Priprava estera cimetne kiseline s meta- i para-nitro derivatima N-arilpiridinona

Šoltić, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:029547

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Monika Šoltić

Priprava estera cimetne kiseline s *meta*- i *para*-nitro derivatima *N*-arilpiridinona

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc.Aleksandar Sečenji

Neposredna voditeljica: Andrea Dandić, mag.chem

Osijek, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 2

2.1. Strukturne karakteristike hidroksipiridinona 2

2.2. Priprava hidroksipiridinona 3

2.2.1. Mehanizam reakcije sinteze 3,4-HP iz piran-4-ona i primarnog amina 5

2.3. Biološka aktivnost hidroksipiridinona 7

2.3.1. Uloga željeza u organizmu 8

2.3.2. Utjecaj strukturne modifikacije 3,4-HP na njihovu biološku aktivnost 10

2.4. Cimetna kiselina 10

2.4.1. Sinteza cimetne kiseline 11

2.4.2. Biološka aktivnost cimetne kiseline 13

2.5. Esteri 13

2.5.1. Metode priprave estera 14

2.5.1.1. Fischerova esterifikacija 14

2.5.1.2. Mitsunobu esterifikacija 16

2.5.1.3. Yamaguchijeva esterifikacija 16

2.5.1.4. Tishchenkova esterifikacija 17

2.5.1.5. Pregradnja po Favorskom 18

2.5.1.6. Baeyer Villigerova reakcija 18

2.5.1.7. Steglichova esterifikacija 19

3. EKSPERIMENTALNI DIO 20

3.1. Materijali i metode 20

3.2. Priprava suhog diklormetana 21

3.3. Priprava *meta* i *para* supstituiranih derivata *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona 22

3.3.1. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (1) 22

3.3.2. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (2) 23

3.4. Priprava estera cimetne kiseline s *meta* i *para* supstituiranim derivatima *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona 24

3.4.1. Priprava [2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (3) 24

3.4.2. Priprava [2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (4) 25

4. REZULTATI I RASPRAVA 26

4.1. UVOD 26

4.2. Priprava *meta* i *para* supstituiranih derivata*N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona 27

4.2.1. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (1) 28

4.2.2. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (2) 29

4.3. Priprava estera cimetne kiseline s *meta* i *para* supstituiranim derivatima N-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona 29

4.3.1. Priprava [2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (3) 30

4.3.2. Priprava [2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata(4) 31

5. ZAKLJUČAK 33

6. POPIS LITERATURE 34

7. PRILOZI 36

7.1. Popis oznaka kratica i simbola 36

SAŽETAK

U ovome završnom radu opisana je sinteza estera cimetne kiseline s *meta*- i *para*-nitro derivatima *N*-arilpiridinona. U prvome djelu opisana je priprava *N*-aril supstituiranih 3-hidroksipiridin-4-ona, spoja **1** (3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on) i spoja **2** (3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on). Spojevi **1** i **2** pripravljeni direktnom metodom iz maltola i određenog primarnog amina, korišteni su u drugome djelu rada kao polazni spojevi u sintezi spojeva **3** ([2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata) i **4** ([2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata). Oba esterska derivata 3,4-HP i cimetne kiseline uspješno su pripravljena Steglichovom metodom esterifikacije.

Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su NMR spektroskopijom (^{1}H, ^{13}C, DEPTQ).

Ključne riječi: cimetna kiselina, hidroksipiridinoni, lipofilnost, maltol, Michaelova adicija, Steglichova esterifikacija

ABSTRACT

In this work preparation of cinnamic acid derivatives of *N*-arylpyridinones is described. In the first part of this work preparation of *N*-aryl substituted 3-hydroxypyridin-4-ones, compound **1** (3-hydroxy-2-methyl-1-(*m*-nitrophenyl)pyridin-4-one) and compound **2** (3-hydroxy-2-methyl-1-(*p*-nitrophenyl)pyridin-4one) is presented. These two compounds were prepared from maltol and primary amine using direct method. In the second part of this work prepared compounds (**1** and **2**) were used as starting compounds in the synthesis of compounds **3** ([2-methyl-1-(*m*-nitrophenyl)pyridin-4-on-3-yl]-3-phenylprop-2-enoate) and **4** ([2-methyl-1-(*p*-nitrophenyl)pyridin-4-on-3-yl]-3-phenylprop-2-enoate). For esterification of compounds **1** and **2** with cinnamic acid Steglich esterification method was used.

The structures of synthesized compounds were identified by NMR spectroscopy (^{1}H, ^{13}C, DEPTQ).

Keywords: cinnamic acid, hydroxypyridinones, lipophilicity, maltol, Michael addition, Steglich esterification

1. UVOD

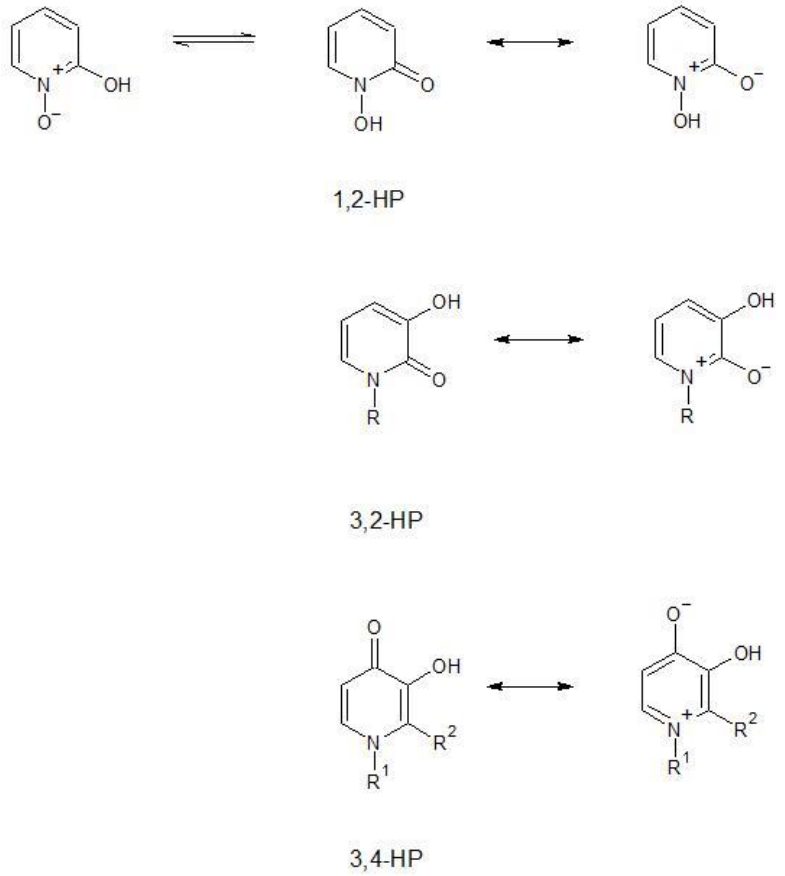
Hidroksipiridinoni (HP) su heterociklički aromatski spojevi, derivati piridina, koji posjeduju karbonilnu skupinu u *ortho* položaju u odnosu na hidroksilnu skupinu. HP su bidentatni ligandi metalnih iona u području fiziološkog pH što je osnova njihovog raznolikog biološkog djelovanja.[1] Istražuju se kao agensi za uklanjanje iona metala, kao antibakterijski i antitumorski agensi te kao potencijalni antimalarici i antidementici.[2] 3-hidroksipiridin-4-oni (3,4-HP) se ističu unutar skupine HP jer su se pokazali učinkovitim kelatorima trovalentnih, tvrdih metalnih iona, primjerice Fe^{3+} i Al^{3+} u fiziološkim uvjetima u odnosu na ostale HP derivate. Jedan od najčešćih načina njihove priprave podrazumijeva reakciju derivata 3-hidroksipiran-4-ona, kao što su primjerice maltol ili etil-maltol, i odgovarajućih primarnih alkil- ili aril-amina i amonijaka. 3-hidroksipiran-4-oni također posjeduju biološku aktivnost, no za razliku od njih 3,4-HP se prilikom keliranja metala ponašaju kao jače Lewisove baze, što se objašnjava učinkovitijom delokalizacijom naboja unutar prstena kao posljedica razlike u elektronegativnosti heteroatoma.[1]

Na propusnost biomembrane utječu molekularna masa, naboj i lipofilnost tvari. To su jedni od najvažnijih faktora koji određuju potencijalne kelatore.[1] Prema tome kako bi se olakšao prolazak nekog spoja kroz membranu osnovni hidroksipiridinonski skelet se modificira uvođenjem lipofilnih podjedinica. Prvi dio ovoga rada usmjeren je na pripravu *N*-aril supstituiranih 3-hidroksipiridin-4-ona, dok je u drugome djelu rada opisano uvođenje cimetne kiseline kao lipofilne podjedinice u strukturu 3,4-HP. Cimetna kiselina odabrana je kao lipofilna podjedinica budući da sama cimetna kiselina također pokazuje značajnu biološku aktivnost.[3] Navedeni spojevi sintetizirani su u svrhu ispitivanja njihove biološke aktivnosti, s posebnim naglaskom na antitumorsku aktivnost.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Strukturne karakteristike hidroksipiridinona

Hidroksipiridinoni uključuju tri skupine spojeva koji se razlikuju prema položaju keto-skupine i hidroksilne skupine u odnosu na dušikov atom u prstenu: 1-hidroksipiridin-2-oni (1,2-HP), 3-hidroksipiridin-2-oni (3,2-HP) i 3-hidroksipiridin-4-oni (3,4-HP). Derivati hidroksipiridinona koriste se kao biološki agensi zahvaljujući sposobnosti keliranja trovalentnih metalnih kationa, najčešće Fe^{3+} i Al^{3+}. Trovalentni ion metala koordiniran s dva vicinalna atoma kisika hidrokispiridinona tvori kelatni kompleks. Hidroksipiridinoni su monoprotonske kiseline pa zbog toga u području fiziološkog pH (5-9,9) nastaju nenabijeni kompleksi u kojima je stehiometrija metala prema hidroksipiridinonskom prstenu 1:3.[2,4] Kod 1,2-HP postoji tautomerna ravnoteža i deprotoniranjem oba tautomera nastaje isti anion, dok 3,2-HP i 3,4-HP imaju samo jedan tautomer (Shema 1).[5]



Shema 1. Tautomerni i rezonantni oblici 1,2-HP, 3,2-HP i 3,4-HP[4]

U fiziološkim uvjetima HP imaju visok afinitet za Fe^{3+} ione pa se zbog toga najviše ispituju za liječenje bolesti kod kojih dolazi do prekomjernog nakupljanja tog metala u organizmu.[6]

Najveći afinitet za Fe^{3+} ione posjeduju 3,4-HP zbog različitog rasporeda (*O, O*)-donorskih skupina oko piridinskog prstena hidroksipiridinona. Posljedica toga je veća bazičnost hidroksilne skupine (pKa 9-9,5) i veća elektronska gustoća na koordinirajućim atomima kisika u usporedbi s ostalim HP (Tablica 1).[4]

Tablica 1. pK_a vrijednosti i afinitet bidentantnih liganda prema Fe^{3+} ionu[4]

ligand	pK_{a1}	pK_{a2}	$\log\beta$ (Fe^{3+})
1,2-HP	-	5,8	27
3,2-HP	0,2	8,6	32
3,4-HP	3,6	9,9	37

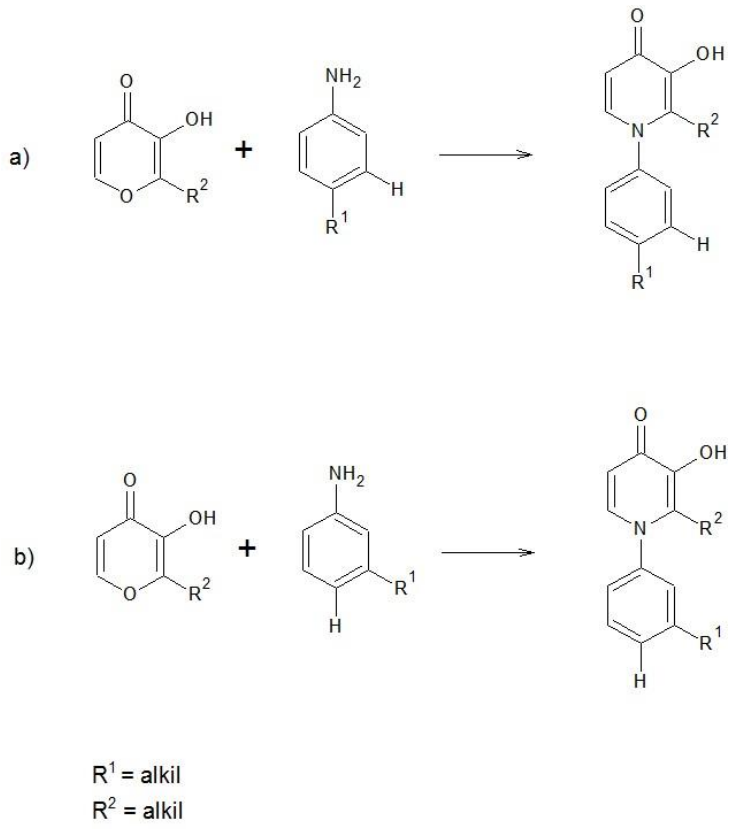
2.2. Priprava hidroksipiridinona

Kao polazni reagensi za pripravu hidroksipiridinona koriste se 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol), 2-etil-3-hidroksipiran-4-on (etil-maltol), 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on (kojična kiselina) i dr.[3,7,8] S obzirom da se hidroksipiridinoni mogu pripraviti iz analognih hidroksipiranona, metoda po Harrisu i tzv. direktna metoda dvije su poznate metode priprave hidroksipiridinona na taj način. Takve reakcije obuhvaćaju reakciju određenog hidroksipiridinona s amonijakom ili s primarnim aminom.[6]

Metoda po Harrisu primjenjuje se za sintezu *N*-alkilnih i *N*-arilnih 3,4-HP iz maltola ili etil-maltola. Sastoji se od tri koraka, gdje prvi korak podrazumijeva zaštitu hidroksilne skupine kako bi se olakšala transformacija piranona u piridinon. U drugom koraku u reakciji s odgovarajućim aromatskim primarnim aminom nastaje zaštićeni *N*-aril supstituirani piridinonski derivat, kojemu se u trećem koraku katalitičkom hidrogenolizom uklanja zaštitna skupina.

Direktna metoda češće se primjenjuje za pripravu *N*-aril supstituiranih derivata 3,4-HP te podrazumijeva zagrijavanje nezaštićenog hidroksipiranona i odgovarajućeg primarnog amina na visokoj temperaturi. Takva reakcija moguća je zagrijavanjem vodene otopine reaktanata uz refluks ili zagrijavanjem u zataljenoj staklenoj cijevi (autoklav, ≈150 °C).Reakcije se obično provode u jednome koraku (Shema 2) s dodatkom kiselog katalizatora (HCl, H_2SO_4, *p*-TsOH) ili bez kiselog katalizatora, uz refluks ili u autoklavu. U ovome radu, upotrebom *p*-TsOH kao kiselog katalizatora spriječeno je deprotoniranje hidroksilne skupine maltola i nastanak alkoksida. U kiselim reakcijskim uvjetima smanjena je mogućnost nastajanja kondenzacijskih nusprodukata što u konačnici utječe na povećanje ukupnog prinosa reakcije.Ukoliko se pri sintezi *N*-arilnih derivata 3,4-HP koristi postupak zagrijavanja u autoklavu ili postupci koji ne podrazumijevaju dodatak otapala, reakcijsko vrijeme je kraće (8 – 40 h) u odnosu na klasični način zagrijavanja reaktanata u otapalu uz dodatak katalizatora (50 – 72 h). Literaturno je poznato da opisani postupci daju produkte u relativno niskom prinosu, dok im je s druge strane, glavna prednost da se temelje na jeftinom i lako dostupnom polaznom materijalu.[6]

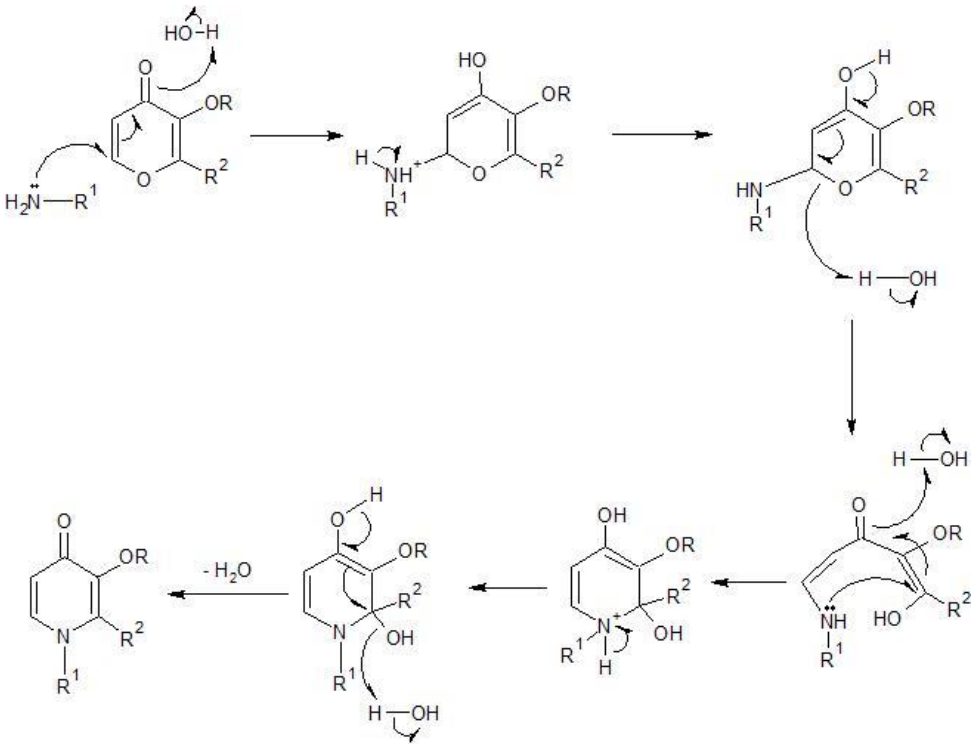
Za razliku od kiselo katalizirane reakcije, u nekataliziranoj reakciji produkt nastaje samo u tragovima. Ukoliko se kao polazni spoj koristi etil-maltol, ukupni prinos je manji zbog većih steričkih smetnji prilikom ciklizacije i nastajanje piridinonskog prstena nakon nukleofilnog napada amina. Stoga je poželjnije koristiti maltol kao polazni spoj pri sintezi *N*-arilnih 3,4-HP kako bi prinos reakcije bio što veći. Osim toga, prinosi spomenutih reakcija ovise o prisutnosti skupina koje se nalaze u *para*-položaju na polaznim anilinskim derivatima, tj. o njihovim elektronskim svojstvima, pa tako prilikom upotrebe nukleofilnijih anilinskih derivata (elektron-donirajućim supstituentima) prinosi reakcija su veći. Primjerice, ukoliko je nukleofil *p*-metoksianilin, reakcija rezultira većim prinosom u odnosu na reakciju u kojoj je nukleofil *p*-nitroanilin.[6,9,10]



Shema 2. Postupak priprave *N*-arilnih derivata 3,4-HP direktnom metodom[6]

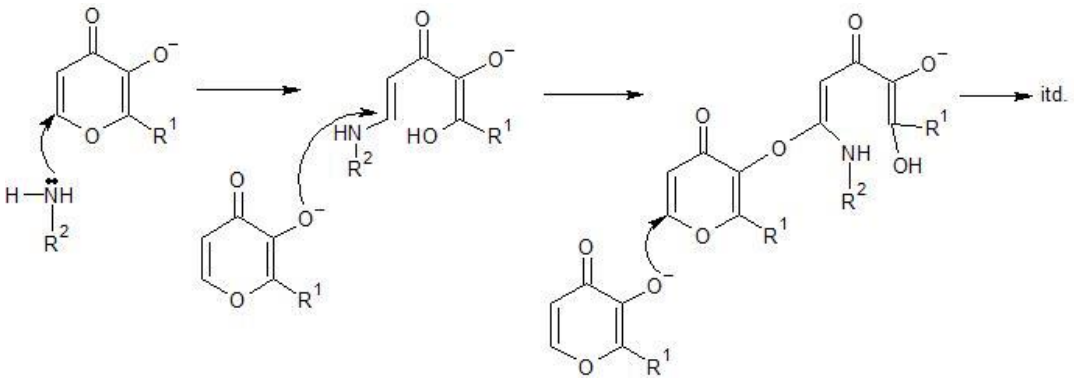
2.2.1. Mehanizam reakcije sinteze 3,4-HP iz piran-4-ona i primarnog amina

Reakcija pretvorbe piran-4-ona u piridin-4-on je dvostruka nukleofilna konjugirana Michaelova adicija na položaje C-2 i C-6 α,β-nezasićenog karbonilnog piranonskog derivata, pri čemu je donor primarni amin, a akceptor α,β-nezasićeni sustav piran-4-ona. Prilikom sinteze 3,4-HP Michaelovom adicijom iz piran-4-ona i primarnog amina dolazi do gubitka jedne molekule vode (Shema 3).[11]



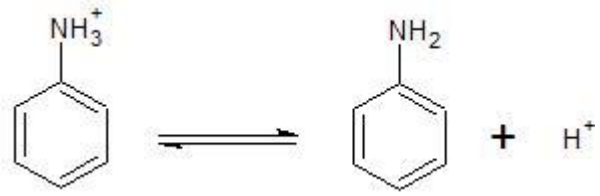
Shema 3. Mehanizam sinteze 3,4-HP Michaelovom adicijom iz piran-4-ona i primarnog amina[11]

U bazičnim uvjetima, (pKa ≈ 11 – 12) naročito ako se radi s razgranatim alkil aminima, potrebno je zaštititi hidroksilnu skupinu piranona jer u protivnom nezaštićena hidroksilna skupina može reagirati Michaelovom reakcijom s nusproduktima koji nastaju tijekom reakcije (Shema 4). Takvi kondenzacijski produkti smanjuju ukupni prinos reakcije. Upotreba sterički ometenih amina kao Michaelovih donora smanjuje prinos reakcije te je u tome slučaju nužno zaštititi hidroksilnu skupinu piran-4-ona.[6]



Shema 4. Moguća sporedna reakcija stvaranja kondenzacijskih produkata u bazičnim uvjetima sinteze derivata 3,4-HP[6]

Kada se kao Michaelovi donori koriste primarni alkil-amini ili aril-amini sintezu 3,4-HP iz maltola kao polaznog spoja moguće je provesti izravno, bez zaštite hidroksilne skupine uz prethodno spomenutu direktnu metodu sinteze 3,4-HP.U tom slučaju, koriste se kiseli reakcijski uvjeti kako bi se smanjila mogućnost nastanka alkoksida i spriječilo nastajanje kondenzacijskih produkata, kako je već opisano u poglavlju 2.2.[6,10] Ukoliko se reakcija provodiuz kiseli katalizator moguće je protoniranje amina, stoga je bolje koristiti aril-amine umjesto alkil-amina s obzirom da aril-amini nisu u potpunosti protonirani pa u ravnoteži postoji udio neprotoniranog oblika u kojemu je dušikov atom nukleofilan pa može napasti maltol na C-6 i C-2 položaju (Shema 5).[12]



Shema 5. Ravnoteža između protoniranog i deprotoniranog oblika aril-amina[12]

2.3. Biološka aktivnost hidroksipiridinona

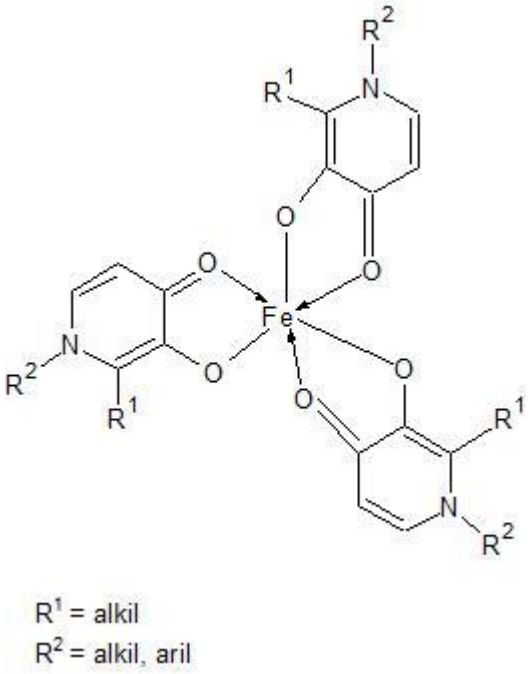
Hidroksipiridinoni su važni heterociklički ligandi za tvrde metalne ione, kao što su primjerice Fe^{3+} i Al^{3+}, te je njihova selektivnost prema keliranju trovalentnih metalnih kationa osnova brojnih bioloških učinaka. Konkretno, 3,4-HP svestrani su biološki agensi i imaju izrazito visok afinitet za Fe^{3+}, kako je opisano u poglavlju 2.1., pa se iz tog razloga koriste kao kelatni lijekovi za liječenje raznih bolesti kod kojih je važno uklanjanje spomenutih metalnih iona. Takva vrsta kelatora zahvaljujući svojim fizikalno-kemijskim svojstvima pokazuje nisku toksičnost i visoku biokompatibilnost. Zahvaljujući svojem šesteročlanom prstenu koji im omogućava funkcionalizaciju na različitim položajima prstena, mnogi derivati hidroksipiridinona razvijeni su u biomedicinske svrhe.[1]

2.3.1. Uloga željeza u organizmu

Iako je željezo neophodno za pravilno funkcioniranje živih stanica, prilikom njegovog suvišnog nakupljanja u organizmu ono postaje toksično. Kako je željezo najzastupljeniji prijelazni metal na Zemlji, bitan je za mnoge oblike života te se smatra esencijalnim elementom za žive organizme. Od iznimne je važnosti jer je sastavni dio svih staničnih procesa kao što su disanje, sinteza DNA, regulacija gena, redoks procesi, a osim toga potreban je i za rast i razvoj organizma. Organizmi mogu biti izloženi kako pomanjkanju tako i suvišku željeza koje dovodi do pojave raznih bolesti. Koncentracija željeza u tkivima je strogo regulirani proces pa je u organizmu potrebno održavati ravnotežu između unosa željeza, njegovog iskorištenja i skladištenja. Homeostaza željeza može se narušiti pojavom neke bolesti što rezultira nakupljanjem željeza u organizmu. U tom slučaju, može doći do zasićenja transferina (protein važan za prijenos željeza) ili feritina (protein važan za skladištenje željeza) što rezultira povećanom koncentracijom neveznog željeza. Takve povećane količine željeza dovode do oštećenja tkiva kao rezultat stvaranja slobodnih radikala. Poznavanje regulacije željeza na molekularnoj razini je izrazito bitno u dijagnostičkim i preventivnim dijagnozama.[14,15] Oko 70 % željeza u organizmu nalazi se vezano za hem, u hemoglobinu i mioglobinu koji su važni za transport i čuvanje kisika ili u citokromima koji sudjeluju u sintezi adenozintrifostafa. Osim što se nalazi u krvi i mišićima u obliku metaloproteina, željezo nalazimo u jetri, slezeni i koštanoj srži. Željezo može biti i kofaktor raznih enzima kao što je ribonuleotid-reduktaza, enzim vrlo važan u pretvorbi ribonukleotida u deoksiribonukleotide. Željezo je moguće unijeti u organizam i u anorganskom obliku gdje željezo mora biti u dvovalentnom obliku kako bi se transportiralo kroz membrane pomoću odgovarajućih transportnih proteina.[1]Kako željezo alternira između dva oksidacijska stanja, odnosno prima ili donira elektrone, može pridonijeti stvaranju slobodnih radikala. Glavnu ulogu u njihovoj izmjeni igraju brojne oksidoreduktaze. Ukoliko su razine željeza povišene, takva izmjena oksidacijskog stanja može biti izrazito opasna jer stanice u tom slučaju podliježu oksidativnom stresu. Nastajanje štetnih radikalnih vrsta opisano je Fentonovom reakcijom. Oksidacijom Fe^{2+} iona s vodikovim peroksidom dolazi do nastanka iznimno reaktivnog hidroksilnog radikala koji zatim može reagirati sa šećerima, proteinima, lipidima i sl. što može dovesti do oštećenja proteina, membranskih lipida, DNA i RNA. Takva oštećenja mogu dovesti i do pojave karcinoma, a u krajnjem i najgorem slučaju i do smrti. Također, često spominjane

bolesti kao što su Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest i Friedreichova ataksija posljedica su suviška željeza u organizmu.[1,16]

Da bi neki agensi bili učinkoviti kelatori željeza trebali bi kompetirati kompleksiranju željeza za transferin, tj. vezati netransferinsko željezo ili ga vezati unutar odjeljka LIP (tzv. nestabilni skladišni odjeljak) i feritina. 3,4-HP se prilikom keliranja metalnih iona ponašaju kao Lewisove baze, a zbog razlike elektronegativnosti heteroatoma dolazi do učinkovite delokalizacije naboja unutar prstena. Upravo zbog delokalizacije elektronskog para s dušikovog prema karbonilnom kisikovom atomu, 3,4-HP učinkoviti su kelatori tvrdih metalnih iona. Delokalizacija stoga utječe na bazičnost i elektronsku gustoću veznog mjesta 3,4-HP za određeni metalni kation. Pri fiziološkom pH, prilikom kompleksiranja spomenutih trovalentnih metalnih kationa s 3,4-HP nastaju peteročlani kelatni prstenovi. U takvim kompleksima, koordinacija metalnog iona je uglavnom nepravilna oktaedarska, a metal je koordiniran s po dva vicinalna kisikova atoma. Omjer trovalentnog metalnog kationa i 3,4-HP je 1:3 (Slika 1).[1]



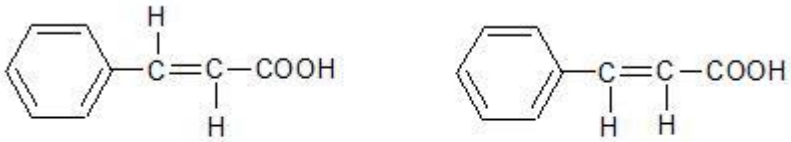
Slika 1. Nastajanje kompleksa 3,4-HP i Fe^{3+} iona[4]

2.3.2. Utjecaj strukturne modifikacije 3,4-HP na njihovu biološku aktivnost

Jedan od limitirajućih faktora za terapeutike je njihova molekulska masa koja mora biti manja od 500 Da kako bi se kelator mogao uspješno apsorbirati u gastrointestinalnom traktu i prolaziti kroz biomembrane do ciljnog mjesta svog djelovanja u stanicama. Ostali faktori (Lipinski pravila) su lipofilnost (logP) i ukupni naboj molekule te broj donorskih i akceptorskih skupina za stvaranje vodikovih veza.[1]Molekularna masa hidroksipiridinona je obično niska, dok se lipofilnost i naboj, odnosno ionizacijsko stanje u fiziološkim uvjetima mogu mijenjati uvođenjem različitih supstituenata na 3,4-HP. Različite funkcijske skupine kao što su amino, karboksilna, amidna i dr. uvelike utječu na lipofilni karakter 3,4-HP. Vezanjem supstituenata na dušikov atom piridinonskog prstena ne mijenja se kelirajuće vezno mjesto, tj. N-funkcionalzacija ne pokazuje veliki učinak na sposobnost keliranja liganda. 3,4-HP su stabilni bidentatni spojevi na čiju lipofilnost utječe vezanje različitih supstituenata na piridinonski prsten na položaje 1, 2, 3 i 5. Najčešće dolazi do modifikacije na N-1 i C-2 položaju, dok se supstituenti rjeđe vežu na C-5 i C-6 položaje. S obzirom da se prsten 3,4-HP vezanjem različitih supstituenata lako strukturno modificira, njihovi derivati razlikuju se u biološkoj aktivnosti. Vezanjem supstituenata povećava se lipofilnost kompleksa, ali i mobilizacija i aktivnost.[13,17] U ovome radu u svrhu povećanja lipofilnosti *meta* i *para* supstituiranih derivata *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona vezana je cimetna kiselina na slobodnu OH skupinu metodom Steglichove esterifikacije.

2.4. Cimetna kiselina

Cimetna kiselina (3-fenilprop-2-enska kiselina, $C_9H_8O_2$), nezasićena je aromatska kiselina koja može postojati kao *cis* i *trans* stereoizomer. U prirodi nalazimo *trans* izomer koji je stabilniji od *cis* izomera pa se iz toga razloga koristi u komercijalne svrhe. *Trans* cimetna kiselina bijela je kristalinična tvar, slabo topljiva u vodi, ali dobro topljiva u organskim otapalima.[18].



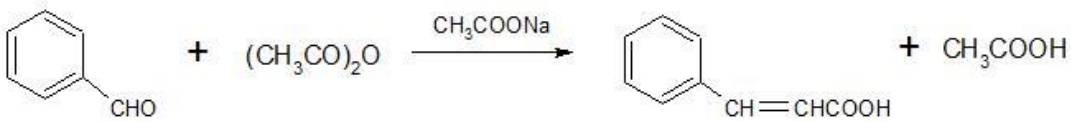
trans izomer *cis* izomer

Slika 2. *Trans* i *cis* izomer cimetne kiseline[18]

Cimetna kiselina kao i njezini derivati široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu. Najpoznatiji derivati su prije svega esteri (cinamati), a osim njih, cimetaldehid, hidroksi i metoksi derivati također su vrlo rasprostranjeni te se koriste u industriji parfema, medicini, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Cimetna kiselina ulazi u reakcije koje su tipične za reakcije karboksilne skupine i reakcije spojeva s dvostrukom vezom. Važan je intermedijer u biosintezi derivata šikimata, fenilpropanoida, stirena i stilbena.[18]

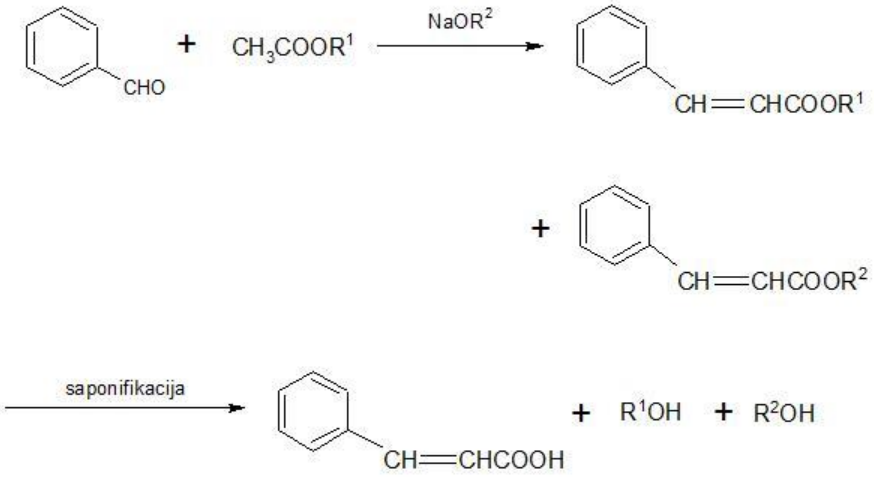
2.4.1. Sinteza cimetne kiseline

Biljke pomoću enzima fenilalanin-amonij-liaze (PAL) mogu vršiti deaminaciju fenilalanina pri čemu nastaje cimetna kiselina. Za industrijske potrebe cimetna kiselina i njeni derivati ne izoliraju se iz prirodnih izvora nego se priređuju sintetskim putem.[19] Komercijalna sinteza cimetne kiseline gotovo uvijek rezultira *trans* izomerom. Najstariji postupak priprave cimetne kiseline je Perkinova reakcija (Shema 6). Benzaldehid u reakciji s anhidridom octene kiseline uz prisutnost natrijeva acetata kao katalizatora daje cimetnu kiselinu. Osim natrijeva acetata, kao katalizator upotrebljavaju se kalijev acetat, tercijarni amini, kalijev fosfat i trimetil borat.[18]



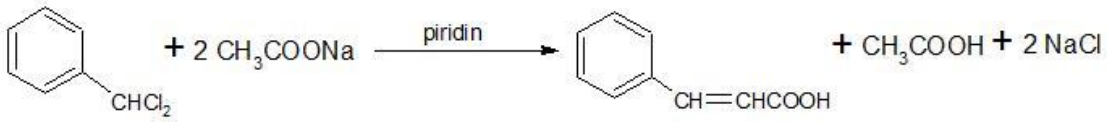
Shema 6. Perkinova reakcija[18]

Claisenovom kondenzacijom benzaldehida s esterom octene kiseline uz prisutnost alkoksidne baze nastaje ester cimetne kiseline koji saponifikacijom daje cimetnu kiselinu.[18]



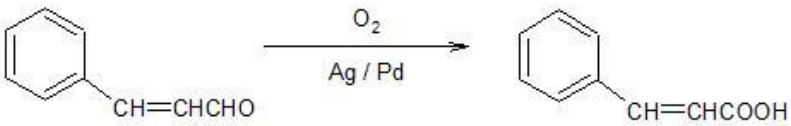
Shema 7. Claisenova kondenzacija[18]

Benzal klorid reagira s natrijevim acetatom u alkalnom mediju i daje cimetnu kiselinu u velikom prinosu. Ukoliko se u takvoj reakciji koristi amin, primjerice piridin, prinos reakcije može biti veći od 80%.[18]



Shema 8. Postupak dobivanja cimetne kiseline reakcijom benzal klorida i natrijeva acetata[18]

Cimetaldehid se može oksidirati u cimetnu kiselinu upotrebom kisika i nekog katalizatora kao što je srebro ili paladij.[18]



Shema 9. Oksidacija cimetaldehida[18]

2.4.2. Biološka aktivnost cimetne kiseline

Cimetna kiselina i njeni derivati prisutni su u voću,povrću, kavi i dr. Fenolne kiseline nisu esencijalne za čovjeka, ali imaju mnogo pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. S obzirom da su ti spojevi netoksični za ljudski organizam, često ih nalazimo u tradicionalnim biljnim lijekovima, a osim toga, važni su i u farmaceutskoj industriji.[3] U literaturi je opisana njihova velika antioksidativna aktivnost[3] koja je povezana sa strukturom spojeva, najviše položajem i brojem hidroksilnih skupina. Također se i prisutnost vinilne skupine smatra odgovornim za antioksidativno djelovanje. Cimetna kiselina i njezini fenolni analozi zahvaljujući supstituciji na fenolnom prstenu, adiciji na α,β-nezasićeni spoj i reakcijama karboksilne skupine, u velikoj mjeri pridonose medicinskim istraživanjima. Prirodni hidroksi derivati cimetne kiseline, poput kavene kiseline, i amidi cimetne kiseline, posebice 2-metilcinamid, pokazuju antitumorsko djelovanje.[20,21] Cimetna kiselina i njeni 3,4,5-trimetoksi, 3-trifluormetil i α-metil derivati koriste se u liječenju karcinoma prostate, dojke i endometrija.[22] Citotoksično djelovanje pokazuju derivati cimetne kiseline s oksazolinijem i dušikovim iperitom.[23] Derivati cimetne kiseline, pored toga što pokazuju antioksidativno i antitumorsko djelovanje, pokazuju i antibakterijsko, antituberkulotsko, antivirusno, antimalarijsko i protuupalno djelovanje. Osim toga, štite ljudski organizam djelovanja slobodnih radikala i ojačavaju imunološki sustav.[19] Zbog navedenih svojstava cimetna kiselina korištena je u ovome radu za pripravu supstituiranih derivata 3,4-HP.

2.5. Esteri

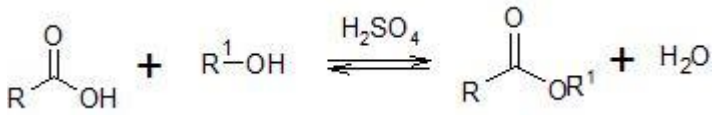
Esteri su vrlo rasprostranjena skupina organskih spojeva.Obično se dobivaju iz karboksilne kiseline i alkohola pa su upravo i najpoznatiji karboksilni esteri. To su derivati karboksilnih kiselina koji nastaju zamjenom –OH skupine sa –OR skupinom, gdje R može biti alkil ili aril. Esteri sadrže acilnu skupinu, a prisutnost C=O skupine daje im polarni karakter zbog kojeg mogu stvarati dipol dipol interakcije. Imaju niska vrelišta i dobro su topljivi u organskim otapalima, a esteri koji sadrže do pet ugljikovih atoma topljivi su i u vodi. Hlapljivi esteri imaju ugodan miris i često se upotrebljavaju u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.[24]

2.5.1. Metode priprave estera

Esteri se mogu prirediti iz karboksilnih kiselina, ali i iz njihovih derivata. Kiselinski kloridi i anhidridi reaktivniji su od karboksilnih kiselina pa se stoga mogu koristiti kao učinkoviti polazni spojevi u pripremi estera. Osim najpoznatije i najjednostavnije metode priprave estera, Fischerove esterifikacije, postoje i mnoge druge metode. Neke od tih metoda su Mitsunobu esterifikacija, Yamaguchijeva esterifikacija, Tishchenkova esterifikacija, pregradnja po Favorskom, Baeyer Villigerova reakcija te Steglichova esterifikacija.[25]

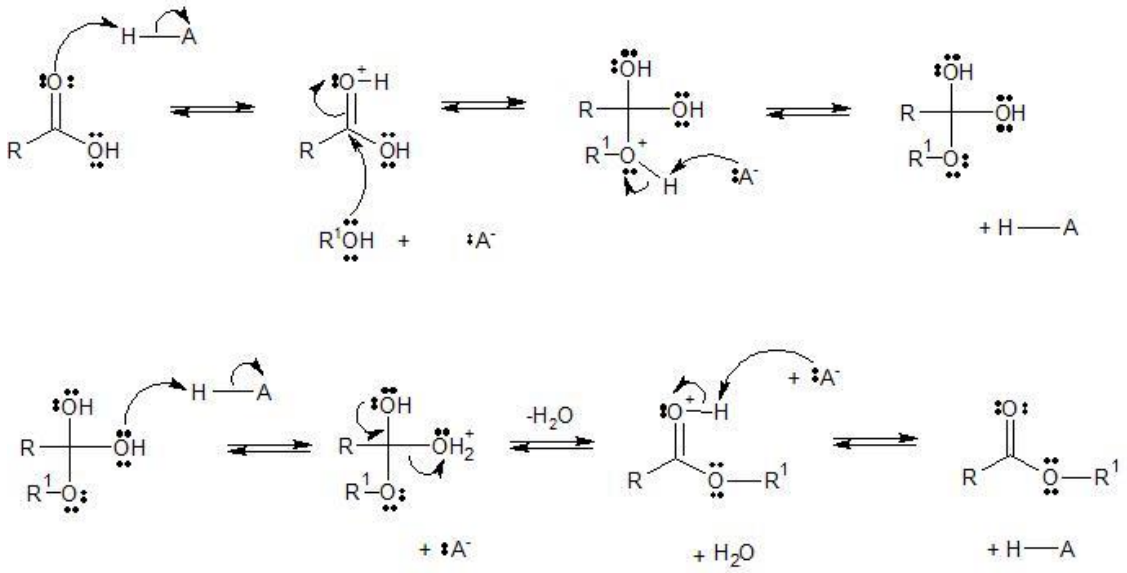
2.5.1.1. Fischerova esterifikacija

Fischerova esterifikacija jedna je od najjednostavnijih metoda priprave estera reakcijom karboksilne kiseline i alkohola u prisutnosti kiselog katalizatora (Shema 10). Kao katalizatori, najčešće se upotrebljavaju mineralne kiseline kao što je koncentrirana sumporna kiselina ili suhi klorovodik. Takva reakcija je reverzibilna pa se uspostavlja ravnoteža u kojoj su prisutni početni i konačni spoj u mjerljivim količinama. Prema Le Châtelierevom principu, ravnoteža se pomiče u desno upotrebnom viška alkohola ili uklanjanjem nastale vode.[24]



Shema 10. Fischerova esterifikacija[24]

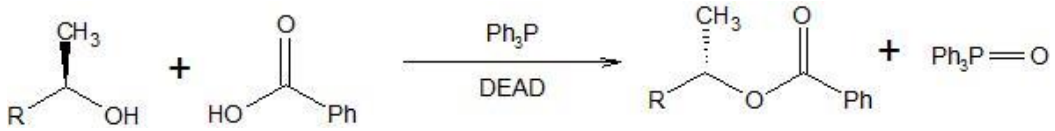
Mehanizam Fischerove esterifikacije primjer je nukleofilne acilne supstitucije koji uključuje dva koraka. Budući da ugljikov atom karbonilne skupine nije dovoljno elektrofilan za napad alkohola, dolazi do protoniranja karbonilne skupine upotrebom kiselog katalizatora. Time se povećava elektrofilnost karbonilne skupine i olakšava nukleofilni napad alkohola. Adicijom alkohola stvara se tetraedarski intermedijer koji gubitkom protona daje neutralni adicijski produkt. Protoniranjem hidroksilne skupine u sljedećem koraku nastaje dobro odlazeća skupina. U konačnici, gubitkom protona s druge hidroksilne skupine nastaje ester (Shema 11). Bitno je napomenuti kako se takva reakcija odvija samo u prisutnosti kiseline jer ukoliko bi se odvijala u bazičnom mediju, baza bi uklonila proton iz karboksilne kiseline i nastao bi karboksilatni anion koji više ne bi reagirao sa alkoholom.[26]



Shema 11. Mehanizam Fischerove esterifikacije[26]

2.5.1.2. Mitsunobu esterifikacija

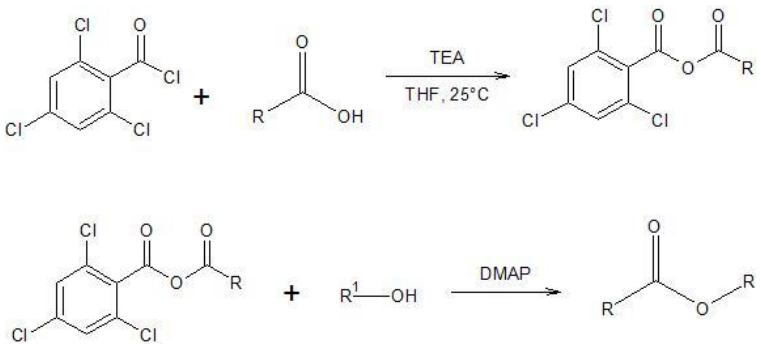
U Mitsunobu esterifikaciji dolazi do supstitucije hidroksilne skupine alkohola s nukleofilom pri čemu dolazi do inverzije konfiguracije. C-O veza alkohola puca pa alkohol postaje elektrofilan, dok je derivat karboksilne kiseline nukleofilan. Nukleofil bi trebao biti kiseli s obzirom da DEAD (dietilazodikarboksilat) mora biti protoniran tijekom reakcije kako bi se spriječile sporedne reakcije. Reakcija trifenilfosfina sa DEAD-om omogućuje stvaranje fosfonijevog međuprodukta koji se zatim veže na alkoholni kisik te ga na taj način aktivira kao odlazeću skupinu. Formiranje estera na taj način iz sekundarnog alkohola jedan je od mogućih načina priprave estera.[25]



Shema 12. Mitsunobu esterifikacija[25]

2.5.1.3. Yamaguchijeva esterifikacija

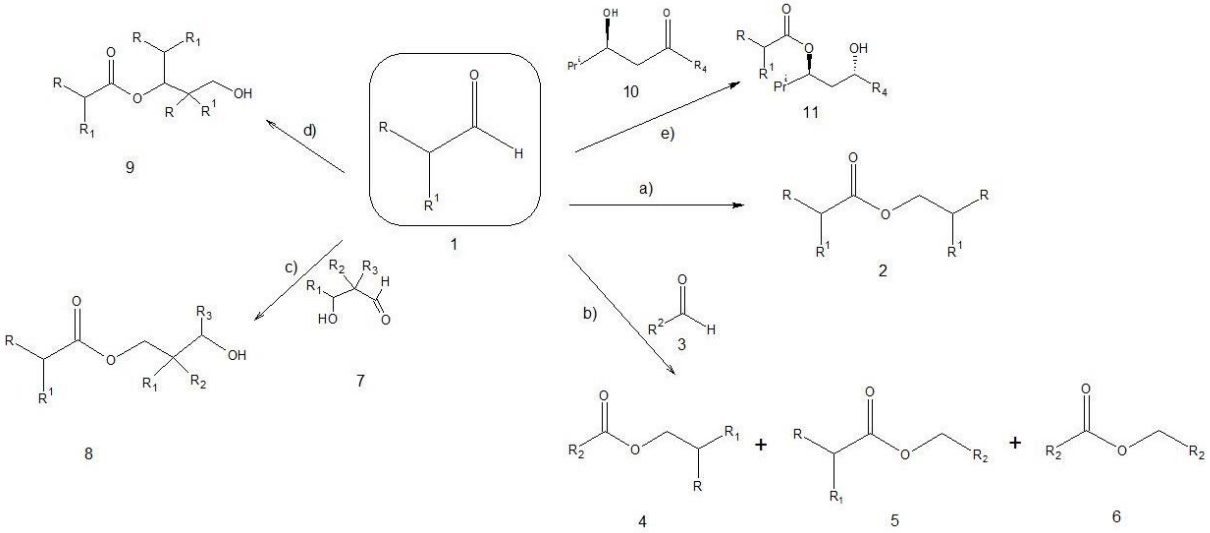
Yamaguchi esterifikacija omogućava pripravu estera reakcijom između Yamaguchijeva reagensa (2,4,6-triklorobenzoil klorida) i karboksilne kiseline uz prisutnost trietilamina (TEA) i tetrahidrofurana (THF). Yamaguchi esterifikacija odvija se u blagim reakcijskim uvjetima gdje se nakon nastanka miješanog 2,4,6-triklorobenzoilog anhidrida, hlapljive tvari odstrane, a nastali anhidrid u reakciji s alkoholom u prisutnosti DMAP-a daje željeni ester.[27]



Shema 13. Yamaguchijeva esterifikacija[27]

2.5.1.4. Tishchenkova esterifikacija

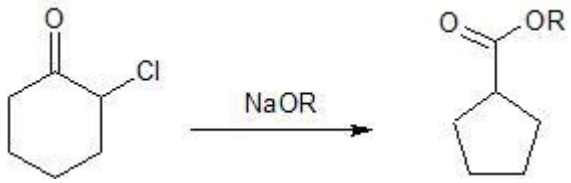
Tishchenkova esterifikacija je vrlo učinkovita metoda za pripravu estera iz odgovarajućih aldehida. Obuhvaća (a) reakciju priprave estera reakcijom dva ekvivalentna aldehida (1) uz prisutnost Lewisove kiseline kao katalizatora te miješanu Tischenkovu esterifikacija (b, c) koja podrazumijeva upotrebu dva različita aldehida(1 i 3) pri čemu nastaje smjesa tri različita estera (4,5,6). Osim toga, u miješanoj Tischenkovoj reakciji, reakcijom aldehida (1) i β-hidroksi-aldehida (7) nastaje 1,3-dioksan-4-ol koji u bazno kataliziranoj reakciji daje monoester (8). U aldolnoj Tischenkovoj reakciji (d), prvi korak je aldolna kondenzacija kojom nastaje β-hidroksi-aldehid. Zatim nastaje hemiacetal koji se u bazno kataliziranim uvjetima transformira u monoester. Postoji još jedna vrsta Tischenkove esterifikacije, Evans-Tischenkova reakcija (e), koja je vrlo korisna u organskoj sintezi. β-hidroksi-keton (10) u reakciji sa aldehidom (1), uz prisutnost metalnog katalizatora, daje ester (11). Takva reakcija može se smatrati vrstom aldolne Tischenkove reakcije s obzirom na sličan mehanizam i sličan produkt. Kod spomenutih reakcija, vrlo je bitno kontrolirati uvjete reakcija kako bi se izbjegle moguće sporedne reakcije poput Cannizzarove rekacije, Tollensove rekacije, transesterifikacije, oksidacije, hidrolize produkata i dr.[28]



Shema 14. Različite modifikacije Tischenkove reakcije[28]

2.5.1.5. Pregradnja po Favorskom

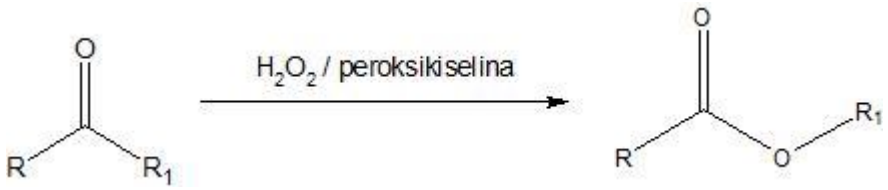
Pregradnja po Favorskom podrazumijeva reakciju α-haloketona s hidroksidom ili alkoksidom pri čemu nastaju karboksilne kiseline ili esteri. Reakcija se odvija preko ciklopropanona kao međuprodukta a mehanizam reakcije nije u potpunosti poznat. Ukoliko se radi o cikličkim α-halo ketonima, dolazi do kontrakcije prstena. Pregradnja se odvija uz prisutnost baze ili hidroksida kako bi kao konačni produkt nastala karboksilna kiselina. Da bi nastao ester ili amid, reakcija se odvija uz prisutnost alkoksidne baze ili amina. Upotrebom alkoksidnih aniona kao što je natrijev metoksid, umjesto natrijevog hidroksida, nastaje esterski produkt (Shema 15).[25,29,30]



Shema 15. Sinteza estera pregradnjom po Favorskom[29]

2.5.1.6. Baeyer Villigerova reakcija

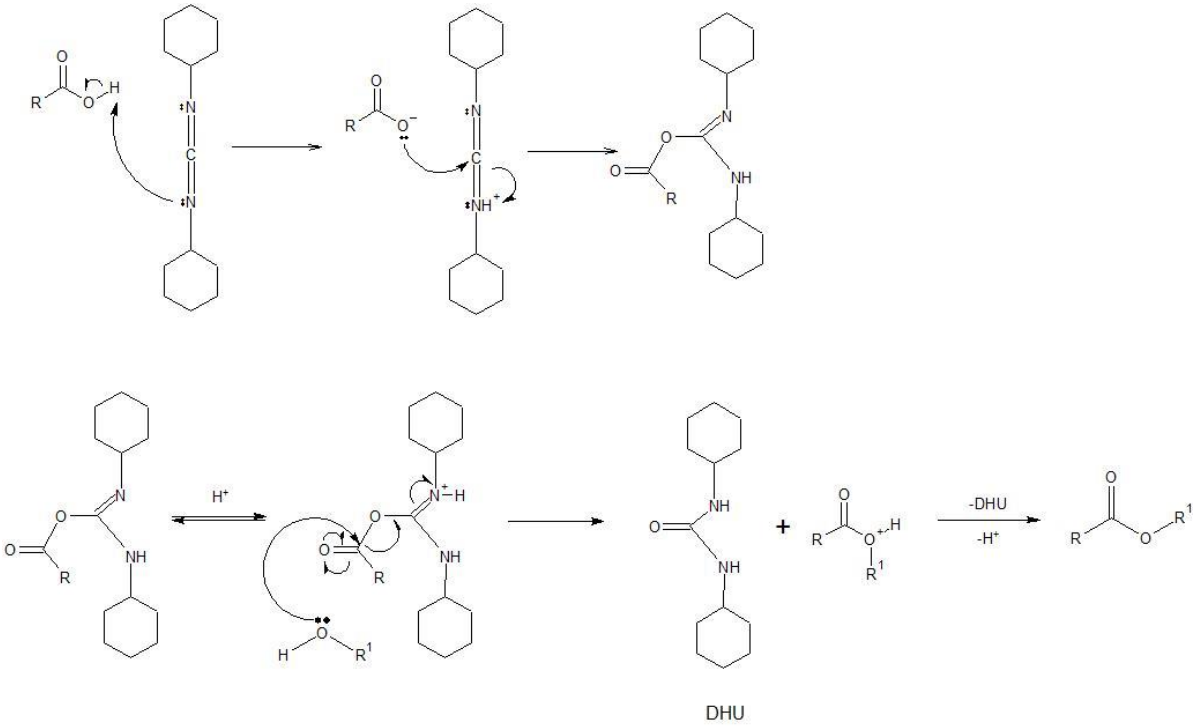
Baeyer Villigerovom oksidacijom,upotrebom peroksidnih kiselina ili peroksida kao oksidansa, iz ketona nastaju esteri (Shema 16). U toj reakciji dolazi do oksidacijskog cijepanja ugljik-ugljik veze pomoću primjerice vodikovog peroksida ili peroksikiseline. Regiospecifičnost reakcije ovisi o sposobnosti migracije supstituenata vezanih za karbonilnu skupinu. Supstituenti popust tercijarnog alkila i cikloheksila, koji mogu stabilizirati pozitivan naboj, lakše migriraju.[31]



Shema 16. Baeyer Villigerova reakcija[31]

2.5.1.7. Steglichova esterifikacija

Steglichova esterifikacija još je jedan od načina priprave estera u blagim reakcijskim uvjetima. Često se koristi za sintezu sterički zahtjevnih estera. Karboksilna kiselina s alkoholom, uz prisutnost 4-dimetilaminopiridina (DMAP) kao katalizatorai karbodiimidnog reagensa najčešće *N*,*N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC) kao aktivatora, daje ester. Ovakva metoda dobivanja estera korištena je i u ovome radu za dobivanje esterskih derivata 3,4-HP. DCC najprije aktivira karboksilnu kiselinu, a kao međuprodukt nastaje *O*-acilizo urea koja se adira na alkohol pri čemu nastaje ester. Kao nusprodukt u toj reakciji nastaje dicikloheksil urea (DHU) (Shema 17).[32]



Shema 17. Mehanizam Steglichove esterifikacije[32]

U ovome radu kao karbodiimidni reagens korišten je *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimidhidroklorid (EDC × HCl). Razlog tomu je dobra topljivostDHU u vodi i u organskim otapalimastoga se onateško uklanja iz reakcijske smjese. U slučaju kada se kao aktivator u Steglichovoj esterifikaciji koristi EDC x HCl nusprodukt je urea koja se zbog dobre topljivosti u vodi može ukloniti iz reakcijske smjese estrakcijom.[32]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

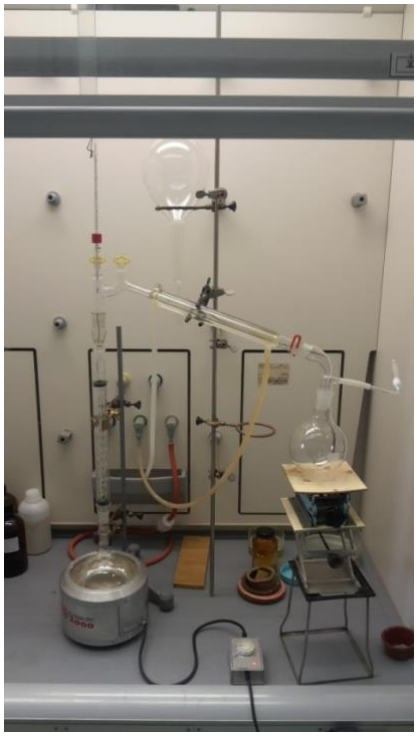
U sintezama korišteni su sljedeći reagensi, otapala i polazni spojevi: 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol; ACROS ORGANICS), *m*-nitroanilin (Sigma-Aldrich), *p*-nitroanilin (Sigma-Aldrich), *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH; Alfa Aesar), 3-fenilprop-2-enska kiselina (cimetna kiselina, studentski preparat), 4-dimetilaminopiridin (DMAP; Alfa Aesar), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimidhidroklorid (EDC × HCl, Sigma-Aldrich), natrijev hidrogenkarbonat (T.T.T.doo), klorovodična kiselina (CARLO ERBA REAGENIS), bezvodni natrijev sulfat (T.T.T.doo), metanol (VWR BDH CHEMICALS), etil-acetat (VWR BDH CHEMICALS) i diklormetan (DCM; VWR BDH CHEMICALS), natrijev karbonat (MERCK-ALKALOID), kalcijev klorid (GRAM MOL).

Kemijske reakcije provedene su uobičajenim metodama organske sinteze. Sva korištena otapala su pročišćavana i sušena (suhi DCM) prema uobičajenim postupcima.[33] Za pročišćavanje spojeva korištene su kromatografija na stupcu i prekristalizacija iz odgovarajućeg otapala. Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkata korištena je tankoslojna kromatografija (TLC) na pločicama silikagela (60 F 254, 0,25 mm, Fluka). Za detekciju komponenti korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm ireverzibilna adicija joda. Za kromatografiju na stupcu i tankoslojnu kromatografiju korišten je sustav otapala etil-acetat/metanol, 5:1. Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (Silica 60, 0,063-0,2 mm), a kao eluens je korišten sustav otapala etil-acetat/metanol, 5:1. Otapala su uparavana na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak (Büchi).

^{1}HNMR i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker AV 600 na sobnoj temperaturi pri 400 MHz, 600MHz i 150 MHz u deuteriranom metanolu (CD_3OD) i deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-d_6) kao otapalu.

3.2. Priprava suhog diklormetana

U lijevku za odjeljivanje izmućka se diklormetan s 5%-tnim natrijevim karbonatom (31,57g/600mL), a zatim ispusti u Erlenmeyerovu tikvicu. Diklormetan se vrati u lijevak za odjeljivanje i izmućka s destiliranom vodom (600 mL), ispusti u suhu Erlenmeyerovu tikvicu i doda kalcijev karbonat sve dok se ne prestane stvarati talog. Tikvica se začepi i nakon 24 h se pripremi aparatura kao na Slici 3. U tikvicu se kroz lijevak, preko vate, ulije suhi diklormetan i dodaju se kamenčići za vrenje. U hladilo se pusti voda i hvata se predfrakcija (38°C) u Erlenmeyerovu tikvicu. Budući da diklormetan destilira na 40-41°C, pri toj temperaturi se stavi okrugla tikvica za hvatanje frakcije u koju se nakon završetka stave molekulska sita.[33]

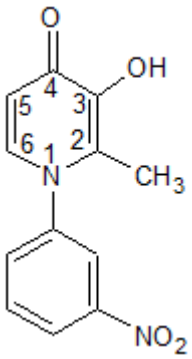


Slika 3. Aparatura za destilaciju suhog diklormetana

3.3. Priprava *meta* i *para* supstituiranih derivata *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona

3.3.1. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (1)

U staklenu cijev dodani su maltol (1 g, 7,93 mmol), *m*-nitroanilin (1,095 g, 7,93 mmol), *p*-TsOH (150,8 mg, 0,79 mmol) i voda (20 mL). Staklena cijev je čvrsto zatvorena i stavljena u metalni nosač. Tako pripremljenu aparaturu potrebno je zagrijavati 48 h na temperaturi od 150 °C, nakon čega se reakcijska smjesa ohladi na sobnu temperaturu i filtrira preko Büchnerovog lijevka. Hlađenjem matičnice (24 h, 4°C) dolazi do kristalizacije, a nastali talog se odfiltrira preko Büchnerovog lijevka. Dobiven je žuti kristalni produkt **1** (298mg, 15%);*t.t.*217,9-218,7°C;R_f=0,55



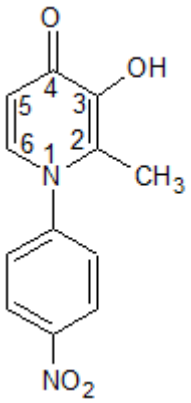
Slika 4. Strukturna formula spoja **1**

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ / ppm: 1,93 (s,CH_3), 6,25 (d, 1H, J=7,37 Hz, H-5), 7,64 (d, 1H, J=7,37Hz, H-6), 7,83-7,88 (m, 1H, H-Ar), 7,98-8,00 (m, 1H, H-Ar), 8,38-8,40 (m, 2H, 2H-Ar)

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ / ppm: 13,31 (CH_3), 111,16 (C-5), 122.42, 123,43, 130,91, 133,94, (4 CH, Ar), 128,43, (C-2), 137,81 (C-6), 142,08 (C-N), 144,96 (C-3), 148,16 (C-NO_2), 169, 88 (C=O).

3.3.2. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (2)

Spoj **2**, 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on, pripravljenje na jednak način kao i prethodno pripravljeni spoj **1**. Kao polazni spoj korišten je *p*-nitroanilin (1,095 g, 7,93 mmol). Također su korišteni maltol (1 g, 7,93 mmol), *p*-TsOH (150,8 mg, 0,79 mmol) i voda (20 mL). Reakcija je obrađena na identičan način kao u slučaju priprave spoja **1**, nakon čega je izoliran kristalni produkt narančaste boje (264,3 mg, 14%);*t.t.*295,2-296,8°C;R_f=0,54



Slika 5. Strukturna formula spoja **2**

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ / ppm: 2,01 (s, 3H, CH_3), 6,27 (d, *J*=7,4 Hz, 1H, H-5), 7,62 (d, *J*= 7,4 Hz, 1H, H-6), 7,79 (d, *J*=8,9 Hz, 2H, 2H-Ar), 8,39 (d, *J*=8,9 Hz, 2H, 2H-Ar)

DEPTQ NMR (DMSO-d6) δ / ppm: 13,38 (CH_3), 111,34 (C-5), 124,81 (2 CH-Ar), 128,12 (C-2), 128,60 (2 CH-Ar), 137,54 (C-6), 145,13 (C-N), 146,44 (C-3), 147,20 (C-NO_2), 169,86 (C=O).

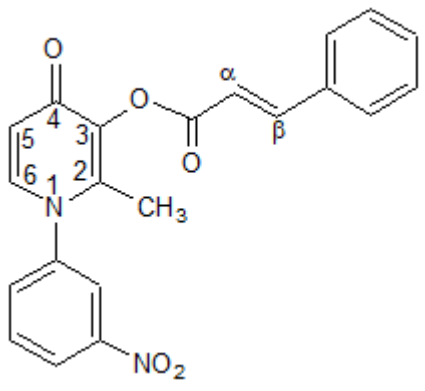
3.4. Priprava estera cimetne kiseline s *meta* i *para* supstituiranim derivatima *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona

Za dobivanje estera cimetne kiseline s *meta* i *para* supstituiranim derivatima *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona korištena je metoda Steglichove esterifikacije. U ovom radu korišteni su *meta* i *para* supstituirani derivati *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (spojevi **1** i **2**), 3-fenilpropenska kiselina (cimetna kiselina), EDC × HCl i DMAP.Cimetna kiselina pročišćena je prekristalizacijom iz vruće vodene otopine.

Reakcije su provedene u suhom DCM.Esteri cimetnekiseline s *meta* supstituiranim derivatima *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona pripravljeni su prema omjeru n(*meta*supstituirani *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on) : n(cimetna kiselina) : n(EDC × HCl) : n(DMAP) = 1 : 1 : 1,1 : 0,1.

3.4.1. Priprava [2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (3)

Spoj **3**, pripravljen je reakcijom cimetne kiseline i spoja **1**. Najprije se u okrugloj tikvici otopi 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on (100 mg, 0,406 mmol) u suhom DCM (3 ml). Zatim se doda cimetna kiselina (60,1 mg, 0,406 mmol) i DMAP (4,96 mg, 0,041 mmol). Sadržaj u okrugloj tikvici hladi se u ledenoj kupelji uz miješanje pomoću magnetske miješalice, a nakon toga, u ohlađenu smjesu, doda se EDC × HCl (85,6 mg, 0,447 mmol). Reakcijska smjesa nastavi se miješati na magnetskog miješalici 24 h. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala etil-acetat/metanol, 5:1) uz UV detekciju. Nakon 24h, reakcija je prekinuta, a u reakcijski smjesu dodan DCM (21 ml). Reakcijska smjesa se ekstrahira dva puta sa otopinom HCl (25 ml, 0,5 M), jedan put sa zasićenom otopinom natrijeva-hidrogenkarbonata (25ml) i jedan put s destiliranom vodom (25ml). Donji, diklormetanski slojevi, se skupe i suše u začepljenoj tikvici na bezvodnom Na_2SO_4. Nakon filtriranja Na_2SO_4, DCM se upari na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiveni produkt (200mg) pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala etil-acetat/metanol, 5:1) te dobiven bijeli kristalni produkt, spoj **3** (71 mg, 46%); R_f=0,54

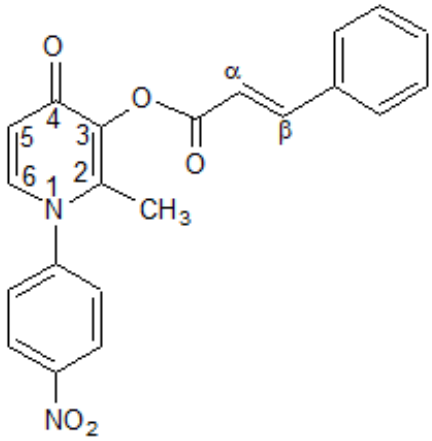


Slika 6. Strukturna formula spoja **3**

^{1}H NMR (400MHz, CD_3OD) δ /ppm: 2,03 (s,CH_3), 6,62(d, 1H, *J*=7,57 Hz, H-5),6,83(d, 1H, *J*=16,02 Hz,H-α),7,46-7,47(m, 3H, *m*+*p*-HAr_{cim}), 7,69-7,71 (m, 2H, *o*-HAr_{cim}), 7,87-7,97 (m, 4H, 2H-Ar+H-β+H-6), 8,48-8,50(m,2H, H-Ar)

3.4.2. Priprava [2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat (4)

Spoj **4**, pripravljen je iz spoja **2** Steglichovom esterifikacijom, na jednak način kao i prethodno pripravljeni spoj **3**. Spoju **2**, doda se cimetna kiselina, EDC × HCl i DMAP u već spomenutim omjerima. Nakon 24 h, reakcijska smjesa je obrađena ekstrakcijom sa klorovodičnom kiselinom (2×25 mL), natrijevim hidrogenkarbonatom (25 mL) i destiliranom vodom (25 mL). Dobiven je produkt (244 mg) koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala etil-acetat/metanol, 5:1). Izoliran je kristalni produkt bijeleboje (23 mg, 15%);R_f=0,54



Slika 7. Strukturna formula spoja **4**

^{1}H NMR (400MHz, CD_3OD) δ /ppm:2,12 (s, CH_3), 6,61 (d, 1H, *J*=7,59 Hz, H-5), 6,81 (d, 1H, *J*=16,02 Hz, H-α), 7,45-7,47 (m, 3H,*m*+*p*-HAr_{cim}), 7,67-7,70 (m, 2H, *o*-HAr_{cim}), 7,79 (d, 2H,H-Ar,J=8,98Hz), 7,86 (d, 1H, *J*= 7,59Hz, H-6), 7,92 (d, 1H, *J*=16,03 Hz, H-β), 8,46 (m, 2H, H-Ar, *J*=8,96Hz)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

3,4-HP su skupina heterocikličkih spojeva koji posjeduju visoki afinitet za metalne ione poput Fe^{3+} i Al^{3+} prema tome koriste se za liječenje bolesti kao što su primjerice Parkinsonova i Alzheimerova bolest. Osim toga, poznato je i njihovo antitumorsko djelovanje.[16] Spoj **1**, 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on i spoj **2**, 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on pripadaju skupini *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona, a u ovome radu korišteni su kao polazni spojevi za pripravu njihovih esterskih derivata s cimetnom kiselinom, spojeva **3** i **4**. Za sintezu spojeva **1** i **2** korišten je literaturno opisan postupak[34] koji je modificiran upotrebom *p*-toluensulfonske kiseline (*p*-TsOH) kao kiselog katalizatora.

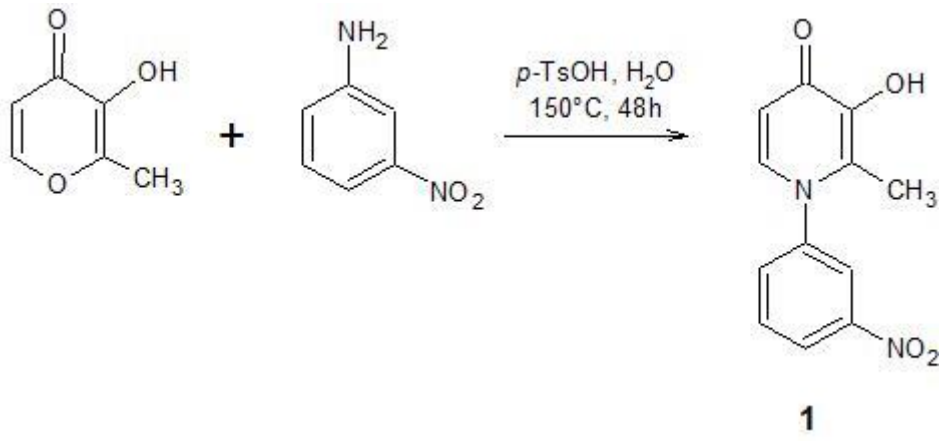
Piridinonski prsten se vrlo lako strukturno modificira što omogućava pripravu velikog broja derivata 3,4-HP. Prema prethodnim istraživanjima provedenim na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a[35,36] pokazano je kako povećanje lipofilnosti 3,4-HP dovodi do postizanja veće biološke aktivnosti. Prema tome u ovome radu osnovni hidroksipiridinonski skelet se strukturno modificira vezanjem cimetne kiseline na slobodnu OH-skupinu spojeva **1** i **2** u svrhu priprave spojeva s poboljšanim fizikalno-kemijskim i farmakološkim svojstvima. Cimetna kiselina (3-fenilprop-2-enska kiselina, $C_9H_8O_2$)je nezasićena aromatska kiselina, a kao što je prethodno spomenuto, cimetna kiselina i njezini derivati također pokazuju biološku aktivnost.[3] Derivati 3,4-HP s cimetnom kiselinom pripravljeni su metodom Steglichove esterifikacije. Navedeni spojevi, konačni produkti **3** i **4**, pripravljeni su u svrhu ispitivanja njihove biološke aktivnosti.

4.2. Priprava *meta* i *para* supstituiranih derivata*N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona

Kao polazni reagens za pripravu *meta* i *para* supstituiranih derivata *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona korišten je 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol). Literaturno opisan postupak[33] sinteze spojeva **1** i **2** modificiran je upotrebom *p*-toluensulfonske kiseline (*p*-TsOH) kao kiselog katalizatora. Sinteza 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (**1**) i 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (**2**) iz maltola kao polaznog spoja provedena je izravno, bez zaštite hidroksilne skupine, uz upotrebu *meta* i *para* nitroanilina kao Michaelovih donora. Pripravljeni *meta* i *para* supstituirani derivati *N*-aril-3-hidroksi-2-metil-piridin-4-oni poslužili su kao polazni spojevi za sintezu esterskih derivata cimetne kiseline, spojeva **3** i **4**.

4.2.1. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (1)

Sinteza spoja **1** (3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on) provedena je upotrebom maltola i *m*-nitroanilina kao polaznih reagensa, uz dodatak vode i *p*-TsOH kao kiselog katalizatora. Spoj **1** pripravljen je u jednom koraku, kako je opisano u poglavlju 3.3.1.Sinteza 3,4-HP Michaelovom adicijom iz maltola i primarnog amina podrazumijeva upotrebu kiseloga katalizatora kako ne bi došlo do deprotoniranja hidroksilne skupine maltola i nastajanja kondenzacijskih nusprodukata, a u konačnici i do smanjenja ukupnog prinosa reakcije. Budući da je jedan od polaznih spojeva aril-amin, točnije *m*-nitroanilin, sinteza spoja **1** moguća je u kiselim uvjetima s obzirom da aril-amini nisu u potpunosti protonirani pa u ravnoteži postoji mali udio neprotoniranog oblika. Takva struktura im omogućava nukleofilni napad na maltol.[12] Iako je ovakva direktna metoda priprave spoja **1** rezultirala niskim prinosom, puno je jednostavnija od Harrisove metode koja obuhvaća više reakcijskih koraka. Spoj **1** poslužio je kao polazni spoj za pripravu njegovog esterskog derivata, spoja **3**.

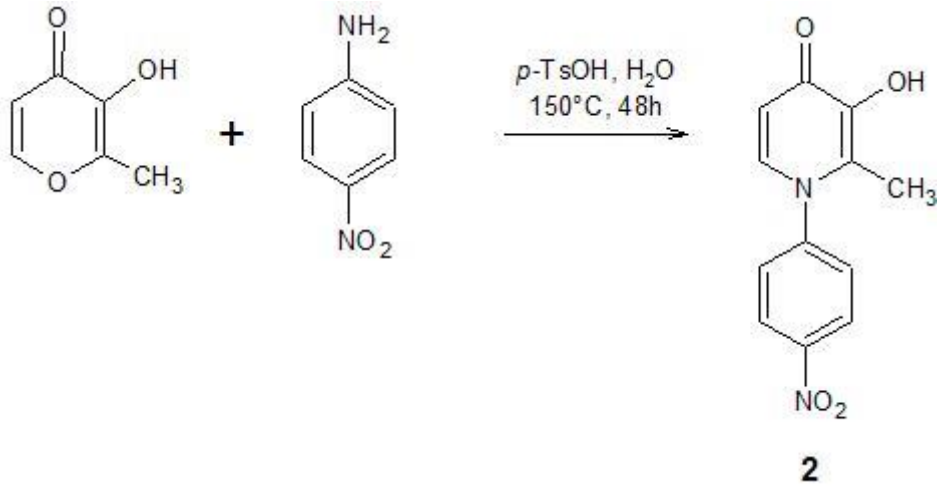


Shema 18. Priprava spoja **1**

4.2.2. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (2)

Spoj **2** (3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on) dobiven je na jednak način kao i spoj **1**. Pripravljen je u jednom koraku, zagrijavanjem ekvimolarnih količina *p*-nitroanilina i maltola u vodi uz upotrebu *p*-TsOH kao kiselog katalizatora.

Kao i u slučaju sinteze spoja **1**, sintezu spoja **2** bilo je moguće provestiu kiselim reakcijskim uvjetima s obzirom na to da je kao primarni amin korišten aril-amin *p*-nitroanilin.



Shema 19. Priprava spoja **2**

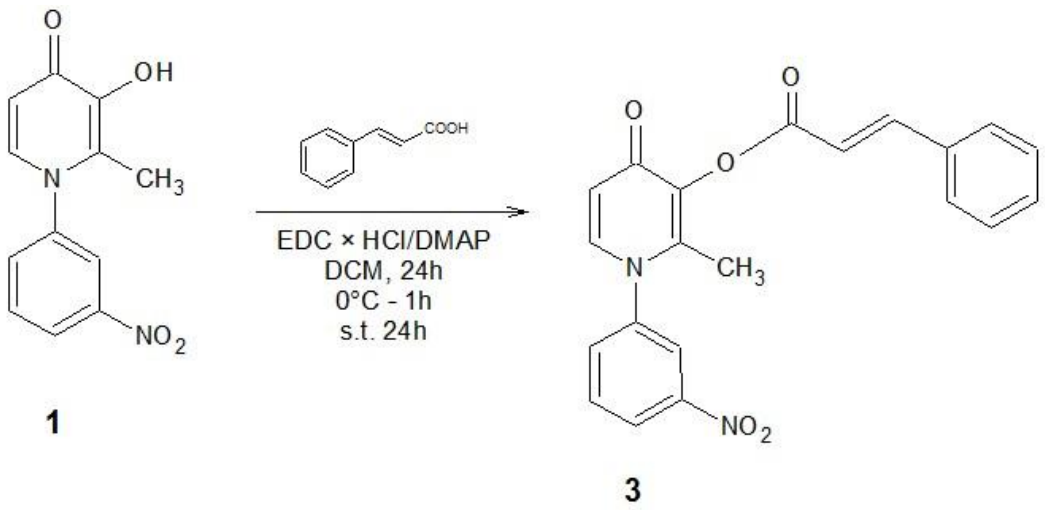
4.3. Priprava estera cimetne kiseline s *meta* i *para* supstituiranim derivatima N-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona

Kao i hidroksipiridinoni, cimetna kiselina također pokazuje kelirajući učinak i biološku aktivnost.[19] Prema tome u ovome radu provedena je sinteza 3,4-HP i njihovih derivata koji u svojoj strukturi sadrže cimetnu kiselinu. Za pripravu spojeva **3** i **4** korištena je Steglichova esterifikacija koja je metodadobivanja estera u blagim reakcijskim uvjetima.[32] U ovome radu kao polazni spojevi za sintezu estera korišteni su cimetna kiselina, *meta* i *para* supstituirani derivati *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (spojevi **1** i **2**), EDC × HCl kao aktivator karboksilne skupine i DMAP kao katalizator.

Lipofilnost tvari, jedan je od parametara koji određuje potencijalne kelatore. Literaturno jepoznato kako uvođenje različitih supstituenata na 3,4-HP, odnosno povećanje njihove lipofilnosti može dovesti do povećanja biološkog učinka.[13,17] U svrhu ispitivanja biološke aktivnosti u ovome radu sintetizirani su ciljni produkti **3** i **4** koji se u svojoj strukturi razliku samo po položaju nitro skupine na arilnom djelu 3,4-HP. Budući da sintetizirani spojevi u svojoj strukturi posjeduju identični supstituent no na različitom položaju arilnog djela 3,4-HP na ovaj način moguće je ispitati i utjecaj položaja susptituenta na biološku aktivnost konačnih produkata.

4.3.1. Priprava [2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (3)

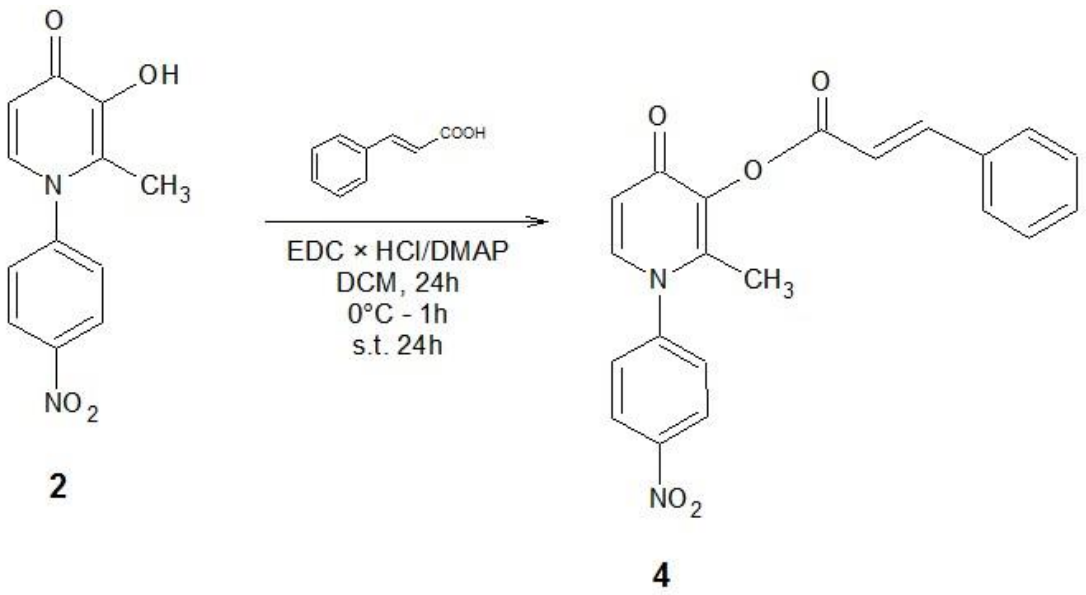
Spoj **1** korišten je kao polazni reagens za sintezu spoja **3** ([2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata). Steglichovom esterifikacijom, cimetna kiselina se vezala na slobodnu hidroksilnu skupinu 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona.Kao katalizator korišten je DMAP, a kao aktivator, a umjesto DCC-a, korišten je EDC × HCl kako bi se izbjeglo stvaranje DHU kao nepoželjnog nusprodukta. Sinteza spoja **3** uspješno je provedena što je pretpostavljeno tankoslojnom kromatogafijom te potvrđeno ^{1}H NMR spektroskopijom, no spoj **3** nije se mogao izolirati u čistom obliku budući da je pročišćavanje spoja kromatografijom na stupcu silikagela dovelo do njegovog raspada. Spoj **3** pokušalo se pročistititi i prekristalizacijom iz odgovarajućeg otapala (metanol, etil-acetat) što je također dovelo do raspada produkta. Zbog problema prilikom pročišćavanja spoja **3** te njegove velike nestabilnosti pri sobnoj temperaturi spoj **3** neće poslužiti za ispitivanje njegove biološke aktivnosti.



Shema 20. Priprava spoja **3**

4.3.2. Priprava [2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata(4)

Kao što je već spomenuto, s ciljem povećanja lipofilnosti 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (spoj **2**) cimetna kiselina je metodom Steglichove esterifikacije vezana na OH skupinu spoja **2**. Spoj **4** pripravljen je na jednak način kao i prethodno pripravljeni spoj **3**, tako da su spoju **2** dodani cimetna kiselina, EDC × HCl i DMAP u već spomenutim omjerima (3.4.). Kao i u slučaju priprave spoja **3** uspješno je pripravljen esterski derivat 3-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on,spoj **4**, što je pretpostavljeno tankoslojnom kromatogafijom te potvrđeno ^{1}H NMR spektroskopijom, no također pročišćavanjem spoja **4** kromatografijom na stupcu i prekristalizacijom (etil-acetat, metanol) došlo je do raspada spoja. Spoju **4** zbog problema prilikom pročišćavanja te zbog njegove izrazite nestabilnosti pri sobnoj temperaturi neće biti ispitana biološka aktivnost.



Shema 21. Priprava spoja **4**

5. ZAKLJUČAK

N-aril supstituirani 3-hidroksipiridin-4-oni, spoj **1** **(**3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on) i spoj **2** (**3**-hidroksi-2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on) pripravljeni su direktnom metodom u zatvorenoj staklenoj cijevi. Literaturno opisana metoda[34] modificirana je upotrebom *p*-TsOH kao kiselog katalizatora kako bi se spriječilo deprotoniranje hidroksilne skupine maltola i nastanak alkoksida te smanjila mogućnost nastajanja kondenzacijskih nusprodukata. U svrhu povećanja lipofilnosti *N*-aril supstituiranih 3-hidroksipiridin-4-ona vezana je cimetna kiselina Steglichovom metodom esterifikacije te su na taj način pripremljeni spoj **3** ([2-metil-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat) i spoj **4** **(**[2-metil-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoat). Povećanje lipofilnosti dovodi do postizanja veće biološke aktivnosti navedenih spojeva, no zbog problema prilikom pročišćavanja te izrazite nestabilnosti spojeva pri sobnoj temperaturi, spojevi **3** i **4** neće poslužiti za ispitivanje njihove biološka aktivnost.

Strukture svih pripravljenih spojeva određene su ^{1}H, ^{13}C i DEPTQ NMR spektroskopijom.

6. POPIS LITERATURE

1. Ž. Car, V. Petrović Perković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind*. **66** (2017), 17-28.
2. M. A Santos, S. Chaves, *Future Med. Chem.* **7** (2015), 383-410.
3. F. Natella, M. Nardini, M. DiFelice, C. Scaccini, *J. Agric. Food Chem*. **47** (1999), 1453-1459.
4. L. Saghaie, R. C. Hider, *Res. Pharm. Sci.* **3**(1) (2008), 21-30.
5. E. L. Beverly, K. A. Duhme, R. C. Hider, M. BilayetHossain, S. Rizvi, D. Van der Helm, *J. Med. Chem.* **39** (1996), 3659-3670.
6. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016), 595−604.
7. W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, *J. Organomet. Chem.* **696** (2011), 999-1010.
8. M. Tsuchiya, K. Kohata, T. Odashima, H. Ishii, *Anal. Sci.* **11** (1995), 343-347.
9. A. Fassihi, D. Abedi, L. Saghaie, R. Sabet, H. Fazeli, G. Bostaki, O. Deilami, H. Sadinpour, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009), 2145–2157.
10. K. Jakopčić, B. Tamhina, F. Zorko, M. J. Herak, *J. Inorg. Nucl. Chem*, **39** (1977), 1201-1203.
11. R. L. N. Harris. *Aust. J. Chem.* **29** (1976), 1329 -1334.
12. L. Saghaie, M. Mirmohammad Sadeghi, A. Nikazma, *Res. Pharm. Sci.* **1** (2006), 40-48.
13. M. A. Santos, S. M. Marques, S. Chaves, *Coord. Chem. Rev.* **256** (2012), 240-259.
14. M. Đokić, N. Bilandžić, *Meso* **3** (2012), 232-238.
15. L. E. Scott, C. Orvig, *Chem. Rev.* **109** (2009), 4885-4910.
16. I. B. Afanas, *Curr. Med. Chem*. **12** (2005), 2731-2739.
17. Z. D. Liu, R. C. Hider, *Med. Res. Rev.* **22** (2002) 26-64.
18. D. Gabre, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **9** (2012), 193-196.
19. P. Sharma, *J. Chem. Pharm. Res.* **3** (2011), 403–423.
20. D. R. Welch, D. E. Harper, K. H. Yohem, *Clin. Exp. Metastasis* **11** (1993), 201–212.
21. A. Nitzsche, S. V. Tokolov, H. O. Gutzeit, J. Ludwig-Műller, *J. Agric Food Chem*. **52** (2004), 2915–2923.
22. P. De, M. Baltas, F. Bedos-Belval, *Curr. Med. Chem*. **18** (2011), 1672–1703.
23. L. Hedvati, A. Nudelman, E. Falb, B. Kraiz, R. Zhuk, M. Sprecher, *Eur. J. Med. Chem.* **37** (2002), 607–616.

24. R. T. Morrison, R. N. Boyd, *Organic chemistry*, Englewood Cliffs: Prentice Hall International, 1992.
25. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2000.
26. J. G. Smith., *Organic chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2011.
27. Dhimitruka, J. Santa Lucia, *Org. Lett.* **8** (2006), 47-50.
28. O. P. Törmäkangas, A. M. P. Koskinen, *Res. Devel. Organic Chem.* **5** (2001), 225-255.
29. J. Wohllebe, E. W. Garbisch, *Organic Syntheses* ***56*** (1977), 107-111.
30. A. G. Ross, S. D. Townsend, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **78** (2013), 204-210.
31. G. A. Olah, Q. Wang, N. J. Trivedi, G. K. S. Prakash, *Synthesis*, **9** (1991), 739-740.
32. B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **17** (1978), 522-524.
33. *Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, 4th edition, Longman, London, 1978.
34. B. Tamhina, K. Jakopcic, F. Zorko, M. J. Herak, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **36** (1974), 1855-1857.
35. V. Petrović Peroković, B. Prugovečki, Ž. Car, *Croat. Chem. Acta*. **86** (3) (2013), 317-323.
36. V. Petrović Peroković, Ž. Car, T. Opačak-Bernardi, I. Martin-Kleiner, M. Kralj, S. Tomić, *Mol. Divers*. **21** (2017), 881-891.

7. PRILOZI

7.1. Popis oznaka kratica i simbola

1,2-HP	1-hidroksipiridin-2-oni
3,2-HP	3-hidroksipiridin-2-oni
3,4-HP	3-hidroksi-piridin-4-oni
CH_3COONa	natrijev acetat
DCC	*N*,*N'*-dicikloheksilkarbodiimid
DCM	diklormetan
DEAD	dietilazodikarboksilat
DHU	*N*,*N'*- dicikloheksilurea
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDC × HCl	*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimidhidroklorid
HP	hidroksipiridinoni
HCl	klorovodična kiselina
H_2SO_4	sumporna kiselina
H_2O_2	vodikov peroksid

m	eng. *meta*
NaOH	natrijev hidroksid
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
p	eng. *para*
p-TsOH	*p*-toluensulfonska kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
t.t.	temperatura taljenja
TEA	trietilamin
THF	tetrahidrofuran
UV	eng. *ultraviolet* (ultraljubicasto)
TLC	eng. *thin layer chromatography*