

Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Martina Rajić

Salicin i derivati salicina

(Salicin and its derivatives)

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Komentor: izv. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

Osijek, 2019.

SAŽETAK

Salicin je prvi fenolni glukozid pronađen u prirodi, a oralnom primjenom metabolizira u farmakološki aktivni oblik salicilnu kiselinu. Postoji mnogo derivata salicilne kiseline, od kojih je jedan najpoznatiji i najviše korišten lijek, acetilsalicilna kiselina ili Aspirin[®]. Aspirin je lijek koji ima svojstvo antipiretika i antikoagulanta, a djeluje tako što inhibira aktivnost enzima kao ciklooksigenaze koji dovodi do stvaranja prostaglandina, tvari odgovorne za upalu i bol. Najpoznatija metoda sinteze acetilsalicilne kiseline je esterifikacija salicilne kiseline acetanhidridom uz fosfatnu ili sumpornu kiselinu. Cilj završnog rada bio je ispitati mogućnost sinteze acetilsalicilne kiseline reakcijom esterifikacije salicilne kiseline acetanhidridom konvencionalnom metodom, ali uz uporabu eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida (ChCl) za koja se može pretpostaviti katalitička uloga u reakciji esterifikacije. Rezultati eksperimentalnog rada pokazali su da se eutektičko otapalo ChCl: levulinska kiselina i ChCl: limunska kiselina ne mogu koristiti kao katalizator u sintezi acetilsalicilne kiseline. Međutim, uz uporabu eutektičkog otapala ChCl : urea dobivena je acetilsalicilna kiselina pri čemu je po prvi puta potvrđena mogućnost primjene eutektičkih otapala u sintezi acetilsalicilne kiseline.

Ključne riječi: salicin, derivati, aspirin, acetilsalicilna kiselina, eutektička otapala, sinteza

ABSTRACT

Salicin is the first phenolic glucoside found in nature and after oral use it is metabolized to a pharmacologically active form, salicylic acid. There are many salicylic acid derivatives, one of which is the most commonly used drug, acetylsalicylic acid or aspirin. Aspirin is a medicine that has antipyretic and anticoagulant properties and acts by inhibiting activity of the enzyme cyclooxygenase which is responsible for the production of prostaglandins, substances responsible for inflammation and pain. The most known method of aspirin synthesis is esterification of salicylic acid with acetic anhydride with phosphoric or sulfuric acid. The aim of final thesis was to investigate the possibility of aspirin synthesis by conventional method, but with the use of choline chloride (ChCl) eutectic solvents for which a catalytic role in the esterification reaction can be assumed. The results of the experimental work showed that the eutectic solvents ChCl: levulinic acid and ChCl: citric acid can't be used as catalyst for the acetylsalicylic acid synthesis. However, with the use of eutectic solvent ChCl: urea, acetylsalicylic acid was obtained and for the first time the possibility of using eutectic solvent in the acetylsalicylic acid synthesis was confirmed.

Keywords: salicin, derivatives, aspirin, acetylsalicylic acid, eutectic solvents, synthesis



Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "*Zelene tehnologije u sintezi heterocikličkih spojeva*" (UIP-2017-05-6593).

Sadržaj

1. Uvod.....	6
2. Biosinteza i metabolizam β -D-salicina	6
2.1. Izolacija salicina iz bijele vrbe (<i>Salix Alba</i>)	6
2.2. Struktura β -D-salicina i transformacija u salicilnu kiselinu	7
3. Kemijska svojstva salicilne kiseline	8
3.1. Biosinteza salicilne kiseline iz fenilalanina	9
3.2. Sinteza salicilne kiseline Kolbe-Schmitt reakcijom	10
3.3. Derivati salicilne kiseline.....	12
4. Otkriće Aspirina.....	14
5. Fizikalno-kemijska svojstva aspirina	16
6. Farmakološka svojstva Aspirina	18
7. Mehanizam djelovanja	19
8. Metode sinteze aspirina.....	21
9. Eksperimentalni dio	28
9.1. Priprava eutektičkih otapala na bazi ChCl	29
9.2. Klasična sinteza aspirina u eutektičkim otapalima	29
10. Rezultati	30
11. Zaključak.....	33
12. Literatura.....	34
§ Popis korištenih kratica i simbola	36

1. Uvod

Aspirin® ili acetilsalicilna kiselina jedan je od najpoznatijih i najstarijih salicilatnih lijekova. Koristi se kao analgetik, antipiretik, protuupalni lijek te ima svojstvo antitrombocita, odnosno sprječava sljepljivanje trombocita i umanjuje stvaranje krvnih ugrušaka. Najčešće se dobiva sintezom iz salicilne kiseline, koja se dobiva oksidacijom β -D-salicina koji se izolira iz kore drveta bijele vrbe (lat. *Salix Alba*). Mehanizam djelovanja Aspirina zasniva se na inhibiciji enzima ciklooksigenaze koji je odgovoran za sintezu prostaglandina, tvari koja je zaslužna za bol i upalu. Aspirin inhibira aktivnost dvije izoforme ciklooksigenaze u ovisnosti o dozi, pa tako niske doze inhibiraju aktivnost ciklooksigenaze-1, dok visoke doze inhibiraju aktivnost ciklooksigenaze-1 i ciklooksigenaze-2. Cilj ovog rada bio je opisati otkriće, kemijska i biokemijska svojstva acetilsalicilne kiseline te po prvi put sintetizirati acetilsalicilnu kiselinu u eutektskim otapalima na bazi kolin-klorida, odnosno ispitati mogućnost katalitičkog djelovanja eutektskog otapala u reakciji salicilne kiseline i acetanhidrida.

2. Biosinteza i metabolizam β -D-salicina

2.1. Izolacija salicina iz bijele vrbe (*Salix Alba*)

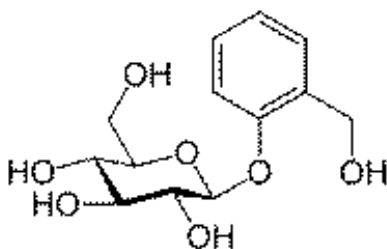
Stoljećima prije nego što su znanstvenici istražili terapijske učinke salicilata, ljudi su primijetili da lišće i kora drveta bijele vrbe (*Salix alba*) smanjuje bolove i temperaturu. U 4. st. pr. kr. Hipokrat je davao ženama da žvaču lišće vrbe kako bi smanjile porođajne bolove. Tijekom vremena francuski i njemački znanstvenici su se natjecali tko će izolirati aktivni sastojak vrbine kore. Konačno, 1828. godine Johann Büchner, profesor farmakologije uspješno je izolirao i pročistio malu količinu salicina (glukozid salilnog alkohola) koji je glavni salicilat u bijeloj vrbi [1]. Godinu dana kasnije, francuski farmaceut Henri Leroux, poboljšao je proces pročišćavanja i po prvi put dobio salicin u kristalnoj formi [2]. Deset godina kasnije talijanski kemičar Raffaele Pirie pretpostavio je da je salicin glukozid koji se može razdvojiti na šećernu komponentu glukozu i aglikon odnosno nešećernu komponentu (saligenin) te hidrolizom i oksidacijom salicina dobio salicilnu kiselinu [1].

Vrba, kao i ostale ljekovite biljke, smatraju se bioreaktorom za biosintezu mnogih fitokemikalija, uključujući ljekovitu fitokemikaliju salicin. Ove fitokemikalije smatraju se sekundarnim metabolitima jer doprinose rastu, preživljavanju, reprodukciji i procesu iscjeljivanja

biljaka te imaju važnu ulogu u ekološkom opstanku biljaka protiv biotskog i abiotskog stresa. Ova molekula privukla je pozornost znanstvenika na raznim interdisciplinarnim područjima uključujući kemiju, farmakologiju i medicinu. Otkrića u fitokemiji i farmakologiji te brz razvoj analitičkih tehnika doprinijeli su proučavanju svojstava salicina i njegova metabolita, salicilne kiseline. Analiza kemijskih struktura ovih dvaju fitokemikalija, dovela je do otkrića najpoznatijeg antiinflamatornog lijeka acetilsalicilne kiseline, poznatijeg pod nazivom Aspirin.

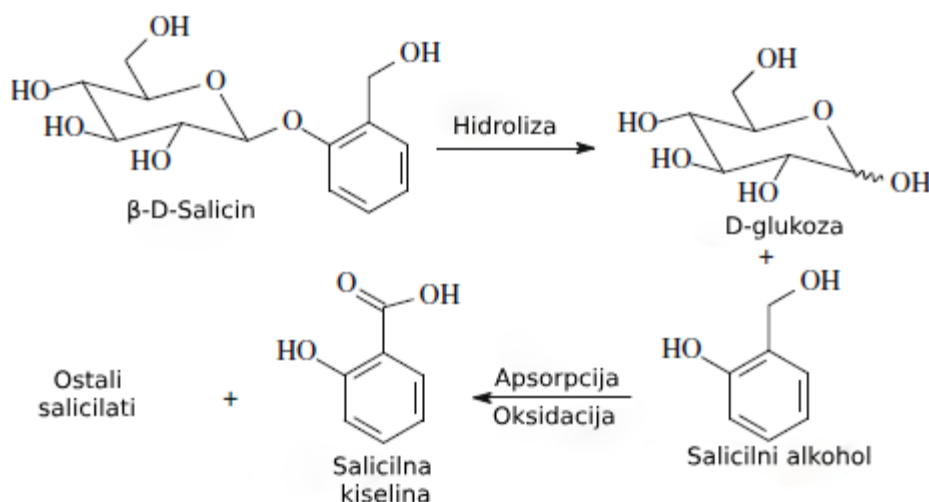
2.2. Struktura β -D-salicina i transformacija u salicilnu kiselinu

β -D-Salicin ili 2-(hidroksimetil)fenil-*O*- β -D-glukopiranozid ($C_{13}H_{18}O_7$; 286,27782 g/mol) je prvi fenolni glukozid pronađen u prirodi, *Slika 1*. Kemijska struktura obuhvaća 2-hidroksibenzilni alkohol ili salicilni alkohol te β -D-glukoze. Salicin sadrži sedam kisikovih atoma koji se ponašaju kao akceptori H-veze i pet hidroksilnih skupina koje su donori H-veza. β -D-glukoza i salicilni alkohol povezani su β -1,1'-D-glikozidnom vezom. Zbog velikog broja hidroksilnih skupina i polarnih veza ekstrakcija salicina zahtijeva polarni sustav otapala kao što su voda ili etanol.



Slika 1. Struktura β -D-salicina.

Salicin se nakon oralne primjene metabolizira u farmakološki aktivni oblik, salicilnu kiselinu. Ovaj metabolički korak, točnije hidroliza, odvija se u gastrointestinalnom traktu gdje se salicin razlaže na D-glukoze i salicilni alkohol. Slično tome, acetilsalicilna kiselina također hidrolizira u salicilnu kiselinu i octenu kiselinu [3]. Nakon apsorpcije, salicilni alkohol se oksidira u salicilnu kiselinu i druge salicilate kao što su saligenin, salicilurinska kiselina, salicil glukuronoidi i gentinska kiselina, te se svi oni eliminiraju preko bubrega, *Shema 1* [2].



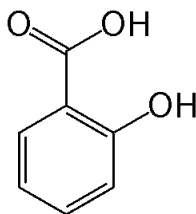
Shema 1. Hidroliza i oksidacija salicina.

3. Kemijska svojstva salicilne kiseline

Salicilna kiselina je monohidroksibenzojeva kiselina, vrsta fenolne kiseline i betahidroksi kiseline. Dobiva se metabolizmom salicina, kemijski je slična svom analogu acetilsalicilnoj kiselini, a vjerojatno je najpoznatija po upotrebi u tretmanima akni. Soli i esteri salicilne kiseline poznati su kao salicilati [4]. Salicilna kiselina pripada izuzetno heterogenoj skupini biljnih fenola koji se obično definiraju kao tvari koje imaju aromatski prsten sa hidroksilnom skupinom ili njezinim funkcionalnim derivatom. Biljni fenoli se često nazivaju sekundarnim metabolitima, a pojam „sekundarni“ implicira da su takvi spojevi od manje važnosti za biljke. Međutim, postepeno se ovaj pojam zamijenio stajalištem kako mnogi fenolni spojevi imaju bitnu ulogu u regulaciji rasta biljaka, razvoja i interakcije s drugim organizmima. Primjerice, fenoli su neophodni za biosintezu lignina, važne strukturne komponente stanične stjenke. Također, fenoli, najčešće fitoaleksini su povezani s obranom biljaka od mikroba, insekata i biljojeda. Eksperimentalni dokazi sve više sugeriraju da fenoli funkcioniraju kao signali u interakcijama između biljaka i mikroba.

Čista salicilna kiselina je kristalni prah čija je temperatura tališta 157-159°C. Umjereno je topljiva u vodi, a izrazito topljiva u organskim otapalima. Salicilna kiselina fluorescira pri 412 nm kada je pobuđena na 301 nm, a ovaj podatak može se koristiti za detektiranje spoja u velikom broju biljaka. Zasićena otopina salicilne kiseline ima pH koji iznosi 2,4.

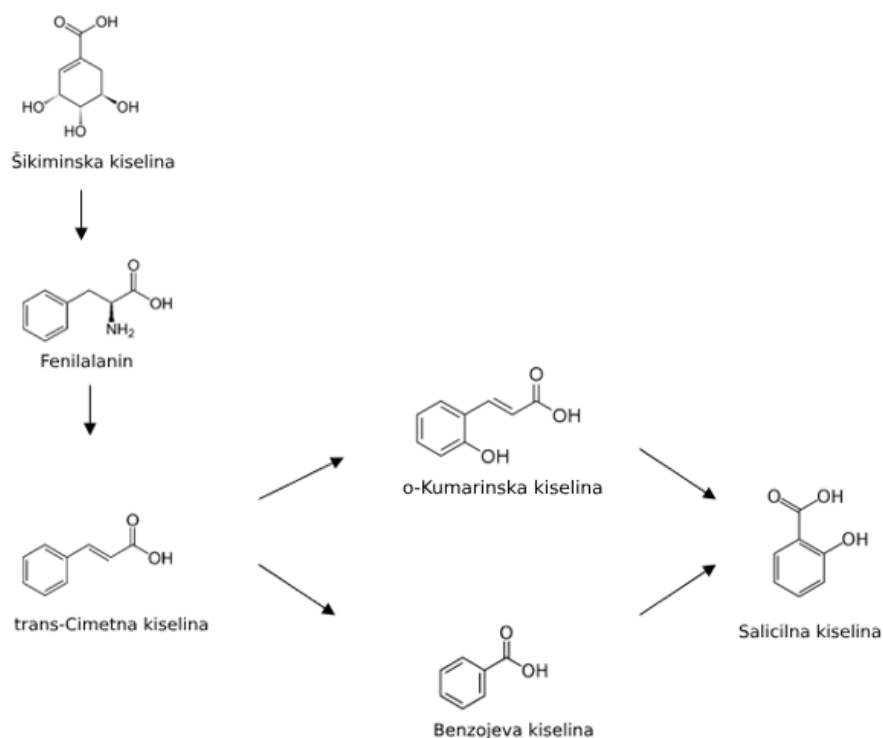
Prisutnost salicilne kiseline u biljkama je davno pretpostavljena, a potvrđena je od strane nekoliko istraživača pomoću suvremenih analitičkih tehnika. Biljke poput riže, svračice, ječma i soje imaju salicilnu kiselinu u koncentraciji i iznad 1 $\mu\text{g/g}$ svježih biljke.



Slika 2. Struktura salicilne kiseline.

3.1. Biosinteza salicilne kiseline iz fenilalanina

U cilju povećanja razine salicilne kiseline u biljkama potrebno je razumijevanje biosintetskog puta, *Shema 2*. Najvažniji mehanizam za stvaranje benzojeve kiseline u biljkama je degradacija cimetnih kiselina, koje su bitni intermedijeri biosintetskog puta šikiminske kiseline. Salicilna kiselina se može promatrati kao derivat cimetne kiseline, a pretvorba cimetne kiseline u salicilnu kiselinu može se odvijati preko dva različita puta. Ti biosintetički putovi razlikuju se po redoslijedu β -oksidacijskih i *ortho*-hidroksilacijskih reakcija te se mogu nezavisno odvijati u biljkama. To je potvrđeno kada su mlade rajčice inficirane pomoću *Agrobacterium tumefaciens* pri čemu je došlo do povećanja *ortho*-hidroksilacije cimetne kiseline u *o*-kumarinsku kiselinu, nakon čega je slijedila β -oksidacija u salicilnu kiselinu. U biljkama koje nisu bile inficirane, biosintetski put cimetna kiselina \rightarrow benzojeva kiselina \rightarrow salicilna kiselina, je bio aktivniji [1].

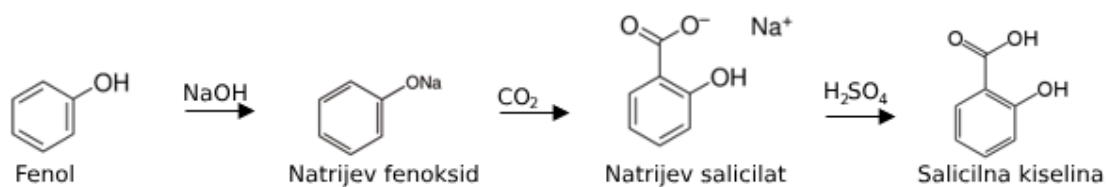


Shema 2. Predloženi put biosinteze salicilne kiseline u biljkama.

3.2. Sinteza salicilne kiseline Kolbe-Schmitt reakcijom

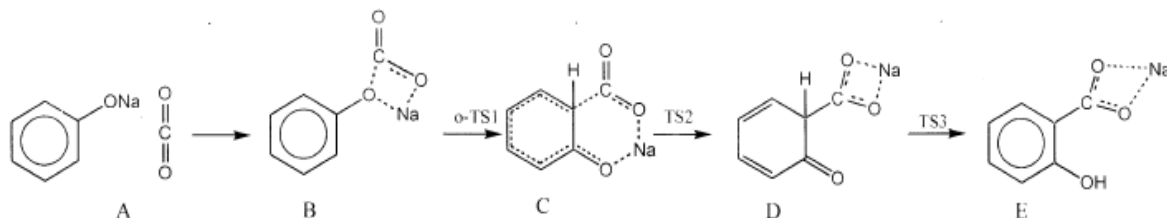
Salicilnu kiselinu je 1860. godine sintetizirao H. Kolbe zagrijavanjem smjese fenola i natrija u prisutnosti ugljikovog dioksida pri atmosferskom tlaku, *Shema 3*. Kolbe je ustanovio da se iskorištenje reakcije sinteze salicilne kiseline povećava na 50% ukoliko se kao početni reaktant koristi natrijev fenoksid umjesto fenola. Modifikaciju Kolbe-ove reakcije izveo je 1884. godine R. Schmitt, reakcija se odvijala pri povećanom tlaku pri čemu se znatno povećao prinos reakcije sinteze salicilne kiseline. Reakcija karboksilacije fenoksida alkalijskog metala s ugljikovim dioksidom u hidroksibenzojevu kiselinu, poznata je kao Kolbe-Schmitt reakcija. Glavni produkt reakcije natrijevog fenoksida i ugljikovog dioksida je salicilna kiselina (94-97%), iako su *p*-hidroksibenzojeva i 4-hidroksiizoftalna kiselina također identificirane u reakcijskoj smjesi, ali u niskom iskorištenju (2-4%). Važno je napomenuti, ukoliko se kalijev fenoksid upotrebljava umjesto natrijevog fenoksida, *p*-hidroksibenzojeva kiselina nastaje u suvišku. Iz tog se može zaključiti da raspodjela produkata u Kolbe-Schmitt reakciji ovisi o upotrijebljenom metalnom

kationu. Na reakciju ne utječe znatno varijacija tlaka između 80 i 130 atm. Kolbe-Schmitt reakcija upotrebljava se za industrijsku sintezu salicilne kiseline od 1874. godine.



Shema 3. Kolbe-Schmitt reakcija.

U prvoj teorijskoj studiji Kolbe-Schmitt mehanizma reakcije, izračuni otkrivaju da je reakcija egzotermni proces koji se nastavlja preko tri prijelazna stanja i tri intermedijera. Glavni produkt reakcije je salicilna kiselina, dok se *para* produkt može očekivati u vrlo niskom prinosu. Prvi korak reakcije je napad molekule ugljikovog dioksida na polariziranu O-Na vezu natrijevog fenoksida, pri čemu se formira intermedijer NaPh-CO₂ kompleks, **Shema 4**. U sljedećem koraku reakcije, elektrofilni ugljikov atom napada prsten primarno na *ortho* položaj. Reakcija se odvija preko prijelaznih stanja *o*-TS1 i TS2, s formiranjem intermedijera C i D. U zadnjem koraku reakcije, međuprodukt D se pretvara u konačni produkt, natrijev salicilat pomoću 1,3-proton pomaka od ugljikovog do kisikovog atoma. Ovaj reakcijski mehanizam uključuje deprotoniranje s ugljikovog atoma, praćeno protoniranjem kisikovog atoma preko prijelaznog stanja TS3 i kao što je očekivano, zahtijeva visoku energiju aktivacije. Intermedijeri C i D mogu se lako podvrgnuti reverzibilnoj reakciji zbog niske energije aktivacije, što ukazuje na to da je provođenjem reakcije pod povećanim tlakom ugljikovog dioksida ravnoteža pomaknuta prema produktima reakcije. Teorijska studija također sugerira da se Kolbe-Schmitt reakcija odvija preko tri intermedijera, dok FT-IR studija proučavanja toplinskog ponašanja NaOPh-CO₂ kompleksa pokazuje da se mogu očekivati dva intermedijera u reakciji. Odsutnost jedne vibracije u FT-IR spektru može se pripisati relativno niskoj energiji aktivacije za pretvorbu od B do D i mogućnosti reverzibilne reakcije od D do B. Kao što je već spomenuto, raspodjela produkata u Kolbe-Schmitt reakciji mnogo ovisi o metalnom kationu, što ukazuje da metal igra značajnu ulogu u mehanizmu reakcije [5].



Shema 4. Mehanizam Kolbe-Schmitt reakcije. A i E predstavljaju reaktante i produkte; B,C i D su intermedijeri; *o*-TS1, TS2 i TS3 su prijelazna stanja.

3.3. Derivati salicilne kiseline

Derivati salicilne kiseline (1) široko su upotrebljavani u liječenju različitih bolesti, **Shema 5.** Primjerice, metil-salicilat (2) koji je prisutan u mnogim biljkama koristi se u aromatiziranju namirnica, bombona, pića i farmaceutskih proizvoda. Koristi se kao miris, parfem i dodatak kozmetičkim proizvodima kao apsorbens UV svjetla. U medicini se uglavnom koristi kao lijek za smanjenje i olakšanje boli.

Diflunisal (3) je nesteroidni protuupalni lijek koji djeluje na način da onemogućava proizvodnju prostaglandina, hormona koji je zaslužan za bol i upalu. Također ima antipiretičko djelovanje, ali se kao lijek ne preporučuje u tu svrhu.

4-Aminosalicilna kiselina (4) se koristi za liječenje tuberkuloze. Pretpostavlja se da djeluje putem NF-kB inhibicije i hvatanja slobodnih radikala.

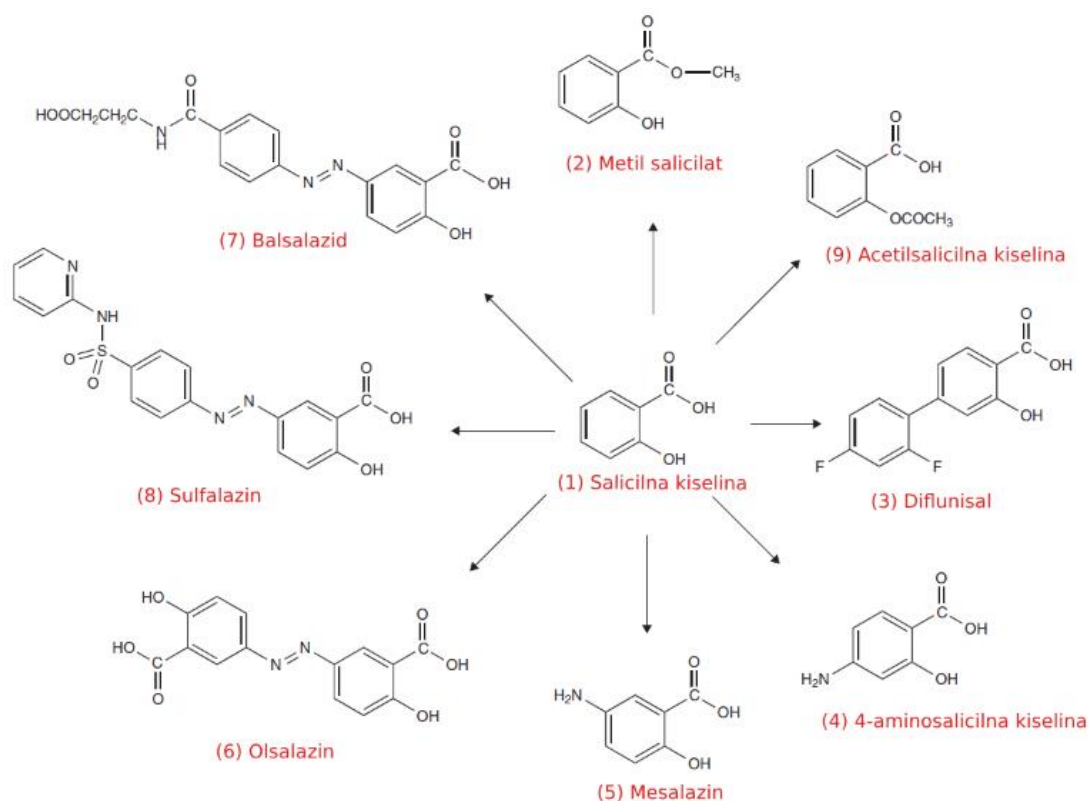
Mesalazin ili 5-aminosalicilna kiselina (5) je protuupalni lijek koji se koristi za liječenje upale probavnog trakta ulcerativnog kolitisa. Mesalazin je aminosalicilatni lijek koji djeluje lokalno u crijevima. Također se smatra antioksidansom koji ima svojstvo da može zarobiti slobodne radikale, potencijalno štetne nusprodukte metabolizma. Ulcerativni kolitis i druge upalne bolesti uzrokuju pretjeranu proizvodnju prostaglandina što uzrokuje upalu u debelom crijevu. Mesalazin može djelovati blokiranjem aktivnosti ciklooksigenaze i lipoksigenaze, čime se smanjuje proizvodnja prostaglandina i smanjuje upala.

Olsalazin (6) je protuupalni lijek koji se koristi u liječenju upalnih bolesti crijeva. Vjeruje se da olsalazin kao i balsalazid (7), isporučuje mesalazin preko tankog crijeva izravno do debelog crijeva na aktivno mjesto upale.

Sulfalazin (8) je sulfa lijek, derivat mesalazina, koji se primjenjuje prvenstveno kao protuupalno sredstvo u liječenju upalne bolesti crijeva kao i za reumatoidne bolesti artritisa i

artritis povezanog s entezitisom kao što su spondiloartropatije. Sulfalazin i njegov metabolit mesalazin, slabo se apsorbiraju iz crijeva. Upravo zbog tog se vjeruje kako je njegov glavni način djelovanja upravo u crijevima.

Acetilsalicilna kiselina (9), poznatija pod imenom Aspirin[®] je najčešće korišten lijek na svijetu. Aspirin ima nekoliko različitih djelovanja u organizmu, a uglavnom su to smanjenje upale, analgezija, prevencija zgrušavanja krvi te smanjenje groznice. Za većinu ovih učinaka, vjeruje se da su posljedica smanjene proizvodnje prostaglandina i tromboksana, što je posljedica njegove sposobnosti da nepovratno inaktivira enzim ciklooksigenazu (COX). Ciklooksigenaza je neophodna za sintezu prostaglandina i tromboksana. Aspirin djeluje kao acilirajući spoj te se acetilna skupina kovalentno veže na serinski ostatak aktivnog mjesta ciklooksigenaze. To čini aspirin drugačijim od drugih nestereoidnih protuupalnih lijekova, kao što su diklofenak i ibuprofen koji su reverzibilni inhibitori [4].



Shema 5. Najpoznatiji derivati salicilne kiseline.

4. Otkriće Aspirina

Povijest aspirina datira još od 1853. god. kada je francuski kemičar Charles Frédéric Gerhardt izveo prvu uspješnu sintezu acetilsalicilne kiseline djelovanjem acetilklorida na salicilni alkohol pri povišenom tlaku. Dobiveni produkt ostao je na policama njegovog laboratorija jer mu se nije činio zanimljivim za daljnja ispitivanja. Dvadeset godina kasnije, njemački kemičar Felix Hoffman u laboratoriju tvrtke za boje „Friedrich Bayer & Co“ u Elberfeldu, sintetizirao je identičan spoj. Smatra se da je ideju za ovu sintezu dobio u želji da pomogne svom reumatičnom ocu koji je godinama patio od nuspojava zbog konzumiranja salicilne kiseline. Najnovija istraživanja arhivskih spisa i velikog broja laboratorijskih izvještaja iz tog razdoblja tvrtke Bayer iz Leverkusena, kao i bibliografskih podataka, otvaraju pitanje može li se jedino F. Hoffmann smatrati zaslužnim za otkriće aspirina. Znanstveno-istraživački program tvrtke „Friedrich Bayer & Co“ obuhvaćao je rad na lijeku koji bi bio lakše podnošljiv od salicilne kiseline za liječenje reume i groznice. Prvi pokušaj sinteze takvog lijeka bio je salicilatni antireumatik Salophen kod koga je karboksilna skupina salicilne kiseline esterificirana sa paracetamolom. Lijek je bio na tržištu sve do šezdesetih godina prošlog stoljeća i nikada nije predstavljao konkurenciju aspirinu. Slabo je poznato kako su od 1895. god. dolaskom kemičara Artura Eichengrüna ova istraživanja intenzivirana. Njegov zadatak bio je oformiti novi farmaceutsko-kemijski laboratorij za istraživanje lijekova. U novoj istraživačkoj grupi bilo je tek deset diplomiranih kemičara, a jedan od njih je bio Felix Hoffmann. Njemu je Eichengrün predložio da ispita mogućnost sinteze derivata salicilne kiseline, tako da se umjesto karboksilne skupine esterificira fenolna skupina, kako bi se dobio spoj koji bi izazivao manje gastro-enteroloških smetnji u odnosu na salicilnu kiselinu i Salophen. Početkom 1897. god, Hoffmann je uspio sintetizirati nekoliko estera salicilne kiseline kao što su butiril-, benzoil-, acetil-, propionil- i valproil-salicilat. Svi derivati su bili različitih fizikalno-kemijskih svojstava i mogli su se uspoređivati u smislu fiziološkog djelovanja. Cjelokupna količina svih sintetiziranih derivata poslana je u farmakološki laboratorij tvrtke koju je Bayer osnovao 1890. godine. To je bio jedna od prvih eksperimentalnih laboratorija u Europi osnovanih unutar neke tvrtke. Početkom travnja 1897. god. profesor sveučilišta iz Bonna, Heinrich Dreser, stručnjak iz područja medicine, fizike i matematike te učenik poznatog farmakologa Oswalda Schmiedehenga, postavljen je za šefa farmakološkog laboratorija. Dreser je proveo biološka ispitivanja novosintetiziranih salicilata na životinjama, a promatrao je i djelovanje na izolirano srce žabe. Dreser je o svim ovim ispitivanjima sa zakašnjenjem publicirao izvješća 6.

ožujka 1899. god., a izvješća su sačuvana do danas. Eichengrün, koji je često bio prisutan tokom Dreserovih ispitivanja, došao je do zaključka da se acetil-ester znatno izdvaja od ostalih derivata te je u namjeri da s ovim derivatom provodi daljnja ispitivanja, dao zadatak svom mlađem suradniku Hoffmannu da sintetizira ovaj ester salicilne kiseline u kemijski čistom i stabilnom obliku. Tako je tijekom kolovoza 1897. god. Felix Hoffmann uspio sintetizirati acetilsalicilnu kiselinu zadovoljavajuće čistoće, a o laboratorijskom postupku sinteze napisao je izvještaj 10. kolovoza 1897. god. Uvjeren u antireumatsko djelovanje i dobru podnošljivost, na sastanku uprave tvrtke, Eichengrün je zatražio da se krene sa kliničkim ispitivanjima, ali njegov zahtjev nije bio prihvaćen. Nezainteresiranost uprave tvrtke za novi spoj, naime, nije zaustavila tvorca od ideje da spoj bude ispitan na pacijentima. Već krajem 1897. god. on je spoj ispitivao na sebi u želji da utvrdi potencijalnu štetnost za srce, uzimajući svakodnevne doze od 0,5 g do 5 g. Ni nakon dva tjedna redovitog konzumiranja, nije osjetio nikakve smetnje, te je o svemu izvijestio predstavnika Bayerove tvrtke u Berlinu, doktora Felixa Goldmanna. Poslao mu je oko 100 g sintetizirane acetilsalicilne kiseline kako bi ju mogao ispitati na pacijentima. Rezultati su bili zadovoljavajući: potvrđen je antireumatski efekt, bez neželjenih posljedica na srce ili gastroenterološki sustav. Goldmann je dao preparat stomatologu, koji je zbog nedostatka antipirina (tada najboljeg antipiretika), pacijentu s jakom zuboboljom i groznicom dao veliku dozu acetilsalicilne kiseline. Pacijent je rekao kako mu je prošla zubobolja i na taj način je otkriveno analgetsko djelovanje acetilsalicilne kiseline. Tvrtka „Bayer & Co“ svoj proizvod zaštitila je patentom pod nazivom Aspirin® u carskom uredu za patente u Berlinu, 6. ožujka 1899. god., *Slika 3*. Neželjeni efekti poput mučnine, alergijskih reakcija, gastroenteroloških smetnji i krvarenja nisu utjecali na upotrebu lijeka. Danas je proizvodnja aspirina dostigla 35000 tona godišnje. U Velikoj Britaniji dnevno se konzumira oko 6000 kg, dok u SAD-u dnevna konzumacija iznosi čak 35000 kg [6].

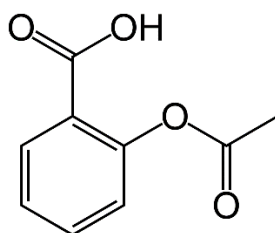


Slika 3. Originalno pakiranje aspirina tvrtke Bayer.

5. Fizikalno-kemijska svojstva aspirina

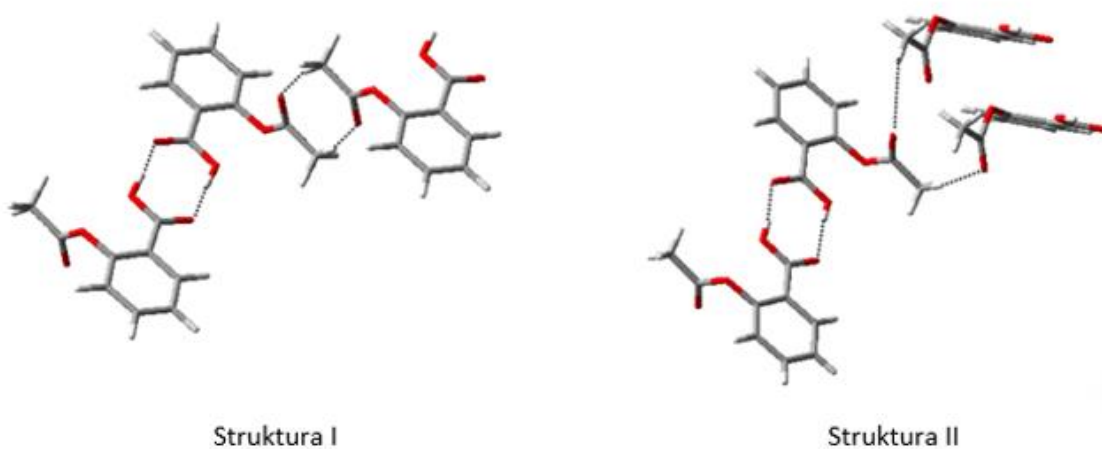
Aspirin ili acetilsalicilna kiselina je acetatni ester salicilne kiseline, *Slika 4*. U obliku je bijelog kristalnog praha s ugodnim kiselim okusom, a molekularna masa mu iznosi 180,158 g/mol. Talište iznosi oko 135°C, a vrijednost pK_a je 3,5 [7]. Aspirin je stabilan pri suhom zraku, međutim pri vlažnom zraku, u vodi ili vodenoj otopini alkohola postepeno hidrolizira u salicilat i acetat te otpušta miris nalik octu. Svaki gram aspirina sadrži otprilike 760 mg salicilata. Brzina hidrolize povećava se porastom temperature i ovisna je o pH. U vodenoj otopini, aspirin je najstabilniji pri pH 2-3, manje je stabilan pri pH manjoj od 2 i većoj od 8. U zasićenoj vodenoj otopini pri pH 5-7, aspirin je skoro potpuno hidroliziran unutar jednog tjedna pri 25°C [8]. Slabo je topljiv u vodi (oko 0,3%) i nešto bolje topljiv u etanolu (20%). Topljivost u vodenom mediju ovisi o pH vrijednosti. Topljivost pri pH 2 iznosi samo 60 µg/mL, ali znatno raste povećanjem pH vrijednosti. Topljivost u vodenom mediju također raste nakon transformacije u natrijevu sol, naročito u kiselom pH. Ovisnost topljivosti o pH, kao i povećana apsorpcija u gornjem dijelu crijeva zbog izrazito poboljšane topljivosti koja dominira povećanom stopom disocijacije, neki su od razloga zašto Aspirin iritira sluznicu želuca u kiselom želučanom soku [7]. U organizmu se uz pomoć esteraza razlaže na octenu i salicilnu kiselinu. Najveći dio salicilne kiseline se veže u jetri s glicinom u konjugat koji se izlučuje urinom. Dio salicilne kiseline veže se s glukuronskom kiselinom preko fenolne skupine čime se stvara acetal, ili karboksilne skupine čime nastaje acilal, dok u manjem postotku hidroksiliranjem fenilnog prstena može nastati gentizinska kiselina.

Mokraćom se također izlučuje i slobodna salicilna kiselina, a njezino izlučivanje ovisi o pH vrijednosti urina, koje u bazičnom mediju iznosi do 85% [9].



Slika 4. Struktura acetilsalicilne kiseline (Aspirina®).

Najnoviji računski izračuni, pružili su dokaze za još jedan stabilniji kristalni oblik aspirina koji je u bliskom odnosu s već poznatim oblikom. Najnovija eksperimentalna istraživanja potvrdila su postojanje drugog oblika i pored tog, pokazala su postojanje polimorfizma između ta dva oblika, *Slika 5*. Važno je da ta dva različita polimorfa mogu koegzistirati unutar jednog i istog kristala. Ovo novo i neočekivano otkriće s Aspirinom kao prvom tvari koja pokazuje ova jedinstvena svojstva, stvara niz pitanja u vezi definicije kristalnog polimorfizma. Također, tu su i zakonska pitanja koja su važna u ovom kontekstu budući da se svaki polimorf može patentirati odvojeno [7].



Slika 5. Razlike H-veza u polimorfnim strukturama Aspirina.

6. Farmakološka svojstva Aspirina

U svakodnevnoj praksi, oralna primjena je najčešći način oblik primjene lijekova. Otpuštanje uobičajenih tableta Aspirina za 50% u 0.1 M HCl, u miješanom uzorku *in vitro* pod standardnim uvjetima traje prilično dugo, otprilike 30-60 minuta. Ovo ukazuje da je topljivost lijeka slaba u kiselim uvjetima želudčanog soka. Stabilnost spoja odnosi se obrnuto proporcionalno sa pH te ima maksimum pri pH 2.5. Prema tome, kiseli pH u želudcu favorizira stabilnost Aspirina i sprječava hidrolizu, a u velikoj mjeri sprječava i otapanje. Oba čimbenika pridonose slaboj želudčanoj toleranciji čistog Aspirina. U slučaju gutanja visokih (toksičnih) doza Aspirina, apsorpcija može biti dodatno usporena i smanjena zbog stvaranja konkreција tj. netopljivih agregata, potpomognuta slabom topljivosti lijeka pod ovim uvjetima. Vrijednost pK_a za Aspirin iznosi 3.5. To znači da je 50% spoja ionizirano pri toj pH vrijednosti te skoro sve pri pH 6, odnosno negativno je nabijeno u lumenu želudca. U ovom ioniziranom obliku, molekule su netopljive u lipidima i mogu (teoretski) prodrijeti kroz staničnu membranu samo putem posebnih kanala. Pri pH razinama ispod 3.5, većina molekula Aspirina je nedisocirana, odnosno topljiva u lipidima te može prodrijeti u stanične membrane neovisno o specijaliziranim kanalima. Oralno konzumiran Aspirin, u kiseloj sredini želudčanog lumena, postoji prvenstveno u neioniziranom obliku. Međutim, potpuno otopljena količina je vrlo niska zbog slabe topljivosti spoja. Hidroliza Aspirina započinje već u trbušnoj šupljini, u roku od nekoliko minuta nakon unosa lijeka. Ova reakcija katalizirana je „aspirinskim“ esterazama koje su prisutne u cijelom tijelu. Rezultirajući reaktivni ostatak acetata može biti prenesen na bilo koju akceptorsku skupinu u susjedstvu, koja sadrži najvažnije aminokiseline u nekoliko proteina, kao što je serin₅₃₀ u ciklooksigenazi (COX) krvnih pločica [7]. Aspirin se brzo apsorbira u gornji gastrointestinalni trakt i rezultira mjerljivom inhibicijom funkcije trombocita u roku od 60 minuta. Unutrašnja obloženost Aspirina značajno odgađa njegovu apsorpciju. Poluživot plazme Aspirina samo je 20 minuta, međutim budući da trombociti ne mogu generirati novu COX, učinci Aspirina traju tijekom trajanja života trombocita, u prosjeku 10 dana. Nakon jedne doze Aspirina, trombocitna aktivnost COX oporavlja se za približno 10% dnevno, što je rezultat stvaranja novih trombocita. Iako može biti potrebno 10 dana za potpunu promjenu trombocita i obnovu normalne COX aktivnosti, pokazalo se da ako čak samo 20% trombocita imaju normalnu COX aktivnost, hemostaza može biti normalna [10]. Ekskrecija salicilata odvija se putem bubrega, pretežno u obliku produkta konjugata glicina, salicilurinske

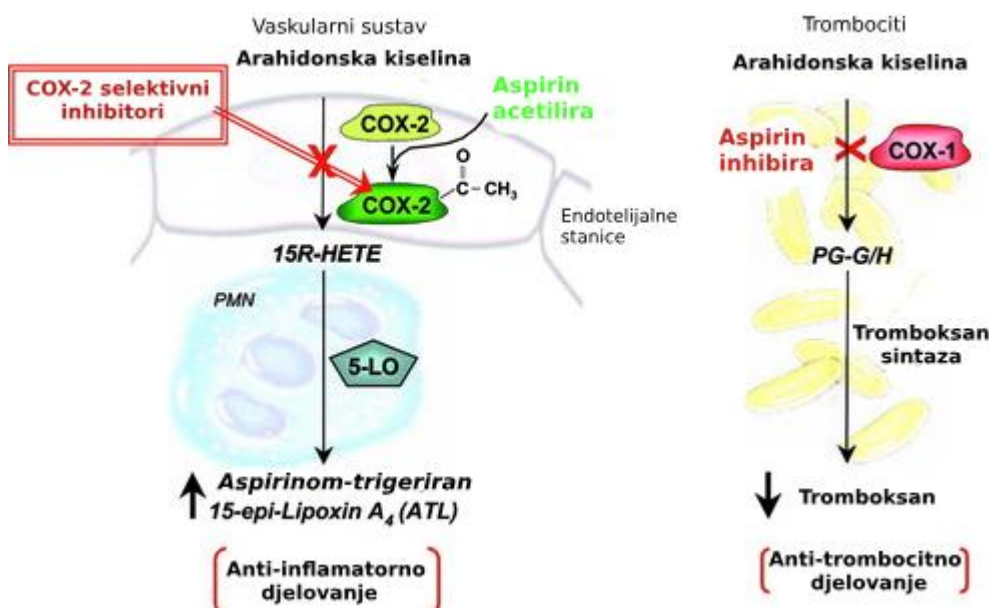
kiseline. Enzimsko generiranje salicilurinske kiseline je zasićeno već nakon jedne doze >300 mg [7].

7. Mehanizam djelovanja

Prije 1971. godine, malo tog je bilo poznato o mehanizmu djelovanja lijekova sličnih Aspirinu. Oni su proizvodili protuupalni učinak koji je bio kvalitativno i kvantitativno drugačiji od onog protuupalnih steroida i njihovo je analgetsko djelovanje bilo drugačije od onog izazvanog opijanima. Lijekovi slični aspirinu su slabi analgetici u usporedbi s „jakim“ narkotičkim analgeticima poput morfina. Oni su učinkoviti u liječenju slabe do umjerene kliničke boli, ali ne i boli visokog intenziteta poput postoperativne boli, osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, ankilozatnog spondilitisa i nekih oblika glavobolje. Godine 1971. Vane je otkrio mehanizam djelovanja aspirina. Dokazao je da Aspirin i drugi nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIDs) inhibiraju aktivnost enzima, danas poznatog kao ciklooksigenaza (COX) koji dovodi do stvaranja prostaglandina (PG) [11]. Prostaglandini kao derivati masnih kiselina snažni su regulatori biokemijskih procesa. Djeluju na mnoge tjelesne sustave, uključujući glatke mišiće, živčani sustav, krv i reproduktivske organe. Također, imaju važnu ulogu pri reguliranju različitih funkcija poput zgrušavanja krvi, krvnog tlaka, alergijske upale tkiva, porođajnih trudova te djelovanja probavnog sustava [12]. Međutim, inhibicijom COX u sintezi prostaglandina, lijekovi poput Aspirina sprječavaju i proizvodnju fiziološki bitnih prostaglandina koji su zaslužni za zaštitu sluznice želuca od oštećenja klorovodičnom kiselinom, održavanje funkcije bubrega i nakupljanje trombocita kada je potrebno. Dvadeset godina kasnije, otkrićem drugog COX gena, postalo je jasno da postoje dvije izoforme COX enzima¹. Konstitucijski izoform COX-1 podržava korisne homeostatske funkcije, dok inducirajuća izoforma COX-2 postaje regulirana upalnim intermedijerima i njegovi produkti uzrokuju mnoge simptome upalnih bolesti kao što su reumatoidni i osteoarthritis [11]. Niske doze Aspirina, od 75 mg do 100 mg dnevno, dovoljne su da ireverzibilno acetiliraju serin₅₃₀ iz COX-1 enzima, koji inhibira stvaranje trombocita tromboksana-A₂, što rezultira antitrombocitnim učinkom [13]. Umjerene doze, od 2 g do 4 g dnevno, inhibiraju COX-1 i COX-2, blokiraju produkciju prostaglandina te tako ostvaruju

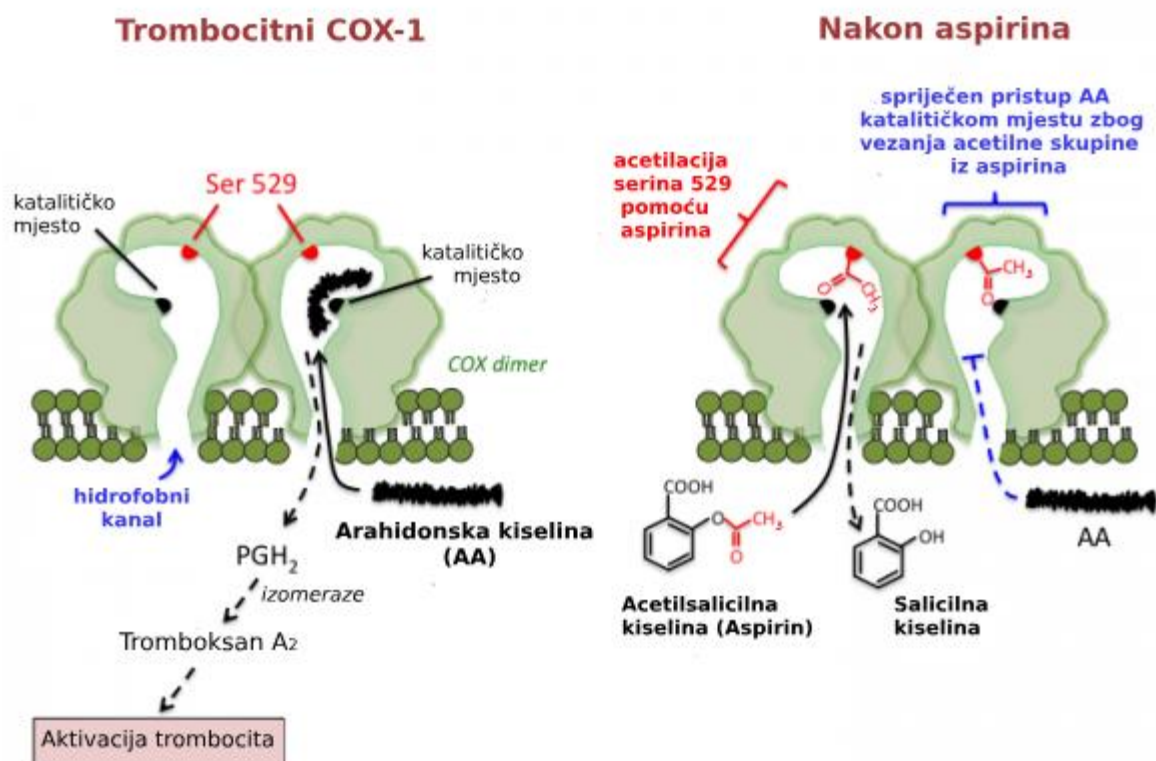
¹ Nedavno je otkriveno postojanje treće izoforme COX-3.

analgetski i antipiretički učinak. Naposljetku, serumske koncentracije u milimolarnom rasponu od 6 g do 8 g dnevno učinkovite su kao kortizon u reumatskim bolestima, međutim mehanizam djelovanja nije ustanovljen, *Shema 6* [14].



Shema 6. Mehanizam djelovanja Aspirina acetiliranjem COX-2 i inhibicijom COX-1.

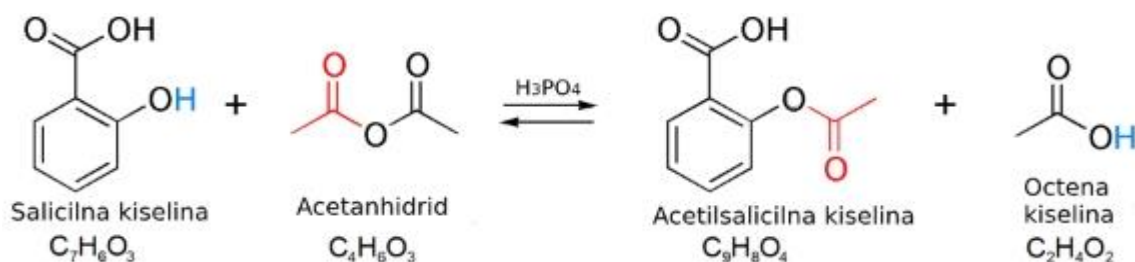
Najbolje opisan mehanizam djelovanja Aspirina događa se trajnom inaktivacijom djelovanja ciklooksigenaze prostaglandina H (PGH) sintaze 1 i sintaze 2, još nazvanim COX-1 i COX-2, *Shema 7*. Ovi izomeri kataliziraju prvi korak u biosintezi prostanoida – pretvaranje arahidonske kiseline u PGH₂. PGH₂ je nestabilan biosintetski intermedijer i supstrat za nekoliko izomeraza koje generiraju najmanje pet različitih bioaktivnih prostanoida, uključujući tromboksan A₂ i prostaciklin (PGI₂). Difuzijom kroz stanične membrane, Aspirin ulazi u COX kanal, uski hidrofobni kanal koji povezuje staničnu membranu s katalitičkim dijelom enzima. Aspirin se prvo veže na ostatak arginina₁₂₀, zajedničko mjesto za vezanje svih nesteroidnih antiinflamatornih lijekova. Potom acetilira serinski ostatak (serin₅₂₉ kod ljudskog COX-1 i serin₅₁₆ kod ljudskog COX-2) smješten u najužem dijelu kanala, čime sprječava pristup arahidonskoj kiselini COX katalitičkom aktivnom mjestu enzima [15].



Shema 7. Vezanje Aspirina na katalitičko aktivno mjesto i sprječavanje pristupa arahidonskoj kiselini.

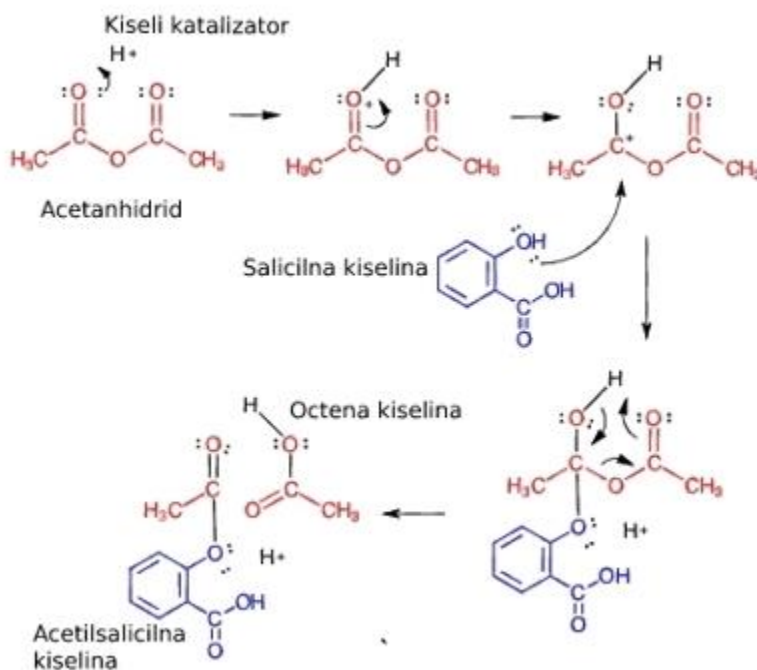
8. Metode sinteze aspirina

Jedna od najosnovnijih metoda sinteze aspirina jest upravo reakcija salicilne kiseline i acetanhidrida u prisustvu fosfatne kiseline, *Slika 6*. Taj eksperiment je proveo El-Magbri, nakon čega je acetilsalicilnu kiselinu rekristalizirao te provjerio čistoću TLC analizom. Stvarno iskorištenje reakcije je bilo 0,546 g, dok je teorijsko iskorištenje bilo 2,628 g. Dakle, postotak iskorištenja je iznosio 20,77%.



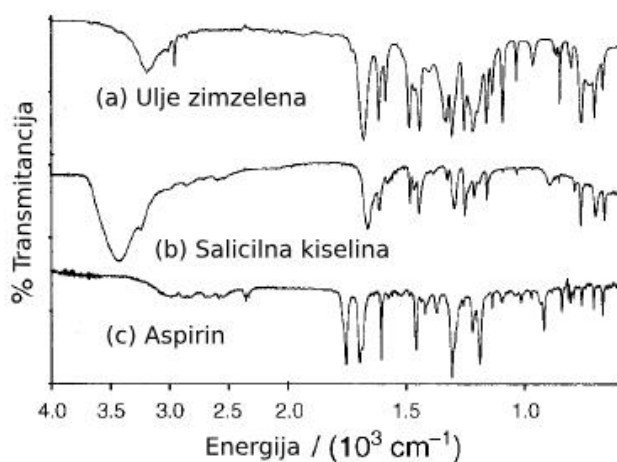
Slika 6. Sinteza aspirina reakcijom salicilne kiseline i acetanhidrida uz fosfatnu kiselinu.

Mehanizam sinteze aspirina reakcijom salicilne kiseline i acetanhidrida odvija se uz kiseli katalizator, *Shema 8*. Fosforna kiselina napada ugljikov atom karbonilne skupine acetanhidrida čime nastaje pozitivan naboj na kisikovom atomu te je acetanhidrid više podložan nukleofilnom napadu. Nukleofil u reakciji je salicilna kiselina. Kisikov atom fenolne skupine salicilne kiseline napada parcijalno pozitivan ugljikov atom acetanhidrida [16].



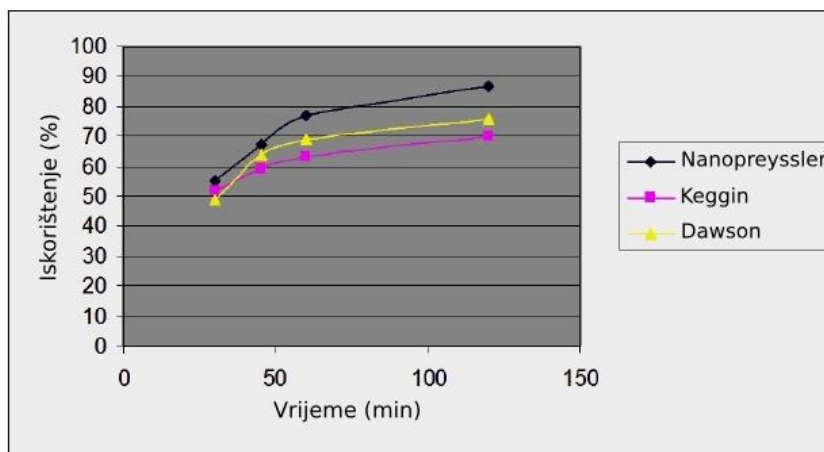
Shema 8. Mehanizam sinteze acetilsalicilne kiseline (aspirina).

Za razliku od El-Magbrija, Olmsted je proveo dvostepenu sintezu aspirina transformacijom prirodne supstance, ulja zimzelena u salicilnu kiselinu, a potom u acetilsalicilnu kiselinu. Razlikuje se od prethodne sinteze u tome što je složenija dvostepena metoda koja započinje od zajedničke prirodne tvari te što je koristio FT-IR spektroskopiju za kvalitativnu identifikaciju kemijskih promjena koje su se dogodile, **Slika 7**. Pomoću FT-IR spektra, može se primijetiti kako sva tri spoja dijele zajedničke značajke, primjerice vibracije aromatskih savijanja C-H veza u 600-800 cm^{-1} regiji. Međutim, bitno se razlikuju u apsorpcijama koje proizlaze iz COO_2H , CO_2 i OH skupina. Aspirin nema široku proton-vezanu OH apsorpciju koja je istaknuta u ulju zimzelena i salicilnoj kiselini između 3000 i 3500 cm^{-1} . S druge strane, dok ulje zimzelena i salicilna kiselina imaju jednu C=O apsorpciju pri 1700 cm^{-1} , aspirin ima dva različita pika koji proizlaze iz esterske i kiselinske C=O skupine, [17].



Slika 7. FT-IR spektar ulja zimzelena, salicilne kiseline i aspirina.

Heravi i suradnici sintetizirali su aspirin zelenom sintezom *O*-acetiliranjem salicilne kiseline pri sobnoj temperaturi, pomoću ekološkog katalizatora koji se može reciklirati, Preyssler aniona [18]. Isti eksperiment proveli su Nazari i suradnici te su rezultati u oba eksperimenta pokazali kako nanoPreyssler anion ima veću aktivnost i daje bolje rezultate u reakcijama esterifikacije u odnosu na ostale heteropolne kiseline, kao i u odnosu na standardnu metodu sinteze koja koristi H_2SO_4 . U odnosu na Keggin i Dawson, nanoPreyssler ($\text{H}_{14}\text{-P}_5$) je više aktivan i pokazuje veću selektivnost time smanjujući udio sporednih reakcija. Na **Slici 8**, može se primijetiti kako je iskorištenje reakcije veće pri korištenju nanoPreyssler aniona u odnosu na druge heteropolne kiseline [19].



Slika 8. Iskorištenje reakcije kao funkcija vremena u prisutnosti nanopreysler, Keggin i Dawson heteropolnih kiselina.

Još jedan od načina zelene sinteze aspirina je sinteza potpomognuta mikrovalnim zračenjem koju su proveli Montes i suradnici. Korištenje mikrovalne tehnologije ima određene prednosti, kao što su povećanje brzine reakcije, kontrolirano zagrijavanje i hlađenje te redukcija sekundarnih produkata. Dokazano je kako je mikrovalna tehnologija dobra za reakcije koje ne uključuju otapala, kao i za one koje uključuju katalizatore. Aspirin je sintetiziran reakcijom salicilne kiseline i acetanhidrida uz uporabu kućne mikrovalne pećnice, uz različite katalizatore. Katalizatori koji su se koristili su: H_2SO_4 , H_3PO_4 , $\text{MgBr}\cdot\text{OEt}_2$, AlCl_3 , CaCO_3 , NaOAc , NEt_3 i 4-*N,N*-dimetilaminopiridin (DMAP). Reakcijska smjesa je stavljena u mikrovalnu pećnicu na dvije minute i 80% snage. Rezultati u kiseloj sredini su slični onima koji ne koriste mikrovalnu iradijaciju, međutim u bazičnoj sredini se mogu primijetiti razlike. Primjerice, reakcija s CaCO_3 pri konvencionalnoj metodi ne djeluje, međutim koristeći mikrovalnu iradijaciju reakcija je bila dovršena unutar pet minuta s 77% iskorištenjem. U **Tablici 1.** mogu se vidjeti iskorištenja svih reakcija sirovog produkta te iskorištenja nakon prekrystalizacije kao i nastajanje polimera te vrijeme u kojem je reakcija dovršena [20].

Zhang i suradnici proveli su isti eksperiment, ali su kao katalizator koristili niklov sulfat. Iskorištenje reakcije je iznosilo 87,7% u uvjetima molarnog odnosa salicilne kiseline prema acetanhidridu i niklovom sulfatu 1:2:0.1 u vremenu 50 s i jačini mikrovalnog zračenja od 480 W [21]. Zeng i suradnici su u istom eksperimentu kao katalizator koristili stipsu. Rezultati su pokazali da su optimalni uvjeti za reakciju sljedeći: omjer salicilne kiseline prema acetanhidridu 1:2,

količina stipse je 7,2 od ukupne mase salicilne kiseline, temperatura mikrovalne iradijacije je 70°C, vrijeme mikrovalne iradijacije 20 minuta te snaga 400 W. S optimalnim reakcijskim uvjetima, iskorištenje reakcije je iznosilo 83.01% [22].

Tablica 1. Sinteze aspirina uz uporabu različitim katalizatorima pomoću mikrovalne iradijacije koristeći prekrystalizaciju i bez otapala.

Katalizator	Reakcija Vrijeme/min	Formiranje polimera	Iskorištenje (%) ^a	Iskorištenje (%) ^b
/	10-13	Negativno	80	97
H ₂ SO ₄	5	Pozitivno	41	55
H ₃ PO ₄	5	Pozitivno	40	63
AlCl ₃	6-7	Negativno	65	66
MgBr·OEt ₂	5	Pozitivno	38	63
CaCO ₃	5	Negativno	77	92
NaOAc	9-10	Negativno	52	85
NEt ₃	8	Negativno	61	90
DMAP	14	Negativno	50	67

^aVrijednosti iskorištenja dobivene nakon prekrystalizacije.

^bVrijednosti iskorištenja dobivene reakcijom bez uporabe otapala.

Osim sinteze pod mikrovalnim zračenjem, još jedan od načina sinteze aspirina iz salicilne kiseline i acetanhidrida je sinteza katalizirana jakim kiselo-izmjenjivačkom smolom pod utrazvučnom iradijacijom koju je proveo Xiao-ling. Kao optimalni reakcijski uvjeti su se pokazali sljedeći: odnos množina acetanhidrida prema salicilnoj kiselinu je 3:1, frekvencija zračenja 59 Hz, vrijeme zračenja 25 minuta, temperatura 70~75°C, katalizator 0,5 g. Uz te reakcijske uvjete, iskorištenje je iznosilo 92%. Katalizator je zadržavao svoju aktivnost nakon ponovne upotrebe do 5 puta. Glavni napredak ove metodologije jesu kratko vrijeme reakcije, visoko iskorištenje, prilagodba reakcije i ekološki prihvatljivo okruženje [23]. Sličan eksperiment, međutim bez ultrazvučne iradijacije proveo je Zhi-gang sa suradnicima, oni su sintetizirali acetilsalicilnu kiselinu koristeći 001×7 jaku kiselu kationsko-izmjenjivačku smolu kao katalizator, te ispitali učinak molarnog omjera reaktanata, vrijeme reakcije, doziranje katalizatora i reakcijske temperature na iskorištenje produkta, kao i učinkovitost smole koja je reciklirana. Optimalni reakcijski uvjeti su bili 3:1 omjer acetanhidrida prema salicilnoj kiselinu, doza smole 14,5% salicilne kiseline, vrijeme reakcije 120

minuta pri temperaturi od 60°C što je rezultiralo iskorištenjem od 77,93%. Zaključeno je da jaka kiselina kationsko izmjenjivačka smola dobro djeluje na reakciju esterifikacije kao ekološki prihvatljiv katalizator te je dobra za širu upotrebu jer ima učinkovitu aktivnost, manje štetne reakcije i prednost što se može reciklirati [24]. Donga i suradnici su proveli katalitičku sintezu aspirina u Brønsted kiselo-ionskim tekućinama. Kao supstituirani katalizator sumporne kiseline u aciliranju salicilne kiseline upotrijebljene su Brønsted kisele ionske tekućine [Hmim]BF₄, [bmim]HSO₄ ili [bmim]H₂PO₄. Ispitivani su efekti temperature reakcije, vremena reakcije, količine katalizatora i molarnog odnosa salicilne kiseline prema acetanhidridu u reakciji aciliranja te sposobnost ponovne upotrebe ionske tekućine. Optimalni reakcijski uvjeti su bili: količina [bmim]H₂PO₄ je bila 0.28 g (1.18×10^{-3} mol), salicilne kiseline 2.762 g (0.02 mol), acetanhidrida 4.038 g (0.04 mol), molarni odnos acetanhidrida prema salicilnoj kiselini je iznosio 2:1, vrijeme reakcije 30 minuta pri temperaturi od 70°C. Iskorištenje reakcije je bilo 63.43%. Nakon filtriranja i uparavanja, [bmim]H₂PO₄ može se upotrijebiti tri puta, pri čemu se nije primijetila promjena u iskorištenju [25]. Bing-fang i suradnici su sintetizirali aspirin ultrazvučnom radijacijom, koristeći salicilnu kiselinu i acetanhidrid te kruti natrijev hidroksid kao katalizator. Optimalni uvjeti za reakciju dobiveni ortogonalnim eksperimentom pokazali su da je molarni odnos salicilne kiseline i acetanhidrida 1:2.5, jačina zračenja 160 W, količina katalizatora je 10% od količine salicilne kiseline, temperatura reakcije 40°C te vrijeme zračenja 8 minuta. Pri tim uvjetima, iskorištenje reakcije je iznosilo 93%. Dakle, rezultati pokazuju kako je ovaj eksperiment brza i jednostavna metoda s manje štetnih produkata i s velikim prinosom reakcije [26].

Xiaoning i suradnici su sintetizirali aspirin pod ultrazvučnim zračenjem korištenjem molekularnog joda kao katalizatora. Optimalni reakcijski uvjeti su bili: molarni odnos salicilne kiseline i acetanhidrida 1:2, snaga zračenja 300 W u vremenu 15 minuta. Pri tim reakcijskim uvjetima iskorištenje je iznosilo 96%. Glavne prednosti ovog eksperimenta su brzina reakcije, visoko iskorištenje te ekološka prihvatljivost [27]. Katalitičku sintezu aspirina preko prethodno obrađenog natrijevog acetata korištenjem salicilne kiseline i acetanhidrida kao polaznih materijala proveo je Lin sa suradnicima. Rezultati su pokazali kada je količina salicilne kiseline iznosila 3,0 g, volumen acetanhidrida 6 mL te natrijev acetat 3% te se reakcija odvija 50 minuta pri 55°C iskorištenje je iznosilo 81.9% [28]. Long i Ling su umjesto natrijevog acetata kao katalizator upotrijebili limunsku kiselinu. Rezultati su pokazali da je iskorištenje reakcije bilo 91% uz omjer

salicilne kiseline i acetanhidrida 1:3. Količina korištene limunske kiseline bila je 1 g, a reakcija se odvijala 40 minuta pri temperaturi od 70°C [29].

Kong je kao katalizator pri sintezi koristio kalijev dihidrogenfosfat uz djelovanje ultrazvučnih oscilacija. Optimalni omjer reaktanata bili su 3 g salicilne kiseline, 6,2 mL acetanhidrida i 0,5 g kalijevog dihidrogenfosfata, a vrijeme reakcije 30~40 minuta pri 75~80°C. Kalijev dihidrogenfosfat se može koristiti više puta kao katalizator uz zadržavanje gotovo 90%-tnog iskorištenja. U usporedbi s koncentriranom sumpornom kiselinom kao katalizatorom, kalijev dihidrogenfosfat se može reciklirati i ima prednost što je sigurniji te manje štetan za okoliš [30]. Cuilian i suradnici su sintetizirali acetilsalicilnu kiselinu reakcijom salicilne kiseline i acetanhidrida koristeći kao katalizator piperidin. Produkt se mogao dobiti zagrijavanjem reakcijske smjese 30 minuta pri temperaturi od 83°C u kojoj je omjer salicilnog i acetanhidrida 1: 3, molarni omjer piperidina 17% pri čemu je iskorištenje iznosilo 88% [31].

Još jedan način sinteze izveo je Chun-man sa suradnicima. Oni su sintetizirali aspirin uz uporabu katalizatora $\text{SnCl}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ na aktivnom ugljiku. Rezultati su pokazali visoko iskorištenje reakcije od 88% pri optimalnim reakcijskim uvjetima uz omjer salicilne kiseline i acetanhidrida 1:3, količina katalizatora 1,5 g, vrijeme reakcije 16 minuta te temperatura 80~85°C [32].

9. Eksperimentalni dio

Eksperimentalni dio završnog rada izrađen je u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku. Izvedeno je sedam reakcija od kojih su tri pripreve eutektičkih otapala kolin-klorid: urea, kolin-klorid: levulinska kiselina i kolin-klorid: limunska kiselina. Preostale četiri su sinteze kojima je ispitana mogućnost pripreve aspirina reakcijom salicilne kiseline i acetanhidrida klasičnom i mikrovalnom sintezom u navedenim eutektičkim otapalima.

Kemikalije koje su korištene u radu:

Kolin-klorid; $C_5H_{14}ClNO$; 139,63 g/mol; $t_f=298-304$ °C, Acros Organics, 1 kg

Urea; CH_4N_2O ; 60,06 g/mol; $t_f=133$ °C, Gram Mol, 250 g

Limunska kiselina; $C_6H_8O_7 \times H_2O$; 210,14 g/mol; $t_f=153$ °C; Gram Mol, 500 g

Levulinska kiselina; $C_5H_8O_3$; 116,12 g/mol; $t_f=33-35$ °C, Acros Organics, 100 g

Etanol; 96%-tni; C_2H_6O ; 46,07 g/mol; $t_v=78$ °C ; Gram Mol, 1000 mL

Kloroform; $CHCl_3$; 119,38 g/mol; $t_v=61,2$ °C; Gram Mol, 1000 mL

Metanol; CH_4O ; 32,04 g/mol; $t_v=64,5$ °C; Gram Mol, 1000 mL

Sve upotrijebljene kemikalije su bile analitičke čistoće.

Tankoslojnom kromatografijom (TLC) praćen je tijek reakcija, a kromatogrami su razvijani u smjesi otapala kloroform:metanol u omjeru 6:1 ili heksan:etil-acetat u omjeru 50:50. Tankoslojna kromatografija rađena je na komercijalno dostupnim pločicama silikagela DC Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, a mrlje su detektirane pomoću UV lampe pri 254 i 366 nm. Temperature tališta određene su na elektrotermalnom digitalnom uređaju SMP3 (Mettler Toledo, Hrvatska).

Uređaj korišten za snimanje IR spektra: Cary 630 FTIR, Agilent Technologies, za snimanje IR spektra korišten je nastavak: ATR (eng. Attenuat ed total reflection). Transmisija se mjerila u spektru od 4000 – 650 cm^{-1} , te je za detekciju korišten sljedeći detektor: DTGS (eng. Deuterated triglycine sulfates), a za korekciju spektra korištena je: Happ Genzelova apodizacija. Rezultati su obrađivani pomoću Agilent MicroLab Software-a.

9.1. Priprava eutektičkih otapala na bazi ChCl

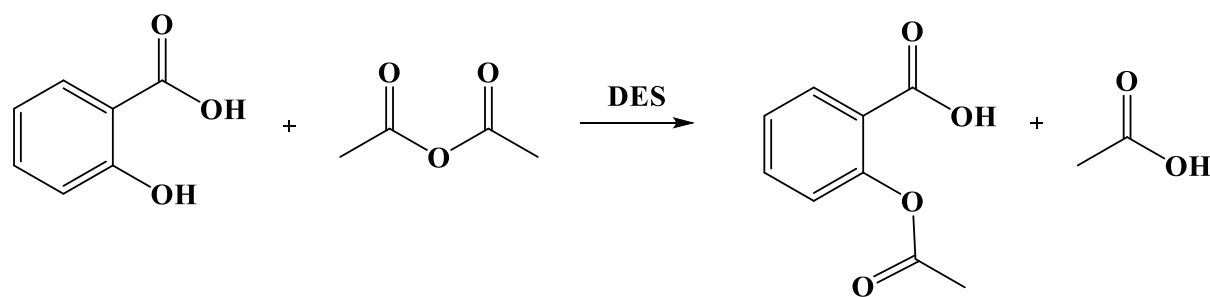
Priprava eutektičkih otapala provedena je miješanjem 5 grama kolin-klorida s odgovarajućom količinom različitih HBD-a (levulinska kiselina, urea, limunska kiselina), **Tablica 2**. Dobivena je smjesa zagrijavana uz miješanje na magnetskoj miješalici pri temperaturi 80 °C tri sata. Tijekom miješanja i zagrijavanja nastale su stabilne homogene tekućine, koje su ohlađene, te kao takve, korištene bez pročišćavanja kao otapala u reakciji sinteze acetilsalicilne kiseline.

Tablica 2. Omjeri i količine ChCl i HBD za pripravu eutektičkih otapala.

Eutektičko otapalo	Omjer ChCl: HBD	Količina ChCl i HBD
ChCl: levulinska kiselina	1 : 2	5 g : 7,3 mL
ChCl: urea	1 : 2	5 g : 4,2 g
ChCl: limunska kiselina	1 : 2	5 g : 8,26 g

9.2. Klasična sinteza aspirina u eutektičkim otapalima

U okruglu tikvicu od 50 mL u 9 mL eutektičkog otapala dodan je 1 gram salicilne kiseline i 2,5 mL acetanhidrida. Reakcijska smjesa je na vodenoj kupelji na magnetskoj miješalici zagrijavana uz miješanje 60 minuta na 80 °C. Nakon zagrijavanja, sadržaj je ohlađen i u tikvicu dodano 5 mL destilirane hladne vode kako bi se raspao višak anhidrida, a potom je reakcijska smjesa ostavljena u hladnjak kako bi došlo do kristalizacije produkta. Nakon odvajanja taloga vakuum filtracijom i sušenja dobiveni sirovi produkt stavljen je na prekriziranje uz refluksiranje u smjesu otapala 8 mL etanola i 25 mL destilirane vode. Nakon sušenja kristala, napravljena je tankoslojna kromatografija i određeno talište pomoću Stuartovog digitalnog uređaja.



10. Rezultati

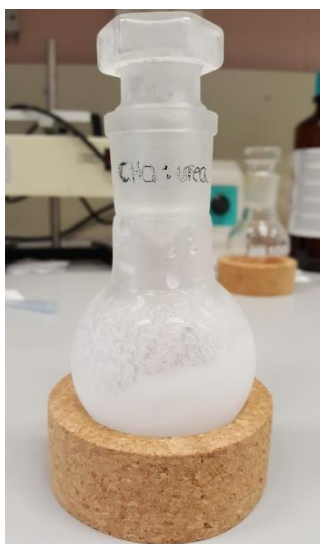
Eutektička otapala uspješno su priređena i bez pročišćavanja korištena u daljnjem radu. Sinteza acetilsalicilne kiseline pokušana je u tri različita otapala, **Tablica 3**.

Tablica 3. Prinos acetilsalicilne kiseline sintezom u eutektičkim otapalima.

R. br.	Eutektičko otapalo	Vrijeme (h)	Prinos (%)
1	ChCl : levulinska kiselina	3	-
2	ChCl : urea	3	55,98
3	ChCl : limunska kiselina	4	-

Do nastanka produkta došlo je samo u eutektičkom otapalu ChCl:urea, dok u ostala dva eutektika nije došlo do nastanka željenog produkta ni u tragovima.

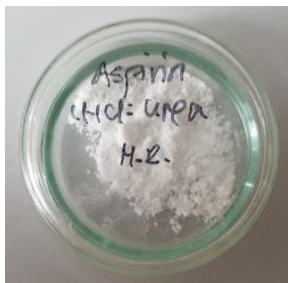
Hlađenjem reakcijske smjese ChCl: urea vrlo brzo nakon reakcije došlo je do kristalizacije, **Slika 9**, nakon čega je talog odvojen vakuum filtracijom.



Slika 9. Kristalizacija produkta nakon hlađenja ChCl:urea.

Nakon prekrizalizacije, dobiveni su bijeli kristali čistog produkta, **Slika 10**. Masa dobivenog sirovog produkta iznosila je 0,73 g. Tankoslojna kromatografija rađena je u smjesi otapala heksan

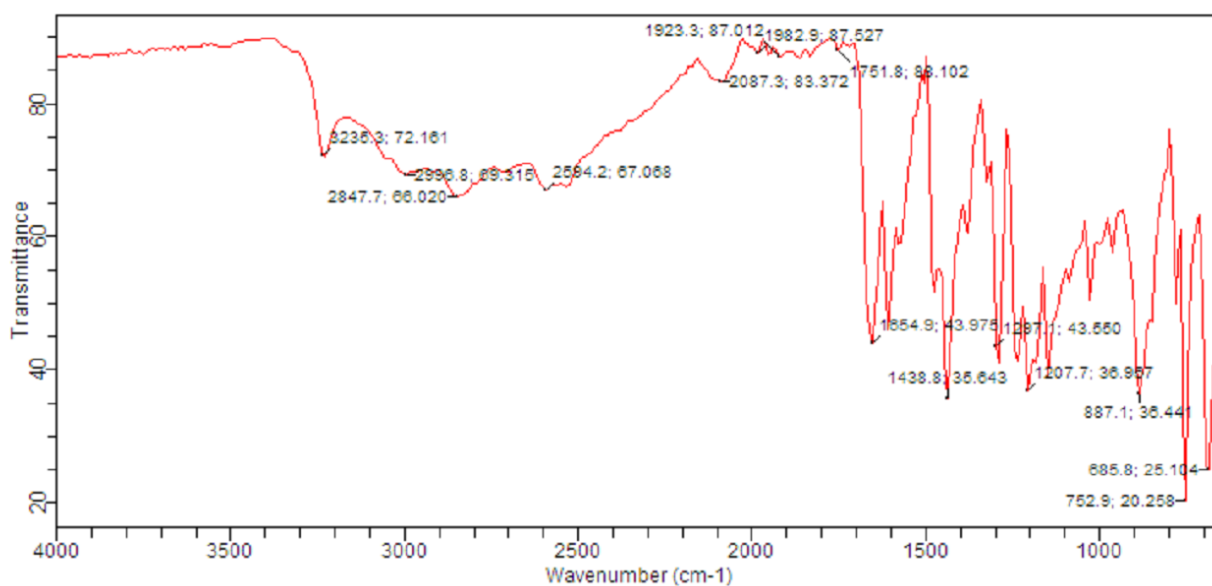
: etil-acetat 50:50, f vrijednosti salicilne kiseline i produkta bile su slične. Iz tog razloga, određeno je talište prekrystaliziranog produkta i ono je iznosilo 134,6-135,7°C, a talište aspirina prema literaturnim podacima iznosi 135°C. Talište salicilne kiseline prema literaturnim podacima iznosi 158,6°C, stoga se iz navedenih podataka moglo zaključiti kako je sinteza aspirina u eutektičkom otapalu ChCl:urea uspješno provedena te se eutektičko otapalo ChCl:urea može koristiti kao katalizator za sintezu aspirina.



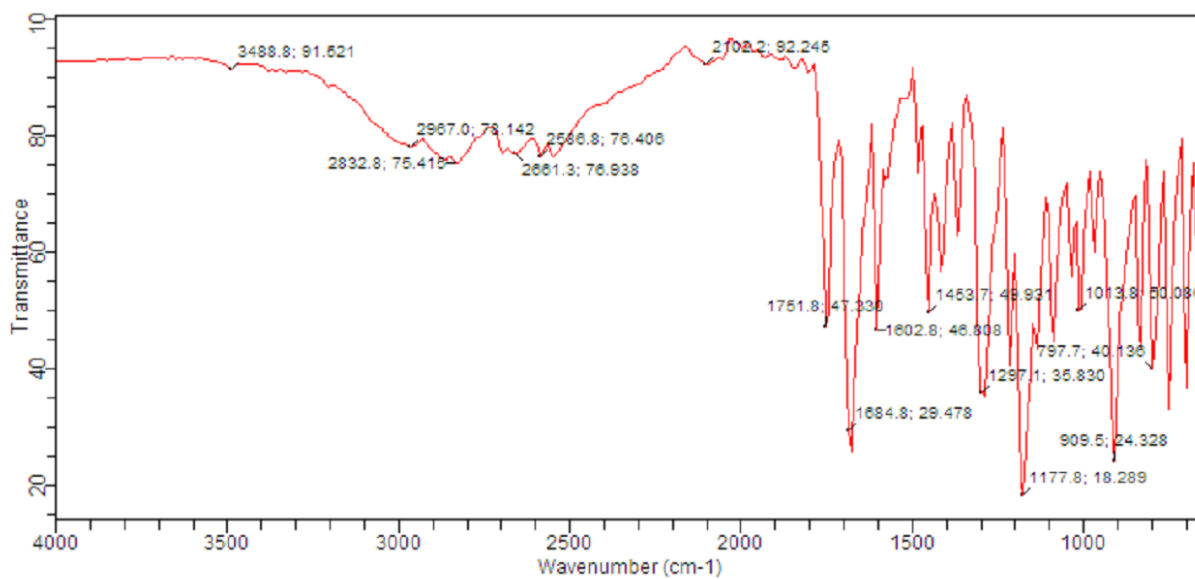
Slika 10. Kristali aspirina dobiveni klasičnom sintezom u eutektičkom otapalu ChCl:urea.

Osim razlike u temperaturi tališta upotrijebljene salicilne kiseline i dobivenog produkta za koji se pretpostavilo da je željeni produkt, jasna je bila i razlika u IR spektrima.

Vibracija istezanja veze C=O karboksilnih kiselina pojavljuje se oko 1710 cm^{-1} . Za razliku od IR spektra salicilne kiseline, u IR spektru produkta, jasno je vidljiva jaka karbonilna apsorpcija u području 1684 cm^{-1} , kao i gubitak apsorpcije na 3236 cm^{-1} koja odgovara aromatskom alkoholu, **Slika 11** i **Slika 12**.



Slika 11. IR salicilne kiseline.



Slika 12. IR aspirina.

11. Zaključak

Acetilsalicilna kiselina, poznatija pod nazivom aspirin, jedan je od najkorištenijih lijekova u povijesti. Djeluje kao antipiretik, analgetik i antikoagulant inhibirajući enzim ciklooksigenazu. Aspirin se može sintetizirati reakcijom esterifikacije salicilne kiseline i acetanhidridom uz kiseli katalizator, najčešće fosforna kiselina ili sumporna kiselina.

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost sinteze aspirina esterifikacijom u prisustvu eutektičkih otapala koji bi služili kao otapalo/katalizator u zamjenu za fosfatnu ili sumpornu kiselinu. Pregledom literature nije pronađeno da je sinteza acetilsalicilne kiseline izvedena u eutektičkim otapalima stoga je cilj bio ispitati mogu li se eutektička otapala uopće koristiti u sintezi. Eutektička otapala su ekološki prihvatljivija, mogu se reciklirati, jeftinija su te imaju manje štetnih nusprodukata.

Eksperimentalni dio se sastojao od pripreme eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida (kolin-klorid urea, kolin-klorid levulinska kiselina i kolin-klorid limunska kiselina) te ispitivanja mogućnosti primjene pripremljenih otapala u reakciji salicilne kiseline i acetanhidrida. Sintezom aspirina reakcijom salicilne kiseline i acetanhidrida uz kolin-klorid: urea kao otapalo/katalizator, došlo je do nastanka željenog produkta. Iz eksperimentalnih podataka moglo se zaključiti kako se od navedena tri eutektička otapala jedino kolin-klorid: urea može uspješno koristiti te je po prvi puta eutektičko otapalo uspješno korišteno u sintezi acetilsalicilne kiseline.

12. Literatura

1. I. Raskin, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **43** (1992), 439-463
2. J. G. Mahdi, *Journal of Saudi Chemical Society*, **14** (2010), 317-322
3. J. G. Mahdi, *Biotechnology Reports*, **4** (2014), 73-79
4. D. Ekinçi, M. Sentürk, Ö. İ Küfrevioğlu, *Expert opinion on therapeutic patents*, **21** (2011), 1831-1841
5. Z. Marković, J. P. Engelbrecht, S. Marković, *Zeitschrift für naturforschung*, **57a** (2002), 812-818
6. D. Krajnović, *Istorijski razvoj aspirina sa osvrtom na novije podatke o njegovom otkriću* Arh. Farm **53** (2003) 51-70
7. K. Schrör, *Acetylsalicylic acid*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009
8. Mc Evoy, K.G.; Litvak, K.; Welshe, H.O.; *Ahfs Drug Information*, American Society of Hospital Pharmacists: Bethesda, 1993
9. M. Mintas, S. Raić-Malić, *Medicinska kemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009
10. E. H. Awtry, J. Loscazlo, *Circulation*, **101** (2000), 1206-1218
11. J. R. Vane, R. M. Botting, *Thrombosis Research*, **110** (2003), 255-258
12. L. G. Wade, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2017
13. A. P. Cadavid, Aspirin: The Mechanism of Action Revisited in the Context of Pregnancy Complications, *Frontiers in Immunology*, **8**:261 (2017)
14. M. P. Pillinger, C. Capodici, P. Rosenthal, N. Kheterpal, S. Hanft, M. R. Philips, G. Weissmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (1998), 14540-14545
15. C. Patrono, L.A.G. Rodriguez, R. Landolfi, C. Baigent, *New England Journal of Medicine*, **353:22** (2005) 2373-2383
16. M. El-Magbri, *The Synthesis and Analysis of Aspirin*, (2014)
17. J. Olmsted III, „Synthesis of Aspirin: A general chemistry experiment.“ *Journal of Chemical Education*, **75:10** (1998), 1261-1263
18. F.F. Bamoharram, M.M. Heravi, et al., „Catalytic Method for Synthesis of Aspirin by Green, Efficient and Recyclable Solid Acid Catalyst (Preyssler's Anion) at Room Temperature.“ *Journal of Chinese Chemical Society*, **54:4** (2007), 1017-1020

19. H. Nazari, A. Ahmadpour, et al., *Synthesis of Acetyl Salicylic Acid by nanoPreyssler's Anion as green, eco-friendly and recyclable catalyst, International Conference of Environment* (2010)
20. I. Montes, D. Sanabria, et al., „A Greener Approach to Aspirin Synthesis Using Microwave Irradiation.“, *Journal of Chemical Education*, **83:4** (2006)
21. L. Zhang, et al. „Study on the Microwave-assisted Synthesis of Aspirin Catalyzed by Nickel Sulfate [J]“ *Fine Chemical Intermediates*, 5:018 (2009)
22. X. Zeng, et al., „Synthesis of Aspirin by Microwave Radiation with Alum as Catalyst“ *Experiment Science and Technology*, (2014)
23. L.I.U. Xiao-ling, „Synthesis of acetylsalicylic acid catalyzed by strong acidic cationic exchange resin under ultrasound irradiation [J]“ *Applied Chemical Industry*, **7:028** (2010)
24. Z. Zhi-gang, et al., „Synthesis of acetylsalicylic acid using strong-acidic cation-exchange resin as catalyst“ *Acta Academiae Medicinae Wannan*, (2012)
25. J. Donga, et al., „Catalytic Synthesis of Aspirin in Brønsted Acid Ionic Liquids [J]“, **9:027** (2007)
26. S. Bing-fang, et al., „Synthesis of Aspirin catalyzed by solid sodium hydroxide under ultrasound radiation [J]“, *Applied Chemical Industry*, **2:021** (2010)
27. S. Xiaoning, et al., „Synthesis of Acetylsalicylic Acid Catalyzed by Molecular Iodine Under Ultrasound Irradiation [J]“, *Journal of Tianshui Normal University*, **2:024** (2008)
28. P. Lin, C. Li, „Catalytic Synthesis of Aspirin with Sodium Acetate [J]“, *Hebei Chemical Engineering and Industry*, **4:009** (2006)
29. J. Long, S. Ling, „Catalytic Synthesis of Aspirin by Citric Acid [J]“, *Yunnan Chemical Technology*, **5:008** (2008)
30. X. Kong, „Study on catalytic synthesis of aspirin with potassium dihydrogen phosphate [J]“, *Applied Chemical Industry*, **8:031** (2009)
31. X. Cuilian, et al., „Synthesis of Aspirin with Piperidine as Catalyst [J]“, *Henan Science*, **12:013** (2008)
32. X. Chun-man, et al., „Synthesis of aspirin catalyzed by $\text{SnCl}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ supported on activated carbon [J]“, *Applied Chemical Industry*, **5:021** (2010)

§ Popis korištenih kratica i simbola

A – reaktant

ATR (engl. Attenuated Total Reflection) – prigušena totalna refleksija

C – intermedijer

COX – ciklooksigenaza

ChCl (engl. choline chloride) – kolin klorid

D – intermedijer

DTGS (engl. Deuterated Triglycine Sulfate)– deuterirani triglicin sulfat

E – produkt

FT-IR (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy) – infracrvena spektroskopija na bazi Fourierove transformacije

HBD (engl. Hydrogen Bond Donor) – donor vodikove veze

K_{ow} – koeficijent raspodjele oktanol/voda

NSAID (engl. non-steroidal anti-inflammatory drugs) – nesteroidni protuupalni lijekovi

pH – negativni logaritam koncentracije vodikovih iona

pK_a – vrijednost pH pri kojoj je 50% kiseline disocirano

PG - prostaglandin

PGH – prostaglandin H

PGI₂ – prostaciklin

SAD – Sjedinjene Američke Države

TS (engl. transition state) – prijelazno stanje

TLC (engl. thin-layer chromatography) – tankoslojna kromatografija

TXA₂ – tromboksan A₂

UV (engl.- ultraviolet) – ultraljubičasto