:

Računato: % C = 55,25; H = 3,97; N = 9,21

Nađeno: % C = 55,24; H = 3,90; N = 9,19

IR: 3379, 3090, 3052, 2961, 2929, 2603, 1686, 1621, 1605, 1561, 1477, 1401, 1321, 1206 i 1138 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm): 1,42(t,3H); 2,45 (q,2H); 3,38 (br s, 1H, -SH), 4,06 (s, 2H, CH₂), 6,30 (s, 1H, H-3), 6,76 (s, 1H, H-8), 6,81 (d, 1H, H-6), 7,65 (d, 1H, H-5), 10,56 (br s, 1H, OH).

7) 7-hidroksi-4-((5-(isopropiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2H-kromen-2-ona

Iskorištenje: 65 %; $T_t = 216$ °C; $R_f = 0,48$

Bruto formula: $C_{15}H_{14}N_2O_4S$ ($M_r = 318,07$)

Elementarna analiza $C_{15}H_{14}N_2O_4S$:

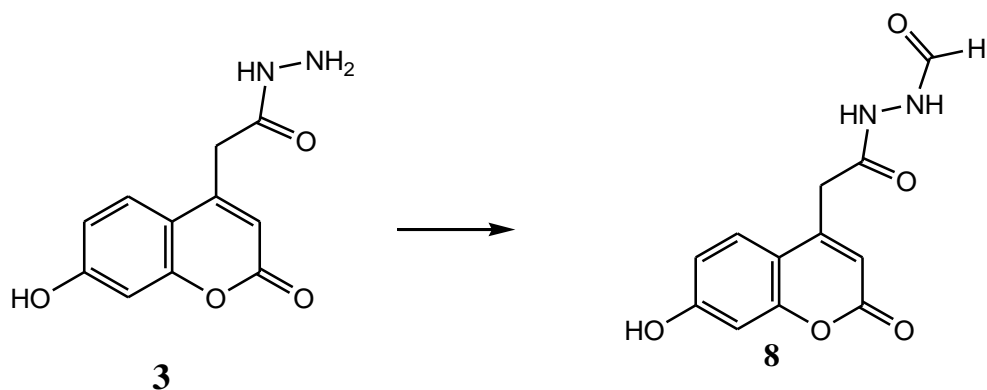
Računato: % C = 56,59; H = 4,43; N = 8,80

Nađeno: % C = 56,60; H = 4,39; N = 8,76

IR: 3379, 3090, 3052, 2961, 2929, 2603, 1686, 1621, 1605, 1561, 1477, 1401, 1321, 1206 i 1130 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm): 1,41(d,6H,CH₃); 3,38 (br s, 1H, -SH), 4,06 (sep, 2H, CH₂), 6,30 (s, 1H, H-3), 6,76 (s, 1H, H-8), 6,81 (d, 1H, H-6), 7,65 (d, 1H, H-5), 10,56 (br s, 1H, OH).

3.9. SINTEZA N'-FORMIL-2-(7-HIDROKSI-2-OKSO-2H-KROMEN-4-IL) ACETOHIDRAZIDA



Spoj **3** (1,17g, 5,0 mmola) se otopi u mravljoj kiselini (20 mL), a otopina refluksira 1 sat. Volumen reakcijske smjese se reducira pod sniženim tlakom. Čvrsti reakcijski produkt se prekrizalizira iz etanola.

Iskorištenje: 82 %; $T_f = 248$ °C; $R_f = 0,41$

Bruto formula: $C_{12}H_{10}N_2O_5$ ($M_r = 262,06$)

Elementarna analiza $C_{12}H_{10}N_2O_5$

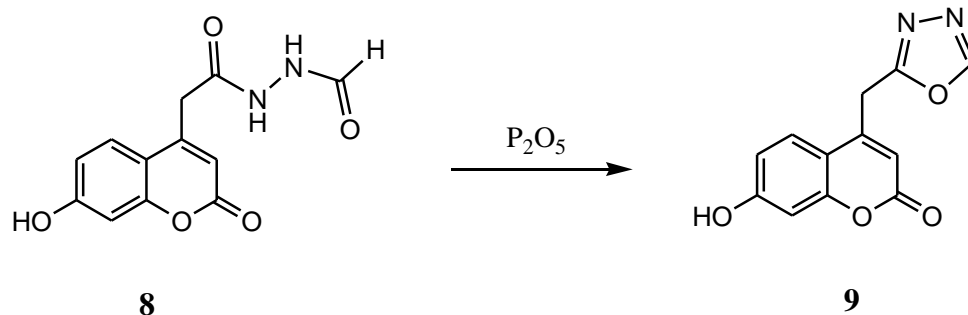
Računato: % C = 54,97; H = 3,84; N = 10,68

Nađeno: % C = 54,90; H = 3,72; N = 10,71

IR spektar (KBr-pastila): 3342, 3256, 3003, 1702, 1621, 1557, 1515, 1396, 1314 i 1139 cm^{-1} .

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm): 3,73 (s, 2H, CH₂), 6,25 (s, 1H, H-3), 6,73 (s, 1H, H-8), 6,81 (d, 1H, H-6), 7,62 (d, 1H, H-5), 8,03 (s, 1H, NH), 10,07 (s, 1H, NH), 10,32 (s, 1H, HC=O), 10,58 (s, 1H, OH).

3.10. SINTEZA 4-((1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)METIL)-7-HIDROKSI-2H-KROMEN-2-ONA



Otopini spoja **8** (0,01 mola) u ksilenu (150 mL) se dodaje fosforov pentoksid (0,01 mola). Smjesa se refluksira 1 - 2 sata. Otapalo se otpari pod sniženim tlakom, a smjesi se doda 10 mL vode i vodena otopina se ekstrahira kloroformom. Kloroformski ekstrakt se upari do suha pri čemu se dobije spoj **9**, koji se prekrizalizira iz benzena ili etilacetata.

Iskorištenje: 81 %; $T_t = 236\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,32$

Bruto formula: $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ ($M_r = 244,05$)

Elementarna analiza $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$:

Računato: % C = 59,02; H = 3,30; N = 11,47

Nađeno: % C = 59,00; H = 3,32; N = 11,21

IR spektar (KBr-pastila): 3313, 3269, 3063, 2594, 17112, 1640, 1621, 1565, 1370, 1326 i 1121 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta(\text{ppm})$: 4,22 (s, 2H, CH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,79 (s, 1H, H-8); 6,80 (d, 1H, H-6); 7,63 (s, 1H, H-5); 9,02 (s, 1H); 10,12 (s, 1H, OH).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Dobiveni novosintetizirani spojevi u ovom diplomskom radu su:

- a) 7-hidroksi-4-((merkaptio-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2*H*-kromen-2-on
- b) 7-hidroksi-4-((5-(metiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2*H*-kromen-2-on
- c) 7-hidroksi-4-((5-(metiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)etil)-2*H*-kromen-2-on
- d) 7-hidroksi-4-((5-(isopropiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2*H*-kromen-2-on
- e) N'-formil-2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) acetohidrazid
- f) 4-((1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on

Spojevi su pročišćeni do analitičke čistoće, potvrđena je njihova struktura i svojstva. Struktura novosintetiziranih spojeva potvrđena je analitičkim i spektralnim tehnikama: tankoslojnom kromatografijom i elementranom mikroanalizom te ¹H-NMR spektrometrijom i spektrometrijom masa.

Spoj **3** sa CS₂ u apsolutnom etanolu uz prisustvo KOH preveden je u 7-hidroksi-4-((5-merkaptio-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2*H*-kromen-2-on **4**. Iz IR-spektra spoja **4** uočljive su apsorpcijske vrpce kod 1561 cm⁻¹ za C=N veze i 1321 cm⁻¹ koja pripada C-O-C vezi. Iz ¹H-NMR spektralnih podataka nema signala koji odgovaraju NH odnosno NH₂ skupinama. Analitički podaci elementarne analize odgovaraju u izračunatim granicama.

Analizom IR-spektra spoja **5** jasno su vidljive karakteristične apsorpcijske vrpce koje odgovaraju C=N vezama C-O-C vezi, te vrpca u intervalu 2960 do 3050 cm⁻¹. Metilni protoni imaju pomak 1,42 ppm. Nedostaje signal koji karakterizira –SH protone. Spektar masa spoja **5** korektno daje molekularni ion (M⁺ = 291,02). Elementarna analiza u potpunosti odgovara.

Spoj 7-hidroksi-4-((5-(etiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-2*H*-kromen-2-on **6** ima sličan IR-spektar u kojem se intezivira apsorpcijska vrpca u intervalu 3052 do 3090 cm⁻¹. U ¹H-NMR spektru vrlo lijepo se vide signali koji pripadaju metilnim i metilenskim protonima kod 1,42 ppm i 2,45 ppm. Iz spektra masa jasno je vidljiv molekularni ion.

Elementarna analiza je korektna.

Treći alkiltiosupstituirani 1,3,4-oksadiazol **7** prema snimljenom IR-spektru i ¹H-NMR spektru osnovano se pripisuje navedena struktura. Molekularni ion sukladan je izračunatoj vrijednosti.

N'-formil-2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)acetohidrazid **8** prema vrijednostima za apsorpcijske vrpce i kemijske pomake (IR i ¹H-NMR spektri) nepobitno se može pripisati struktura koja se očekivala.

Refluksiranjem spoja **8** u ksilenu uz prisustvo P₂O₅ nastao je 4-((1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on. Spektar masa spoja **8** snimljen u negativnom modu daje molekularni ion koji odgovara molekularnoj masi. Struktura je potvrđena i IR-spektrom i ¹H-NMR spektrom, što je vidljivo iz priloženih spektralnih podataka.

5. ZAKLJUČAK

Sinteze u ovom radu su provedene zbog pretpostavke da spojevi kumarina s 1,3,4-oksadiazolnom skupinom mogu biti biološki aktivni. 1,3,4-Oksadiazoli su u strukturi mnogih sintetskih farmaceutskih pripravaka koji pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antibakterijska i antifungalna svojstva. Upravo iz tih razloga bi trebalo dodatno ispitati novosintetizirane spojeve pomoću poznatih biokemijskih testova.

Svi dobiveni spojevi su prekrystalizirani iz apsolutnog etanola, osušeni u vakumu, a temperature tališta su im određene pomoću uređaja Electrothermal.

Daljnja analiza novonastalih spojeva je provedena kromatografijom na tankom sloju silikagela HF₂₅₄, a mobilnu fazu je činio sustav otapala-benzen:octena kiselina:aceton u omjeru 8:1:1. Razvijeni kromatogrami su očitani pod UV svjetlom valne duljine 254 i 365 nm. Novonastali spojevi su potvrđeni i spektralnom i elementatnom analizom.

Biološka aktivnost dobivenih spojeva nije do sada ispitana, ali je u planu jer ako promatramo biološku aktivnost pojedinih komponenti od kojih se sastoje novosintetizirani spojevi, onda možemo pretpostaviti visoku vjerojatnost da će i oni pokazivati slična svojstva.

6. LITERATURA

1. Baker W, Haksar CN, McOmie JF: Fluorescent reagents. Acyl chlorides and acyl hydrazides. *Journal of the Chemical Society* 170–173, 1950.
2. Balial V, Seshardi TR, Venkateswarlu V: Visible fluorescence and chemical constitution of compounds of the benzopyrone group. *Proceedings of the Indian Academy Science* 16:68–82, 1942.
3. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E: Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry* 12:887–916, 2005.
4. Boström J, Hogner A, Llinàs A, Wellner E, Plowright AT: Oxadiazoles in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 55: 1817–1830, 2012.
5. Čačić M: Sinteza novih derivata na bazi 4,7-dihidroksi-kumarina. *Disertacija*. Tehnološki fakultet, Zagreb, 1982.
6. De Long H, Vles O, Van Pelt JG: *Nature*, London, 202, 466, 1964.
7. Desai NC, Shah MD, Bhavsar AM: Synthesis and QSAR studies of 4-oxathiazolidines and 2-oxo-azetidines as potential antibacterial agents. *Indian Journal of Chemistry* 47B:1135–1144, 2008.
8. Dolman SJ, Gosselin F, O'shea PD, Davies IW: Superior reactivity of thiosemicarbazide in the synthesis of 2-amino-1,3,4-oxadiazoles. *J. Org. Chem.* 71: 9548–9551, 2006.
9. El-Ansary SL, Aly EI, Halem MA: New coumarin derivatives as antibacterial agents. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* 33:379–390, 1992.
10. El-Sayed WA, Ali OM, Hendy HA, Abdel-Rahman AA: Synthesis and antimicrobial activity of new 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles and their sugar derivatives. *Chin. J. Chem.* 30: 77–83, 2012.
11. Fuloria NK, Singh V, Shaharyar M, Ali M: Synthesis and antimicrobial evaluation of some new oxadiazoles derived from phenylpropionohydrazides. *Molecules* 14: 1898–1903, 2009.
12. Garazd MM, Garazd YaL, Khilya VP: Neoflavones 2: Methods for synthesizing and modifying 4-aryl coumarins. *Chemistry of Natural Compounds* 3:245–271, 2005
13. Gupta V, Kashaw SK, Jatav V, Mishra P: Synthesis and antimicrobial activity of some new 3-[5-(4-substituted) phenyl-1,3,4-oxadiazole-2yl]-2-styrylquinazoline-4(3H)-ones. *Med. Chem. Res.* 17: 205–211, 2008.
14. Huebner C, Link KP: Studies on 4-hydroxycoumarin. VII. Reactions of 4-hydroxycoumarin with cationoid reagents. *Journal of the American Chemical Society* 67:99–102, 1945.

15. James ND, Growcott JW: Zibotentan. *Drugs Future* 34: 624–633, 2009.
16. Karah N, Terzioglu N, Gursoy A: *Drug res.* 50, 167-172, 2000.
17. Kashaw SK, Gupta V, Kashaw V, Mishra P, Stables JP, Jain NK: Anticonvulsant and sedative-hypnotic activity of some novel 3-[5-(4-substituted) phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-yl]-2-styrylquinazoline-4(3H)-ones. *Med. Chem. Res.* 19: 250–261, 2010.
18. Katritzky AR, Vvedensky V, Cai X, Rogovoy B, Steel PJ: Synthesis of 5-(2-arylazanyl)-1,2,4-triazoles and 2-amino-5-aryl-1,3,4-oxadiazoles. *ARKIVOC* 6: 82–90, 2002.
19. Kerimov I, Ayhan-Kılıçgil G, Özdamar ED, Can-Eke B, Çoban T, Özbey S, Kazak C: Design and one-pot and microwave-assisted synthesis of 2-amino/5-aryl-1,3,4-oxadiazoles bearing a benzimidazole moiety as antioxidants. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 345: 349–356, 2012.
20. Kočić A: Sinteza 7-hidroksi-4-kumaringlicina. *Diplomski rad.* Pedagoški fakultet, Osijek, 2000.
21. Koparir M, Çetin, A, Cansız A: 5-Furan-2-yl[1,3,4]oxadiazole-2-thiol, 5-furan-2-yl-4H[1,2,4]triazole-3-thiol and their thiol-thione tautomerism. *Molecules* 10: 475–480, 2005.
22. Kuleš M: Prilog poznavanju kemije 4-hidroksikumarina. *Disertacija.* Tehnološki fakultet, Zagreb, 1978.
23. Kuznecova HA: *Prirodne kumarini i furokumarini*, Nauka, Lenjingrad, 1967.
24. Lacy A, O'Kennedy R: Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current Pharmaceutical Design* 10:3797–3811, 2004.
25. Lever M: A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 47:273–279, 1972.
26. Lin KJ, Kenan KA, Miller EC, Miller JA: *Cancer Res.* 38, 2424, 1978.
27. Lotfi B, Mustafa B, Leila L, Salima M: Electrocyclization of semicarbazone; A novel route of green synthesis of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles. *Int. J. Electrochem. Sci.* 6: 1991–2000, 2011.
28. March J: *Advanced Organic Chemistry*, Third Editiona, New York, J. Willey, 499, 1985.
29. Merchart JR, Desai HK: *Indian J. Chem.* 11,433, 1973.
30. Morrison RT, Boyd RN: *Organska kemija*. Sveučilišna naknada Liber, Zagreb, 1979.
31. Oliveira CS, Lira BF, Falcão-Silva VS, Siqueira-Junior JP, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF: Synthesis, molecular properties prediction, and anti-staphylococcal activity of

- N*-acylhydrazones and new 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Molecules* 17: 5095–5107, 2012.
32. Ouyang X, Piatnitski EL, Pattaropong V, Chen X, He HY, Kiselyov AS, Velankar A, Kawakami J, Labelle M, Smith L: Oxadiazole derivatives as a novel class of antimetabolic agents: Synthesis, inhibition of tubulin polymerization, and activity in tumor cell lines: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1191–1196, 2006.
33. Patel NB, Patel JC: Synthesis and antimicrobial activity of 3-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)quinazolin-4(3H)-ones. *Sci. Pharm* 78: 171–193, 2010.
34. Patzak R, Neugebauer L: Über polarographische untersuchungen von cumarinen. I. *Monatshefte für Chemie* 82:662–670, 1951.
35. Rajak H, Agarawal A, Parmar P, Thakur BS, Veerasamy R, Sharma PC, Kharya MD: 2,5-Disubstituted-1,3,4-oxadiazoles/thiadiazole as surface recognition moiety: Design and synthesis of novel hydroxamic acid based histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21: 5735–5738, 2011.
36. Rivera NR, Balsells J, Hansen KB: Synthesis of 2-amino-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles using 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin as oxidant. *Tetrahedron Lett.* 47: 4889–4891, 2006.
37. Savarino A: A historical sketch of the discovery and development of HIV-1 integrase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* 15: 1507–1522, 2006.
38. Shah RS, Bafna SL: Ultraviolet absorption spectra of coumarins. *Indian Journal of Chemistry* 1:400, 1963.
39. Sharma LK, Kumar S, Singh S, Singh RKP: Electrochemical synthesis of 5-substituted-2-amino-1,3,4-oxadiazoles at the Ilatinum electrode. *Russ. J. Electrochem.* 46: 34–40, 2010.
40. Šarkanj B: Sinteza i dizajn novih tiadiazina s kumarinskom jezgrom. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
41. Temesgen Z, Siraj DS: Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor. *Ther. Clin. Risk Manage.* 4: 493–500, 2008.
42. Trivedi JC, Bariwal JB, Upadhyay KD, Naliapara YT, Joshi SK, Pannecouque C, DeClercq E, Shah AK: Improved and rapid synthesis of new coumarinylchalcone derivatives and their antiviral activity. *Tetrahedron Letters* 48:8472-8474, 2007.
43. Tuma MC, Malikzay A, Ouyang X, Surgulazde D, Fleming J, Mitelman S, Camara M, Finnerty B, Doody J, Chekler ELP: Antitumor activity of IMC-038525, a novel oral tubulin polymerization inhibitor. *Transl. Oncol.* 3: 318–325, 2010.

44. [url:http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/content/full/22/1/73](http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/content/full/22/1/73) [16.04.2014.]
45. Vogel A: Darstellung von Benzoessäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten- oder Steinklee – Blumen. *Annalen der Physik* 64:161–166, 1820.
46. www.zdravlje.hr [16.04.2014.]
47. Zarghi A, Tabatabai SA, Faizi M, Ahadian A, Navabi P, Zanganeh V, Shafiee A: Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-(2-benzyloxyphenyl)-1,3,4-oxadiazoles. *Bioorg. Chem. Lett.* 15: 1863–1865, 2005.