

Sinteza kvaternih soli N-acihidrazinskih derivata heterocikličkih spojeva

Horvat, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:182:617128>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Ana Horvat

**Sinteza kvaternih soli *N*-acilhidrazinskih derivata
heterocikličkih spojeva**

Diplomski rad



Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju


Diplomski studij kemije

Ana Horvat

**Sinteza kvaternih soli *N*-acilhidrazinskih derivata
heterocikličkih spojeva**

Diplomski rad



Mentorica:  prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentorica: prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Sinteza kvaternih soli *N*-acilhidrazinskih derivata heterocikličkih spojeva

Ana Horvat

Rad je izrađen na: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

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

Sažetak:

Zbog svoje važne biološke aktivnosti promatran je i ispitan vitamin B₆ i njegovi derivati. Važnost vitamina B₆ očituje se u normalnom funkcioniranju živčanog sustava te normalnom funkcioniranju metabolizma lipida, glukoze, aminokiselina. Bitnu ulogu ima i u brojnim enzimskim aktivnostima. Molekula piridoksala pruža široke mogućnosti za kemijske modifikacije i pripremu derivata sa značajnim farmakološkim djelovanjem. U radu se pripremljeni derivati piridoksala hidroklorida. Prvo su sintetizirani *N*-acilhidrazoni (**1-8**), reakcijom piridoksala sa *N*-acilhidrazinima aromatskih i heteroaromatskih spojeva. Reakcije su rađene klasičnim putem, miješanjem u etanolu na sobnoj temperaturi 24 sata. U drugom dijelu rada se dobiveni hidrazoni kvaterniziraju s ciljem dobivanja kvaternih soli. Za kvaternizaciju se koriste fenacil-bromidi i substituirani fenacil-bromidi. Sinteza se izvodi klasičnim putem, miješanjem i zagrijavanjem pri temperaturi refluksa otapala. Svi dobiveni spojevi su pročišćeni i snimljeni su im IR, MS, ¹H i ¹³C NMR spektri, te im je određena temperatura tališta.

Diplomski rad obuhvaća: 47 stranica, 38 slika, 2 tablice, 23 literaturna navoda i 24 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: vitamin B₆, hidrazoni, *N*-acilhidrazini, kvaterne soli

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Marija Jozanović, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, komentorica i članica
4. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

Josipa Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

Synthesis of quaternary salts of *N*-acylhydrazone derivatives of heterocyclic compounds

Ana Horvat

Thesis completed at: Faculty of Food Technology Osijek

Supervisor: Martina Šrajcer Gajdošik, Associate Prof., PhD

Technical assistance: Dajana Gašo-Sokač, Prof., PhD

Abstract:

Because of its important biological activity, vitamin B₆ and its derivatives have been observed and investigated. The importance of vitamin B₆ is manifested in the normal functioning of the nervous system and the normal functioning of the metabolism of lipids, glucose, and amino acids. It also plays an important role in numerous enzymatic activities. The pyridoxal molecule offers wide possibilities for chemical modifications and the preparation of derivatives with significant pharmacological activity. Pyridoxal hydrochloride derivatives are prepared in this work. First, *N*-acylhydrazones (**1-8**) were synthesized, by reacting pyridoxal with *N*-acylhydrazines of aromatic and heteroaromatic compounds. The reactions were carried out in the classic way, by stirring in ethanol at room temperature for 24 hours. In the second part of the work, the obtained hydrazones are quaternized with the aim of obtaining quaternary salts. Phenacyl bromides and substituted phenacyl bromides are used for quaternization. The synthesis is carried out in the classical way, by mixing and heating at the reflux temperature of the solvent. All obtained compounds were purified and their IR, MS, ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded, and their melting point was determined.

Thesis includes: 47 pages, 38 figures, 2 tables, 23 references and 24 appendices

Original in: Croatian

Keyword: vitamin B₆, hydrazones, *N*-acylhydrazines, quaternary salts

Thesis accepted:

Reviewers:

1. assist. prof. Marija Jozanović, PhD; chair
2. assoc. prof. Martina Šrajcer Gajdošik, PhD; supervisor and member
3. prof. Dajana Gašo-Sokač, PhD; co-supervisor and member
4. assoc. prof. Elvira Kovač-Andrić, PhD; substitute member

Thesis deposited in: Library of Department of Chemistry, Kuhačeva 20, Osijek

ZAHVALE

Veliko HVALA mojoj „ko“-mentorici, profesorici, prof. dr.sc. Dajani Gašo-Sokač na ukazanom povjerenju i prihvaćanju moje zamolbe za izradu diplomskog rada. Hvala na razumijevanju, trudu, odvojenom vremenu, pomoći, korisnim savjetima. Hvala na odličnoj atmosferi u labosu i još boljem radnom okruženju. Hvala na prenesenom znanju i strasti za organsku kemiju.

Hvala doc. dr. sc. Valentini Bušić na savjetima i pomoći tijekom izrade diplomskog rada, hvala na odličnoj atmosferi i druženjima.

Hvala Dori Zobundžiji na pomoći za snalaženje u labosu, hvala na svim odgovorima na moja pitanja.

Hvala dr. sc. Sunčici Roca sa Instituta Ruđer Bosković na snimljenim spektrima naših sintetiziranih spojeva.

Hvala mojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene tijekom studiranja i bili mi podrška.

I na kraju, hvala mojim roditeljima, sestrinici i dečku koji su me bodrili i poticali da ostvarim svoje snove. Hvala Vam na ljubavi, snalaganju (za koje znam da je ponekad trebalo u većoj mjeri), potpori.



Hvala Vam

Ana Horvat

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Vitamin B ₆ i derivati	2
2.2. Hidrazini i hidrazoni	4
2.3. Biološko djelovanje hidrazona.....	7
2.4. Kvaterne soli	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali i metode.....	14
3.2. Priprava <i>N</i> -acilhidrazonskih derivata piridoksal-hidroklorida (1-8)	16
3.3. Priprava kvaternih soli nekih <i>N</i> -acilhidrazonskih derivata piridoksal-hidroklorida.	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
5. ZAKLJUČCI	25
6. LITERATURA	26
7. PRILOZI.....	28
8. ŽIVOTOPIS	40



1. UVOD

Zbog važnog biološkog djelovanja, vitamin B₆ se već dugi niz godina intenzivno istražuje. Osim što je jedan od vitamina iz skupine vitamina B-kompleksa, koji su nužni za normalno funkcioniranje živčanog sustava, vitamin B₆ potreban je za normalno funkcioniranje metabolizma lipida, glukoze te aminokiselina, a bitan je i u brojnim enzimskim aktivnostima. U kontekstu važnosti vitamina B₆ kemičari su usmjerili napore u sintezu različitih strukturno modificiranih derivata vitamina B₆ i ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Različiti derivati dobiveni su reakcijom piridoksala s amino skupinama odgovarajućih prekursora.

Reakcijom hidrazida s molekulom piridoksala nastaju hidrazoni. Hidrazoni su organski spojevi s C=N dvostrukom vezom, važni u dizajnu aktivnih farmaceutskih lijekova koji imaju različita farmakološka djelovanja. Posjeduju potencijalno antimikrobno, antimalarijsko, antivirusno, antihelmintičko, antifungalno i antikancerogeno djelovanje.

Cilj diplomskog rada bio je sinteza derivata piridoksala reakcijom piridoksala s *N*-acilhidrazinima aromatskih i heteroaromatskih spojeva. Nakon uvođenja *N*-acilhidrazinske skupine u molekulu, u sljedećem stupnju sinteze cilj je bio pripremiti kvaterne soli reakcijom pripremljenih hidrazona s fenacil-bromidom i supstituiranim fenacil-bromidima.

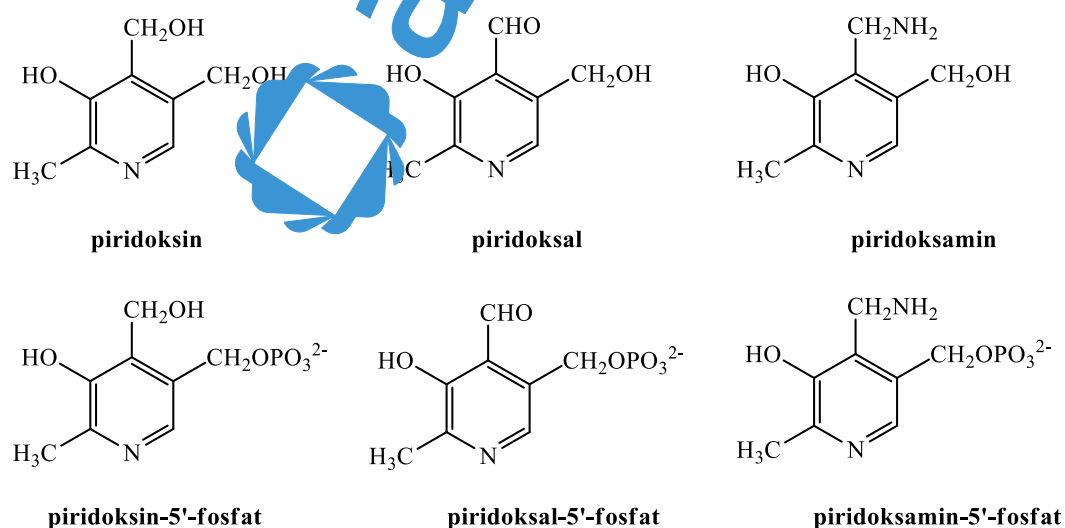
Izbor funkcijskih skupina temeljen je na širokom spektru bioloških aktivnosti spojeva slične strukture i funkcijskih skupina.

Nakon sinteze spojeva je određeno talište, te struktura potvrđena spektroskopskim metodama IR, MS, ¹H i ¹³C NMR.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vitamin B₆ i derivati

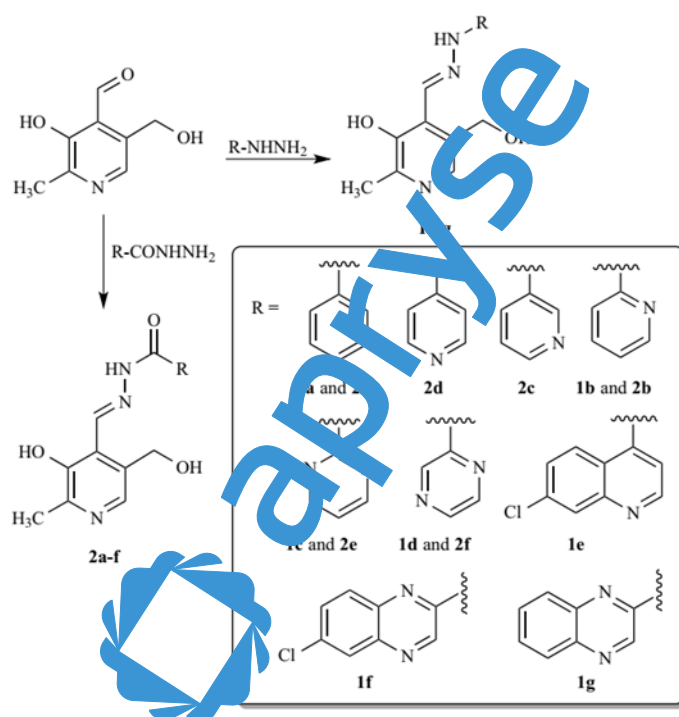
Izraz vitamin B₆ odnosi se na skupinu šest spojeva, piridoksin (PN), piridoksal (PL) i piridoksamin (PM), te njihove fosforilirane oblike, **Slika 1**, među kojima je piridoksal-5'-fosfat (PLP) najvažniji i najaktivniji oblik koji djeluje kao kritični kofaktor. Ovaj spoj (PLP) je uključen u ekspresiju gena, metabolizam i funkciju lipida, aminokiselina i glukoze, sintezu hemoglobina te sudjeluje u različitim enzimskim aktivnostima (dekarboksilacija, deaminacija, transaminacija). Piridoksal (PL) je također uključen u sintezu nekoliko važnih neurotransmitera. Vitamin B₆ nalazi se u raznim namirnicama kao što su banane, govedina, krumpir, orašasti plodovi, riba i žitarice.[1,2] Sisavci nemaju sposobnost provođenja *de novo* sinteze vitamina B₆ i stoga ga moraju uzimati iz prehrane. Biljke, koje mogu sintetizirati vitamin B₆, predstavljaju glavni izvor vitamina B₆ u prehrani većine sisavaca. U biljkama se vitamin B₆ sintetizira izravno kao (PLP) reakcijom kataliziranom PLP-sintazom. Najveće zalihe vitamina B₆ u tijelu nalaze se u skeletnim mišićima, a to čak 70-80% ukupnog vitamina B₆, najčešće vezanog za glikogen-fosforilazu. Simptomi nedostatka su anemija, dermatitis, slabost, nesаница, konvulzije, ljuskave usne ranice u kutevima usana, razdražljivost. Nedostatak mijenja metabolizam magnezija i kalcija, te ometa sintezu vitamina B₃. Nedostatak vitamina B₆ u razvijenim zemljama je rijedak.[3]



Slika 1. Skupina vitamina B₆

Važna je činjenica da vitamin B₆ stupa u interakciju s oko trideset pet komercijalno dostupnih lijekova, ometajući metabolizam. Ove interakcije uzrokuju inaktivaciju oba spoja, a temelje se na reakciji između PLP-a i lijeka, pri čemu nastaje Schiffova baza. Općenito

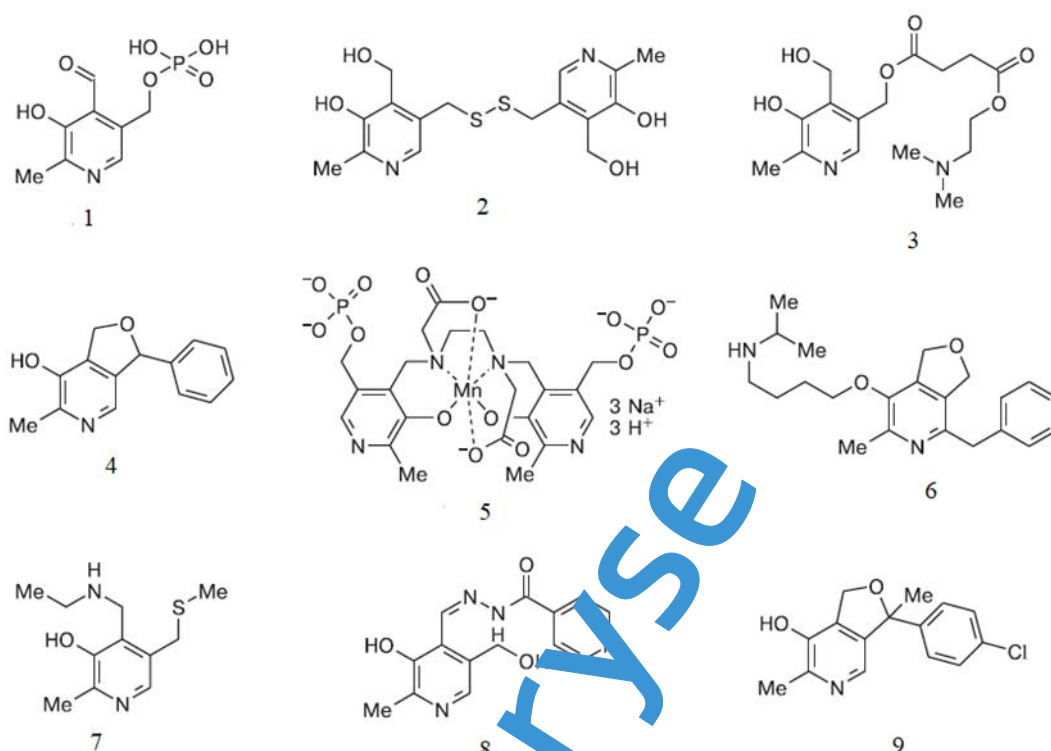
Schiffove baze su vrlo značajne zbog svoje strukture i funkcionalnosti u medicinskoj kemiji i koriste se u bioanorganskoj kemiji kao ligandi za kompleksiranje s metalima. S obzirom na važnost vitamina B₆, jedan od ciljeva koje su si zadali Nogueira i suradnici[1] bio je sintetizirati njegove derivate i provesti biološko ispitivanje antituberkuloznog djelovanja (TB). Priredili su hidrazone i *N*-acilhidrazone derivate piridoksala i različitih heteroaromatskih hidrazina i *N*-acilhidrazina. **Slika 2.** Izbor funkcijskih skupina temeljio se na širokom spektru bioloških aktivnosti u liječenju različitih bolesti. Na temelju odnosa aktivnosti i strukture (*engl. Structure-activity relationship (SAR)*) autori su zaključili da najbolju antituberkuloznu aktivnost ima *N*-acilhidrazon koji ima dušik u *para*-položaju (**2d**).[1,2]



Slika 2. Sinteza derivata hidrazona i *N*-acilhidrazona[1]

Zbog svoje povoljne biološke aktivnosti vitamin B₆ se intenzivno istražuje, a posebna pažnja je usmjerena na sintezu derivata koji bi se mogli primijeniti u liječenju brojnih bolesti. No, unatoč kontinuiranom istraživanju već osam desetljeća i ogromnom farmakološkom potencijalu derivata vitamina B₆, relativno su skromni praktični rezultati i primjena. Razlozi tome su multifunkcionalnost molekule piridoksina koja otežava usmjerene sintetske modifikacije. Nadalje, važnost vitamina B₆ u organizmu proizlazi iz njegovih strukturnih i funkcionalnih svojstava, stoga i najmanje modifikacije strukture mogu potpuno uništiti njegove biološke funkcije i dovesti ili do potpunog gubitka aktivnosti ili do pojave neželjenih

svojstava. Samo su neki derivati do sada našli kliničku primjenu, odobreni su kao lijekovi (1, 2, 3, 4) ili se nalaze u finalnim fazama kliničkih ispitivanja(6, 7, 8, 9). **Slika 3** [4]

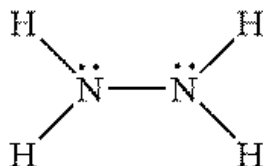


Slika 3. Derivati piridoksina [4]

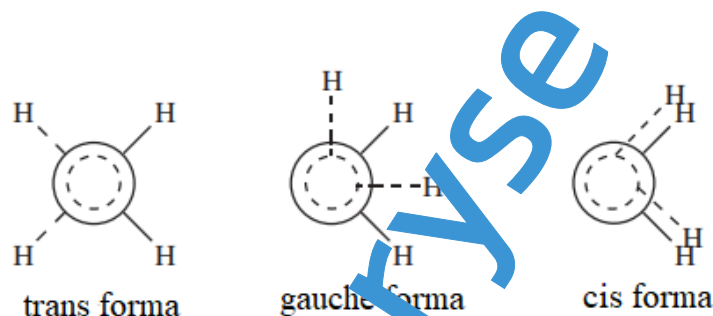
2.2. Hidrazini i hidrazoni

Hidrazin (diamin N_2H_4) je bezbojna, otrovna, kancerogena i eksplozivna tekućina s mirisom na amonijak koja se obično koristi u vodenoj otopini (hidrazin-hidrat) **Slika 4**. Hidrazin ima široku primjenu u sintezi lijekova, herbicida, služi kao sredstvo za redukciju, izvor je energije u gorivim ćelijama i raketnim pogonima, sredstvo za ekspaniranje polimera. Gorive ćelije s hidrazinom su vrlo učinkovite, ali nažalost troškovi proizvodnje hidrazina otežavaju njegovu komercijalnu primjenu u gorivim ćelijama, unatoč činjenici da je energija koja se oslobađa oksidacijom hidrazina znatno veća od energije većine drugih goriva.[5] Prvi ga je pripremio 1887. Curtius kao sulfatnu sol iz diazoocetnog estera. Thiele je predložio da bi oksidacija amonijaka s hipokloritom trebala dati hidrazin, a nešto kasnije Raschig je demonstrirao ovaj proces, čije varijacije predstavljaju glavne komercijalne metode proizvodnje u 1990-ima. Hidrazin je također dobar ligand, te su zbog toga

proučavani njegovi brojni kompleksi. Hidrazin ima *gauche* (kosu) konformaciju, **Slika 5**, tj. jedna NH₂ skupina je rotirana iz *cis* ili *trans* položaja. Duljina N-N veze je 0,145 nm, a vezni kut N-N-H je 112°, što ukazuje na *sp*³ hibridizaciju. Usamljeni elektronski parovi nalaze se u hibridnim *sp*³ orbitalama i izvor su bazičnog i nukleofilnog karaktera molekule hidrazina.[7]

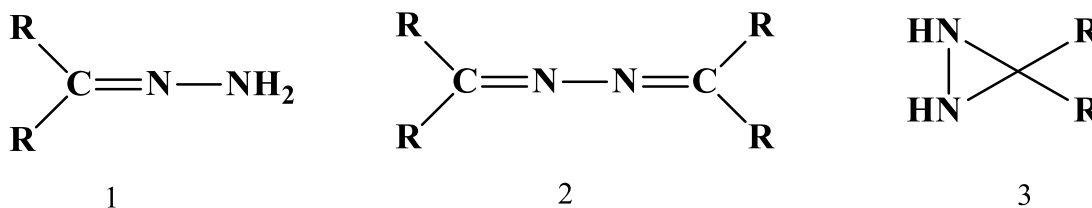


Slika 4. Struktura hidrazina^[6]



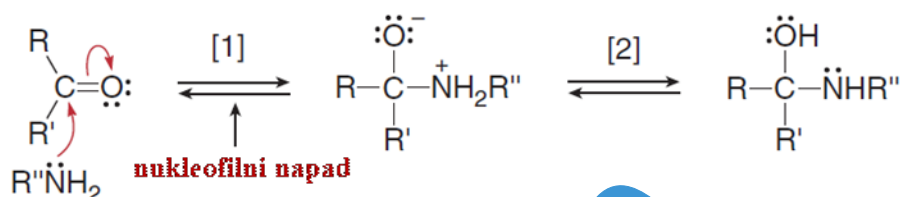
Slika 5. Konformacije hidrazina^[7]

Hidrazini reagiraju s aldehidima i ketonima dajući hidrazone (1), azine (2) i diaziridine (3), kasnije poznate kao izohidrazoni. **Slika 6.** Hidrazoni imaju strukturu R₁R₂C=NNH₂ i srodni su ketonima i aldehidima u kojima je kisik zamijenjen NNH₂ skupinom. Hidrazoni nastaju iz mono- i *N,N*-disupstituiranih hidrazina. Lakoća stvaranja hidrazona ovisi o prirodi karbonilnog spoja; aldehidi > dialkil ketoni > alkilaril ketoni > diaril ketoni. Hidrazoni nastaju reakcijom hidrazina ili hidrazida s aldehidima i ketonima, a mogu se pripraviti i *Japp-Klingemannovom reakcijom*. [7,8,9]



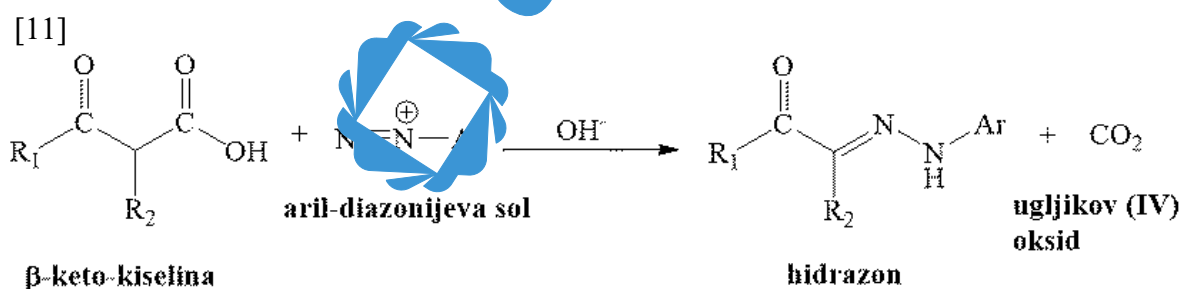
Slika 6. Struktura hidrazona (1), azina (2) i diaziridina (3)^[7]

Formiranje, između ostalog, hidazona, oksima, semikarbazona, tiosemikarbazona, fenilhidazona i Schiffovih baza odvija se uz napad nukleofilnog reagensa u blago kiselim uvjetima. (*Shema 1.*) Ovaj korak je općenito podložan i općoj kiseljoj i specifičnoj kiseljoj katalizi za slučajeve slabo bazičnih amina, ali je neosjetljiv na takvu katalizu kada je nukleofil jako bazičan. Pod neutralnim ili bazičnim uvjetima, dehidracija karbinolamina postaje korak koji određuje brzinu. Ovaj korak je općenito podložan jakoj, kiseljoj katalizi iako se u nekim slučajevima također javljaju pH neovisni i bazno katalizirani procesi.[10]



Shema 1. Nastanak karbinolamina

Japp-Klingemannova reakcija služi kao alternativna metoda za pripremu arilhidazona. To je reakcija između β -ketokiselina ili β -ketoestera i aril diazonijevih soli. U prvom koraku reakcije dolazi do deprotoniranja β -ketokiselina ili estera, a potom do nukleofilnog napada nastalog enolatnog aniona na diazonijevu sol pri čemu nastaje intermedijerni azo-spoj. Nastali intermedijerni produkt se ne izolira, nego se u bazičnom mediju hidrolizira i raspada uz oslobađanje karboksilne kiseline ili ugljikovog dioksida. Nakon prijenosa protona iz nastale kiseline nastaje konačni produkt, hidrazon. (*Shema 2.*)



Shema 2. Japp-Klingemannova reakcija sa β -ketokiselinom[11]

Djeluju kao reaktanti u raznim važnim reakcijama kao što su jodiranje hidazona, *Shapirova reakcija* i *Bamford-Stevensova reakcija* stvaranja vinilnih spojeva. Djeluju kao intermedijeri u *Wolff-Kishnerovoj reakciji*. *N,N'*-dialkil hidrazone može se hidrolizirati, reducirati i oksidirati. Hidrazonski spojevi sa C=N dvostrukom vezom važni su u dizajnu lijekova jer djeluju kao ligandi za metalne komplekse, organokatalizu i sintezu organskih spojeva. C=N veza hidazona i krajnjeg atoma dušika koji sadrži slobodni par elektrona

odgovorna je za fizikalna i kemijska svojstva. Ugljikov atom u hidrazonu ima i elektrofilni i nukleofilni karakter, a oba dušikova atoma su nukleofilna, iako je amino tip dušika reaktivniji. Zbog praktičnosti atom dušika u azometinskoj skupini naziva se iminski dušik, a drugi atom aaminski dušik. Zbog ovih svojstava hidrazoni se široko koriste u organskoj sintezi.[7,8,9]

Najvažnije kod reaktivnosti hidrazona jest nukleofilnost ugljikovog atoma. Dušikov slobodni par čini ugljikov atom hidrazona bogatim elektronima tako da može djelovati kao nukleofil. To je uočeno prije više od sto godina. Stoga se reakcije poput *Mannichove reakcije*, reakcije spajanja i halogeniranja lako odvijaju na takvom ugljiku. Međutim, atom dušika hidrazona ostaje glavno mjesto za napad acilirajućih i alkilirajućih sredstava. Čini se da jači nukleofili napadaju prvenstveno atom dušika, dok slabiji napadaju prvenstveno atom ugljika.[12]

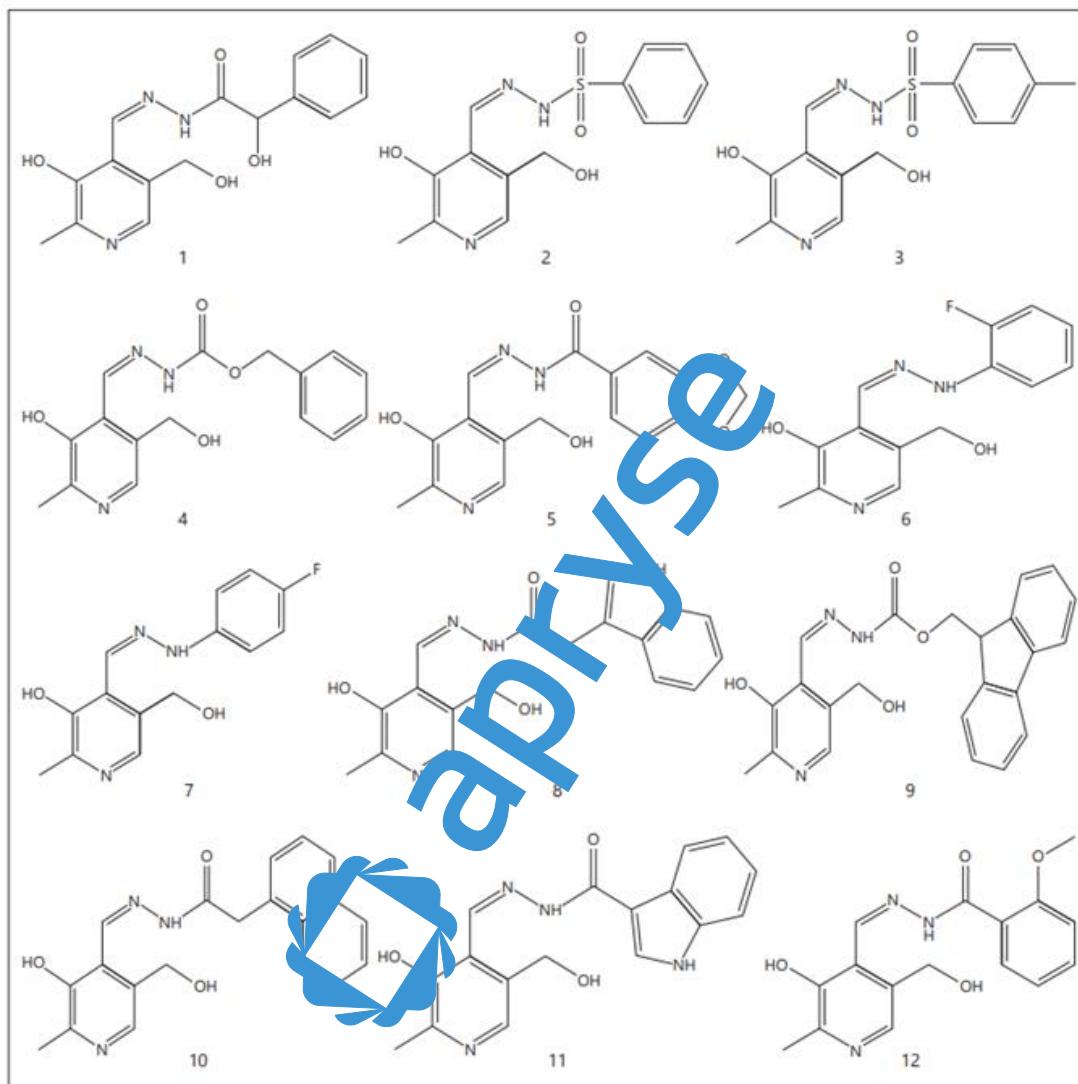
2.3. Biološko djelovanje hidrazona

Derivati hidrazona imaju važnu biološku aktivnost, a funkcijska skupina hidrazona nalazi se kao središnja struktura u mnogim kemoterapijskim agensima. Ovi spojevi posjeduju različita farmakološka svojstva, a među njima su antimikrobna, protuupalna, analgetska, antifungalna, antituberkulozna, antivirusna, antikancerogena, antitrombocitna, antimalarijska, antikonvulzivna, kardoprotektivna, antihelmintička, antiprotozoalna, itd. Pojavljujuća otpornost bakterija uzrokuje široko rasprostranjen problem u liječenju raznih infekcija. Stoga je potraga za antimikrobnim lijekovima posao bez kraja. U današnje vrijeme razvijeno je i procijenjeno antibakterijsko djelovanje niza derivata hidrazona. Istražuje se antibakterijsko djelovanje sekundarnih derivata, zatim određenih steroidnih hidrazina koji posjeduju *in vitro* antibakterijsko djelovanje. Također su se sintetizirali hidrazonski derivati imidazola i benzimidazola i ispitano je njihovo antibakterijsko djelovanje protiv brojnih sojeva bakterija. Palekar i suradnici[13], sintetizirali su različite derivate tiazolidinona koristeći hidrazin hidrat i procijenili njihovu *in vitro* antibakterijsku aktivnost.[13, 14, 15]

Mnogi su znanstvenici pisali o hidrazonima kao obećavajućim sredstvima protiv raka. Prema izvješćima, neki hidrazonski spojevi pokazuju antikancerogeno djelovanje putem različitih molekularnih mehanizama. Među njima je otkriveno da derivat tiazolhidrazona ima antikancerogenu moć putem apoptoze i autofagije. Znanstvenici su također proveli studije za nove lijekove protiv raka s kvaternim dušikom. Ove su studije otkrile da bi kationski naboj mogao igrati ulogu ne samo u interakciji s metom, već također može

povećati topljivost u vodi, propusnost stanične membrane i staničnu apsorpciju kod stanica raka.[15]

Chen i suradnici[16] su sintetizirali seriju piridoksal hidrazona i acilhidrazona, **Slika 7**, te su proučavali njihova antiangiogenetska svojstva i mehanizme djelovanja.

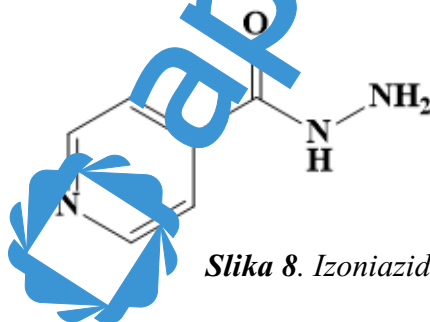


Slika 7. Strukture 12 sintetiziranih derivata piridoksala[16]

Angiogeneza se odnosi na stvaranje novih kapilara iz već postojećih krvnih žila i cirkulirajućih endotelnih prekursora. Ima vitalnu ulogu u opskrbi tkiva hranjivim tvarima i kisikom u različitim patofiziološkim stanjima uključujući rak i upale. Smatra se da je angiogeneza tumora važna za rast, invazivnost i metastaze malignih stanica. Proces angiogeneze reguliraju različite vrste stanica, citokini i signalni putovi. U ovoj studiji, piridoksal je korišten za reakciju s hidrazinom ili acilhidrazinom kako bi se dobili derivati piridoksal hidrazona ili acilhidrazona. Rezultati istraživanja pokazali su da spoj 10 ima optimalnu inhibitornu aktivnost na proliferaciju stanica CRL-2480 između 12 sintetiziranih

spojeva, s IC_{50} od 25,4 $\mu\text{mol/L}$ nakon 48 sati inkubacije. Osim toga, otkrili su da spoj 10 značajno utječe na vitalnost stanica nakon 48 sati liječenja po prvi put, što ukazuje da bi inhibitorni učinak spoja 10 mogao biti kroničan proces.[16]

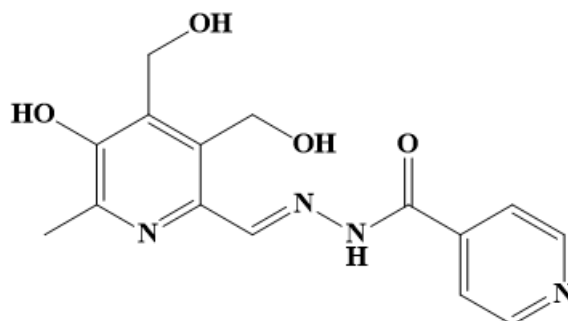
Shtyrlin i suradnici[17] sintetizirali su seriju izonikotinskih hidrazona piridoksina za koje su pretpostavljali da imaju određenu farmakološku aktivnost na *Mycobacterium tuberculosis*. Među svim zaraznim bolestima tuberkuloza (TB) je vodeći uzrok smrti. Procjenjuje se da je globalno 10 milijuna ljudi oboljelo od tuberkuloze u 2018. godini, broj koji je posljednjih godina relativno stabilan. Liječenje lijekovima najučinkovitiji je način liječenja tuberkuloze, ali otpornost na lijekove i dalje predstavlja prijetnju javnom zdravlju. Tijekom više od 70 godina liječenja tuberkuloze, ova infekcija je razvila ne samo sojeve tuberkuloze otporne na izoniazid, već i sojeve otporne na druge lijekove protiv tuberkuloze. Izoniazid, **Slika 8.**, sa svojim još uvijek jakim antibakterijskim učinkom treba smatrati nezamjenjivim lijekom koji treba poboljšati. Postoji nekoliko metoda kojima se to može postići. Najjednostavnija, ali ujedno i najučinkovitija, je pretvorba izoniazida u prolijekove, posebice u izonikotinoil hidrazone. Izonikotinski hidrazoni su podložni hidrolizi i to je osnova njihovog terapijskog učinka. U želuču u kiselom mediju ti se spojevi polako razgrađuju, oslobađajući izoniazid.



Slika 8. Isoniazid

To s jedne strane dovodi do duže prisutnosti malih (ali bakteriostatskih) koncentracija izoniazida u krvi i tkivima, a s druge strane smanjuje nuspojave na jetru. Prisutnost piridoksinog dijela u ciljnim strukturama omogućuje poboljšanje toksikološkog profila ciljnih proizvoda i smanjuje razvoj rezistencije mikobakterija na izoniazid. Smanjena toksičnost ciljanih izonikotinoil hidrazona u usporedbi s izoniazidom može biti posljedica ne samo „učinka usporenog oslobađanja“, već i utjecaja fragmenata piridoksina na neurotoksični učinak izoniazida. U radu Shtyrlina i suradnika^[17] je zaključeno da spoj 13, **Slika 9.** pokazuje dobru *in vitro* aktivnost protiv soja H37Rv *M. tuberculosis*. Ispitivanja citotoksičnosti spoja 13 na bubrežnim stanicama ljudskog embrija, ljudskoj jetri i stanicama pluća ljudskog embrija pokazala su da je 2-3 puta manje toksičan od izoniazida i 1,5-2 puta manje toksičan nego etambutol i moksifloksacin. Spoj 13 pokazao je slabo kompleksiranje

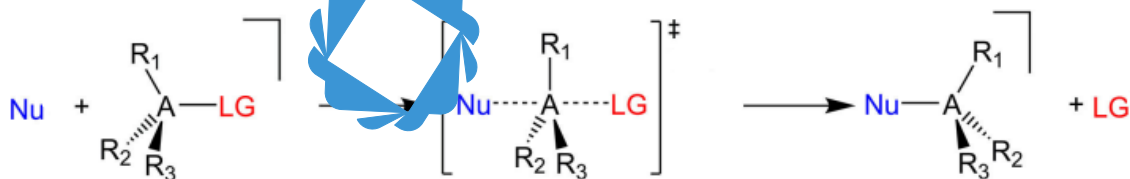
s Fe^{3+} ionima, nisku akutnu toksičnost ($\text{LD}_{50} > 2000 \text{ mg/kg per os}$ na miševima), te identičnu učinkovitost izoniazida i značajno bolju od etambutola i moksifloksacina u mišjem modelu. Sva ova otkrića čine ga obećavajućim kandidatom za budući razvoj lijekova.[17]



Slika 9. Struktura spoja 13 iz rada Shtyrlina i suradnika [17]

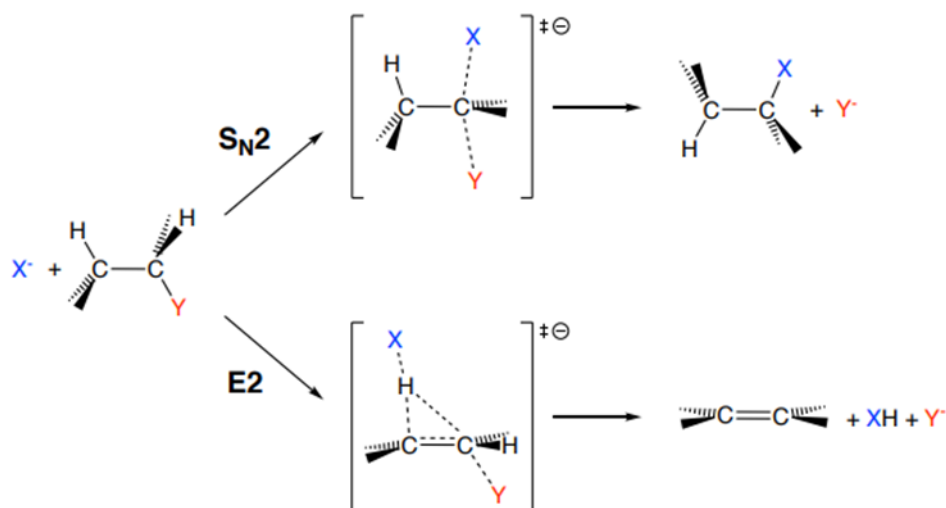
2.4. Kvaterne soli

Kvaterne soli heterocikličkih amina poput piperidina i njegovih homologa imaju širok raspon terapijskih učinaka i od četrdesetih godina 19. stoljeća koriste se kao antibakterijska i antikancerogena sredstva. Budući da reakcija nastanka takvih soli pripada reakciji bimolekularne nukleofilne supstitucije ($\text{S}_{\text{N}}2$), a iskorištenje ciljnog produkta i općenito na brzinu reakcije utječe struktura oba reaktensa. U ovom mehanizmu dolazi do istovremenog kidanja jedne veze i nastanka druge veze. **Shema 3.**



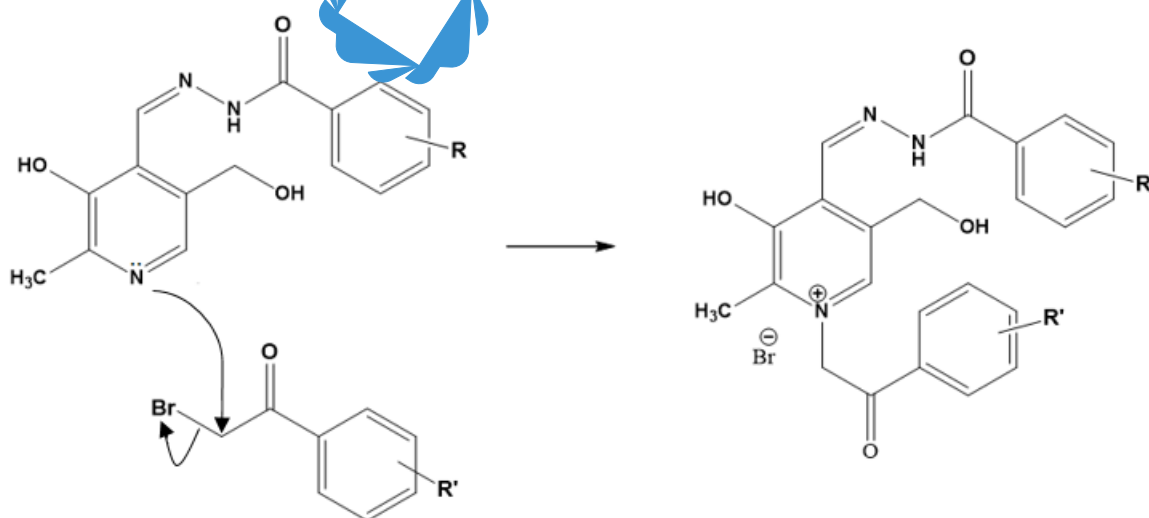
Shema 3. Općeniti mehanizam $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcije[19]

$\text{S}_{\text{N}}2$ supstitucija u konkurenciji je sa reakcijom eliminacije ($\text{E}2$). Dvije reakcije mogu međusobno biti jedna drugoj neželjeni put. Ovisno o uvjetima dešava se ili supstitucija ili eliminacija, nikad obje reakcije istovremeno. **Shema 4** [18, 19]



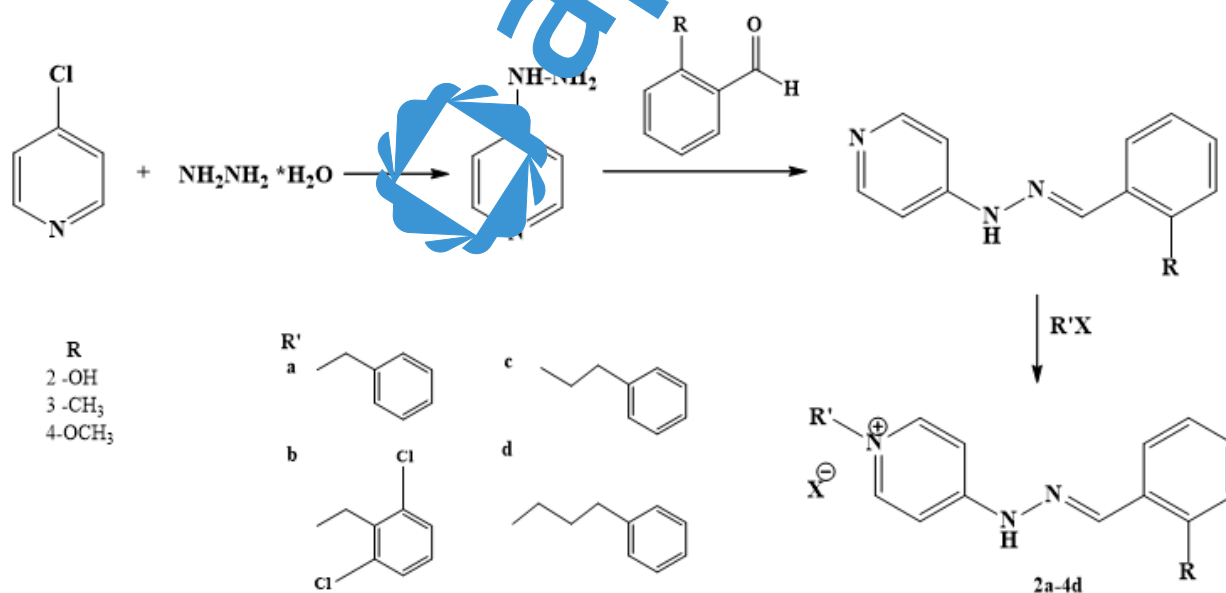
Shema 4. Razlika između S_N2 i $E2$ mehanizama [19]

Spojevi koji imaju dio kvaternih amonijevih soli široko se koriste kao bioaktivni agensi. Kvaterne amonijeve soli imaju značajnu ulogu u živim organizmima i obično se koriste za kontrolu rasta bakterija u kliničkim i industrijskim okruženjima. Kvaterne amonijeve soli također se koriste kao fungicidi, baktericidi, antiseptici i terapijska sredstva zbog svog izvrsnog antimikrobnog djelovanja. Alkili lanci koje imaju, olakšavaju njihov prijelaz kroz bio-membrane, a njihova dužina povećava lipofilnost lijeka. [20] **Shema 5** prikazuje mehanizam S_N2 reakcije na *N*-acilhidrazonima, gdje je cilj dobiti kvaterne soli koje potencijalno mogu imati povoljna farmakološka djelovanja.



Shema 5. Mehanizam stvaranja kvaternih soli na primjeru *N*-acilhidrazona

Već je ranije objavljeno da derivati kvaterniziranog amina pokazuju antimikrobna svojstva, a nekoliko mono- ili bis-kvaternih amonijevih spojeva, koji imaju različite duljine alkilnog lanca ili isti dugi alkilni lanac s različitim hidrofobnim supstituentima, također pokazuju antimikrobno djelovanje. Aktivnosti kvaternih amonijevih spojeva pripisane su njihovom učinku na staničnu stjenku što rezultira izravnim ili neizravnim smrtonosnim učinkom na vitalnost stanice. Antimikrobna aktivnost 1-alkilpiridinijevih soli ovisi o adsorpcijskim aktivnostima na površini bakterijskih stanica kao i o njihovom uništavanju i pKa vrijednostima odgovarajućih piridina. Čimbenici koji kontroliraju njihovu antimikrobnu aktivnost su molekularna hidrofobnost, sposobnost adsorpcije, površinska aktivnost i elektronska gustoća atoma amonijevog dušika. Ovi spojevi posjeduju jedan hidrofobni alkilni lanac i jednu hidrofilnu kvaternu dušikovu ionsku skupinu u istoj molekuli, što osigurava veću površinsku aktivnost i dublju antimikrobnu moć, u usporedbi s konvencionalnim antimikrobnim sredstvima. Alptüzin i suradnici[21] su na temelju ovih činjenica pripremili *orto*-, -metil-, -metoksil-, -hidroksil- i -benziliden-hidrazinilpiridinijeve soli s benzilnom, 2,6-diklorbenzilnom, 2-feniletilnom i 3-fenilpropilnom skupinom na piridinijevom dušiku kako bi se istražili učinci takvih strukturnih modifikacija kvaternarnih piridinijevih soli na očekivanu antimikrobnu aktivnost. Benziliden-hidrazinilpiridinijeve soli pripremili su u tri koraka. **Shema 6.**[21]



Shema 6. Sinteza piridinijevih soli[21]

U prvom koraku, 4-kloropiridin je refluksiran s hidrazin hidratom u 1-propanolu da se dobije 4-hidrazinilpiridin koji se zatim kondenzira s različitim supstituiranim aromatskim

aldehidima u etanolu na sobnoj temperaturi da se dobiju odgovarajući derivati hidrazona. U posljednjem koraku sinteze, ciljani spojevi dobiveni su kvaternizacijom derivata hidrazona s odgovarajućim supstituiranim alkil-halogenidima u etanolu pri temperaturi refluksa.[21]

Nova serija piridinijevih soli testirana je, i ispitivano je antimikrobno djelovanje prema gram-pozitivnim (*Staphylococcus aureus*) i gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Njihovo antibakterijsko djelovanje testirano je mjerenjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Prema rezultatima antimikrobnog djelovanja, utvrđeno je da svi spojevi imaju visoko antimikrobno djelovanje protiv *Staphylococcus aureus* i nisko antimikrobno djelovanje protiv *Pseudomonas aeruginosa*. Među testiranim spojevima, za **2d**, **3d**, **4d** je utvrđeno da su najaktivniji derivati protiv *Staphylococcus aureus*, koji su jednako učinkoviti protiv ovog mikroorganizma kao i standardni spoj ceftazidim. Rezultati su pokazali da što je duži bočni lanac spoja, to ima izraženije antimikrobno djelovanje.[21]



3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Korištene kemikalije i otapala bile su analitičke čistoće (*pro analysi*) te se nisu pročišćavale prije izvođenja sinteze. Sinteze su rađene klasičnim putem, zagrijavanjem pri temperaturi refluksa otapala uz miješanje na magnetskoj miješalici. *Slika 10.*

Tankoslojna kromatografija (TLC) izvodila se na pločicama silikagela, DC-Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV254 Macherey-Nagel, veličine 10 x 20 cm i debljine sloja 0,2 mm. Kromatogrami su se razvijali u smjesi otapala kloroform : metanol u omjeru 6:1 (v/v). Spojevi su detektirani pomoću UV lampe pri valnim duljinama 254 nm i 336 nm.

Tališta su određena na aparatu "Stuart Melting Point Apparatus SMP3" i nisu korigirana. IR spektri su snimljeni na uređaju FTIR Spectrometar Spectrum Two, PerkinElmer.

Spektri nuklearne magnetske rezonancije (NMR) snimani su na instrumentu Bruker AV300 spectrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) na Institutu Ruđer Bošković. Kemijski pomaci (δ /ppm) izraženi su prema DMSO (^1H , $\delta = 2,50$ ppm; ^{13}C $\delta = 39,51$ ppm) kao unutrašnjem standardu, a signali su označeni kao s-singlet, d-dublet, t-triplet, q-kvartet, m-multiplet, bs- široki signal.



Slika 10. Klasična sinteza

Korištene kemikalije u sintezi:

Piridoksal-hidroklorid; ($C_8H_9NO_3 \times HCl$), $M = 203,62 \text{ g/mol}$, $t_f = 173 \text{ }^\circ\text{C}$ (Aldrich)

4-fluorbenzohidrazid; ($C_7H_7FN_2O$), $M = 154,14 \text{ g/mol}$, $t_f = 162-166 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sigma-Aldrich)

4-klorbenzohidrazid; ($C_7H_7ClN_2O$), $M = 170,60 \text{ g/mol}$, $t_f = 162-165 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sigma-Aldrich)

4-metilbenzohidrazid; ($C_8H_{10}N_2O$), $M = 150,18 \text{ g/mol}$, $t_f = 116-118 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sigma-Aldrich)

4-nitrobenzohidrazid; ($C_7H_7N_3O_3$), $M = 181,15 \text{ g/mol}$, $t_f = 216 \text{ }^\circ\text{C}$ (Alfa Aesar)

Salicilohidrazid; ($C_7H_8N_2O_2$), $M = 152,15 \text{ g/mol}$, $t_f = 147-150 \text{ }^\circ\text{C}$ (Acros Organics)

Benzohidrazid; ($C_7H_8N_2O$), $M = 136,15 \text{ g/mol}$, $t_f = 113-117 \text{ }^\circ\text{C}$ (Acros Organics)

Nikotinohidrazid; ($C_6H_7N_3O$), $M = 137,14 \text{ g/mol}$, $t_f = 160-163 \text{ }^\circ\text{C}$ (Acros Organics)

Izonikotinohidrazid; ($C_6H_7N_3O$), $M = 137,14 \text{ g/mol}$, $t_f = 171-173 \text{ }^\circ\text{C}$ (Acros Organics)

2-bromacetofenon; (C_8H_7BrO), $M = 199,05 \text{ g/mol}$, $t_f = 43-45 \text{ }^\circ\text{C}$ (Acros Organics)

2,4-dibromacetofenon; ($C_8H_6Br_2O$), $M = 277,94 \text{ g/mol}$, $t_f = 107-111 \text{ }^\circ\text{C}$ (Acros Organics)

Natrijev hidrogenkarbonat; ($NaHCO_3$), $M = 84,01 \text{ g/mol}$, $t_{raspada} = 165 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gram Mol)

Aceton; (C_3H_6O), $M = 58,08 \text{ g/mol}$; $t_v = 55,75 - 56,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gram Mol)

Etanol; apsolutni; (C_2H_6O), $M = 46,07 \text{ g/mol}$; $t_v = 77-78,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gram Mol)

Kloroform; ($CHCl_3$), $M = 119,38 \text{ g/mol}$; $t_v = 61,2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gram Mol)

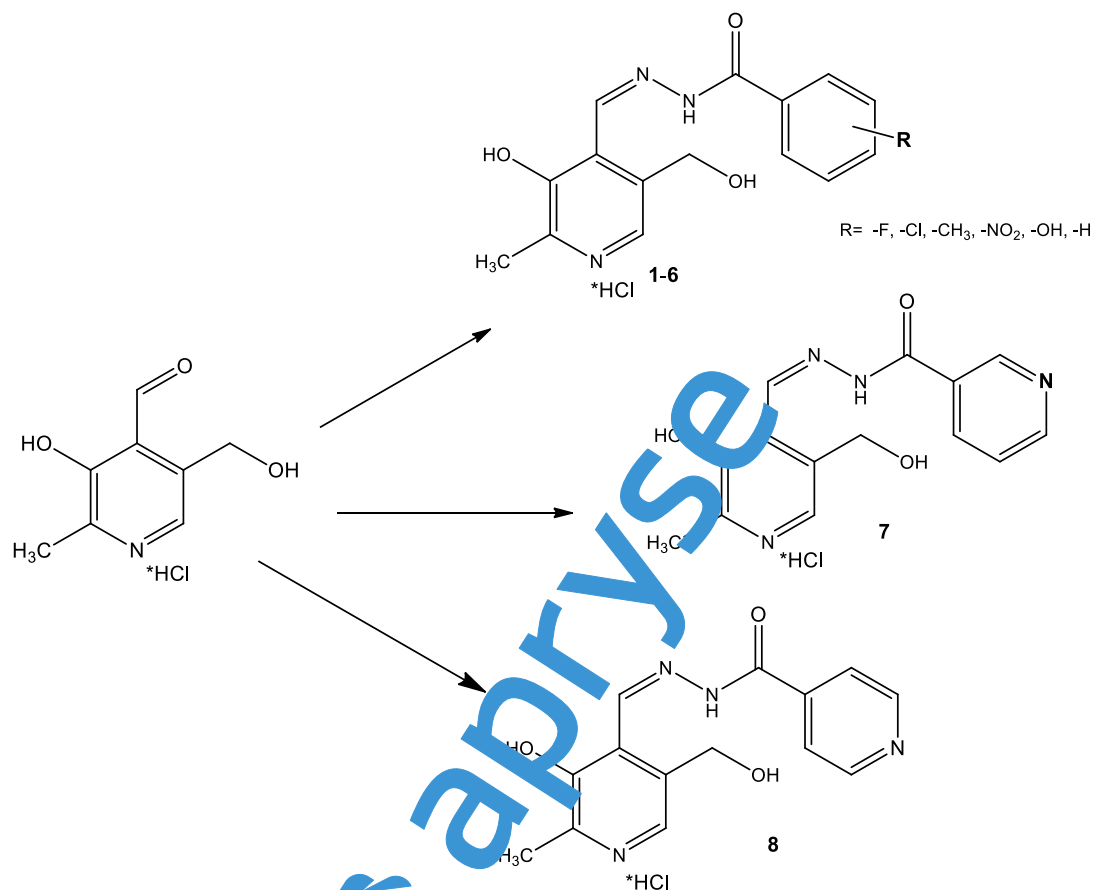
Metanol; (CH_4O), $M = 32,04 \text{ g/mol}$; $t_v = 64,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gram Mol)



3.2. Priprava *N*-acilhidrazonskih derivata piridoksal-hidroklorida (1-8)

Prva faza rada bila je priprava *N*-acilhidrazonskih derivata piridoksal-hidroklorida.

Shema 7.



Shema 7. Shema reakcije priprave N-acilhidrazonskih derivata piridoksal-hidroklorida

U okruglu tikvicu od 250 mL odvažuje se piridoksal-hidrochlorid, ulije 100 mL etanola i otopina miješa na magnetskoj miješalici sa miješajućim tijelom. U priređenu otopinu doda se odgovarajući aromatski ili heteroaromatski *N*-acilhidrazin (1,1 eq). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Nastanak produkta praćen je TLC kromatografijom, uz smjesu otapala kloroform : metanol (CHCl₃ : MeOH / 6:1). Dobiveni produkt koji se istaloži, odvoji se vakuum filtracijom. Dobiveni sirovi produkti isprani su hladnim etanolom i hladnim dietil-eterom te potom stavljeni na sušenje u eksikator. Nakon sušenja dobivenim spojevima određeno je talište, i struktura potvrđena snimanjem IR, ¹H i ¹³C NMR spektara.

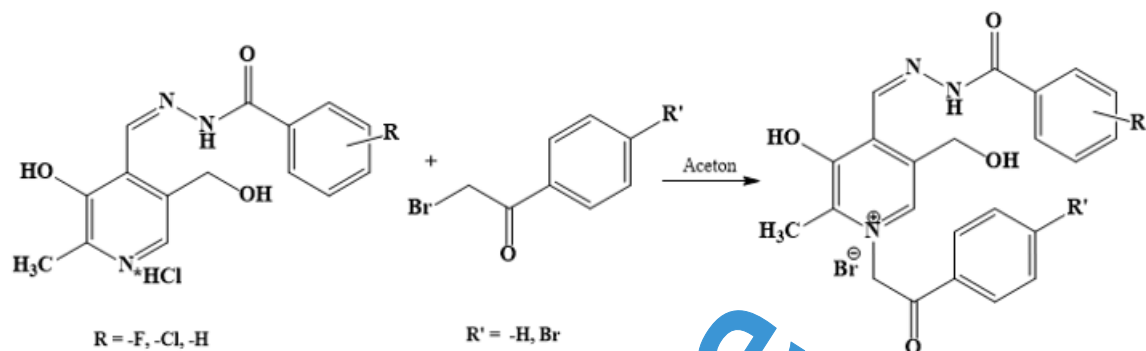
Tablica 1. Količine upotrijebljenih reaktanata za pripremu derivata 1-8

Reaktanti	n / mmol	Mr / gmol ⁻¹	m / grama
PIRIDOKSAL- HIDROKLORID	7,5	203,62	1,5
4-fluorbenzohidrazid	8,1	154,14	1,24
4-klorbenzohidrazid	8,1	170,60	1,38
4-metilbenzohidrazid	8,1	150,18	1,20
4-nitrobenzohidrazid	8,1	181,15	1,467
salicilohidrazid	8,1	152,15	1,23
benzohidrazid	8,1	136,15	1,10
nikotinohidrazid	8,1	127,14	1,10
izonikotinohidrazid	8,1	127,14	1,10



3.3. Priprava kvaternih soli nekih *N*-acilhidrazonskih derivata piridoksalhidroklorida

Druga faza rada bila je kvaternizirati dobivene derivate sa fenacil-bromidom i supstituiranim fenacil-bromidima. **Shema 8.**



Shema 8. Shema reakcije kvaternizacije

Postupak A

1 mmol sintetiziranog *N*-acilhidrazona (**1-8**) otopljen je u acetonu i potom u reakcijsku smjesu dodan NaHCO₃ (2 mmola) i 1 mmol 2-bromacetofenona ili 2,4-dibromacetofenona. Reakcijska smjesa se miješa pri temperaturi refluksa otapala 24 sata. Tijek reakcije praćen je TLC kromatografijom u smjesi otapala kloroform : metanol (6:1).

Postupak B

1 mmol sintetiziranog *N*-acilhidrazona (**1-8**) otopljen je u etanolu i potom u reakcijsku smjesu dodan NaOH (2 mmola) pri čemu dolazi do oslobađanja mjehurića zraka. U reakcijsku smjesu je potom dodan 1 mmol 2-bromacetofenona ili 2,4-dibromacetofenona. Reakcijska smjesa se miješa pri temperaturi refluksa otapala 24 sata. Tijek reakcije praćen je TLC kromatografijom u smjesi otapala kloroform : metanol (6:1). Dobiveni sirovi produkti odvojeni su vakuum filtracijom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog rada bio je pripremiti *N*-acilhidrazonske derivate piridoksalhidroklorida, a potom dobivene hidrazone prevesti u kvaterne soli reakcijom s fenacilbromidom i supstituiranim fenacilbromidima.

U prvom koraku uspješno su pripremljeni ciljani spojevi **1-8**, konvencionalnom sintezom u etanolu uz miješanje na sobnoj temperaturi prema proceduri Noguera i suradnika[22]. Iskorištenja reakcija bila su vrlo visoka od 80 do 98% **Tablica 2**. Dobiveni produkti žuto su do blijedo žuto obojene krutine. **Slika 11**.



Slika 11. Dobiveni spojevi **1-8**

Struktura spojeva potvrđena je IR, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. **Slike 15-38**.

3-fluor-*N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)mtilen)benzohidrazid (**1**)

^1H -NMR (DMSO- d_6) 2.63 (3H, s, CH₃-2); 4.77 (2H, s, CH₂-OH); 8.22 (1H, s, H-6); 9.10 (1H, s, H-7); 13.27 (1H, s, NH); 13.21 (1H, br s, OH-3); 8.15 (2H, dd, J = 8.79; 5.59 Hz, H-2'); 7.43 (2H, t, J = 8.79 Hz, H-3'); 7.43 (2H, t, J = 8.79 Hz, H-5'), 8.15 (2H, dd, J = 8.79; 5.59 Hz, H-6')

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) 15.1 (CH₃-2); 58.2 (CH₂-OH); 143.8 (C-2); 152.8 (C-3); 136.3 (C-4); 126.4 (C-5); 130.3 (C-6); 144.0 (C-7); 162.1 (C-10); 128.0 (d, 3 Hz) (C-1'); 130.9 (d, 9 Hz) (C-2'); 115.9 (d, 22 Hz) (C-3'); 164.8 (d, 251 Hz) (C-4'); 115,9 (d, 22 Hz)(C-5'); 130,9 (d, 9 Hz)(C-6'); -105.1 (F-4')

IR 1602 (C=O), 1552 (C=N)

3-klor-*N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid (2)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 2.64 (3H, s, CH₃-2); 4.78 (2H, s, CH₂-OH); 8.22 (1H, s, H-6); 9.10 (1H, s, H-7); 13.30 (1H, s, NH); 13.15 (1H, br s, OH-3); 8.09 (2H, d, J = 8.11 Hz, H-2'); 7.68 (2H, d, J = 8.34 Hz, H-3'); 7.68 (2H, d, J = 8.34 Hz, H-5'), 8.09 (2H, d, J = 8.11 Hz, H-6')

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 15.3 (CH₃-2); 58.2 (CH₂-OH); 144,1 (C-2); 152.6 (C-3); 136.1 (C-4); 126.0 (C-5); 130.9 (C-6); 144.4 (C-7); 162.2 (C-10); 130,2 (C-1'); 129.9 (C-2'); 128,9 (C-3'); 137,7 (C-4'); 128,9 (C-5'); 129,9 (C-6')

IR 1689 (C=O), 1539 (C=N)

***N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-metilbenzohidrazid (3)**

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 2.61 (3H, s, CH₃-2); 4.76 (2H, s, CH₂-OH); 8.21 (1H, s, H-6); 9.03 (1H, s, H-7); 12,99 (1H, s, NH); 13,15 (1H, br s, OH-3); 7,40 (2H, d, J = 7,84 Hz, H-2'); 7,95 (2H, d, J = 7,84 Hz, H-3'); 7,95 (2H, d, J = 7,84 Hz, H-5'), 7,40 (2H, d, J = 7,84 Hz, H-6'); 2,41 (3H, s, CH₃-4')

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 15.1 (CH₃-2); 58,1 (CH₂-OH); 143,6 (C-2); 152.6 (C-3); 136.1 (C-4); 126.2 (C-5); 130,5 (C-6); 144.0 (C-7); 162.9 (C-10); 128,6 (C-1'); 128,0 (C-2'); 129,7 (C-3'); 143,1 (C-4'); 129,3 (C-5'); 128,0 (C-6'); 21,1 (CH₃-4')

IR 1672 (C=O), 1545 (C=N)

***N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-nitrobenzohidrazid (4)**

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 2.60 (3H, s, CH₃-2); 4.76 (2H, s, CH₂-OH); 8.20 (1H, s, H-6); 9.06 (1H, s, H-7); 13,29 (1H, s, NH); 12,88 (1H, br s, OH-3); 8,26 (2H, d, J = 8,74 Hz, H-2'); 8,43 (2H, d, J = 8,59 Hz, H-3'); 8,43(2H, d, J = 8,59 Hz, H-5'), 8,26 (2H, d, J = 8,74 Hz, H-6')

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 15.8 (CH₃-2); 58.4 (CH₂-OH); 144,6 (C-2); 152.5 (C-3); 135,9 (C-4); 125,3 (C-5); 132,1 (C-6); 145,5 (C-7); 161,7 (C-10); 137,2 (C-1'); 129,5 (C-2'); 123,9 (C-3'); 149,8 (C-4'); 123,9 (C-5'); 129,5 (C-6')

IR 1695 (C=O), 1546 (C=N)

2-hidroksi-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid (5)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 2.64 (3H, s, CH₃-2); 4.79 (2H, s, CH₂-OH); 8.20 (1H, s, H-6); 9.12 (1H, s, H-7); 12,84 (1H, s, NH); 13,20 (1H, br s, OH-3); 11,59 (1H, br, s, OH-2'); 7,09 (1H, d, J = 8,16 Hz, H-3'); 7,48 (1H, t, J = 7,79, H-4'); 6,98 (1H, t, J = 7,79 Hz, H-5'), 7,96 (1H, d, J = 7,79 Hz, H-6')

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 15.1 (CH₃-2); 58.1 (CH₂-OH); 143,7 (C-2); 152.7 (C-3); 136,5 (C-4); 126,1 (C-5); 130,3 (C-6); 144,4 (C-7); 164,4 (C-10); 115,8 (C-1'); 158,3 (C-2'); 117,2 (C-3'); 134,5 (C-4'); 119,3 (C-5'); 129,5 (C-6')

IR 1671 (C=O), 1529 (C=N)

N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazid (6)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 2.62 (3H, s, CH₃-2); 4.77 (2H, s, CH₂-OH); 8.22 (1H, s, H-6); 9.07 (1H, s, H-7); 13,14 (1H, s, NH); 8,05 (2H, d, J = 7,38 Hz, H-2'); 7,59 (2H, t, J = 7,64 Hz, H-3'); 7,68 (1H, t, J = 7,38, H-4'); 7,59 (2H, t, J = 7,64 Hz, H-5'), 8,05 (2H, d, J = 7,38 Hz, H-6')

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 14,6 (CH₃-2); 58,1 (CH₂-OH); 143,3 (C-2); 152,9 (C-3); 136,7 (C-4); 126,8 (C-5); 131,3 (C-6); 143,7 (C-7); 163,1 (C-10); 129,4 (C-1'); 128,0 (C-2'); 128,7 (C-3'); 132,8 (C-4'); 128,7 (C-5'); 128,0 (C-6')

IR 1683 (C=O), 1540 (C=N)

N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)nikotinohidrazid (7)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) 2.64 (3H, s, CH₃-2); 4.78 (2H, s, CH₂-OH); 8.22 (1H, s, H-6); 9.15 (1H, s, H-7); 13,54 (1H, s, NH); 13,06 (1H, br, s, OH-3); 9,24 (1H, s, H-2'); 8,48 (1H, d, J = 7,99, H-4'); 7,67 (1H, dd, J = 7,93; 4,92 Hz, H-5'), 8,85 (1H, d, J = 4,74 Hz, H-6')

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) 14,8 (CH₃-2); 58.1 (CH₂-OH); 143,6 (C-2); 152.9 (C-3); 136,7 (C-4); 126,5 (C-5); 129,9 (C-6); 144,5 (C-7); 161,7 (C-10); 148,5 (C-2'); 127,6 (C-3'); 134,4 (C-4'); 124,0 (C-5'); 152,6 (C-6')

IR 1677 (C=O), 1560(C=N)

***N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)izonikotinohidrazid (8)**

¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆)	2.63 (3H, s, CH ₃ -2); 4.78 (2H, s, CH ₂ -OH); 8.21 (1H, s, H-6); 9.17 (1H, s, H-7); 13,58 (1H, s, NH); 8,87 (1H, d, J = 6,31 Hz, H-2'); 8,03 (1H, d, J = 5,89 Hz, H-3'); 8,03 (1H, d, J = 5,89 Hz, H-5'), 8,87 (1H, d, J = 6,31 Hz, H-6')
¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆)	15,0 (CH ₃ -2); 58.2 (CH ₂ -OH); 143,8 (C-2); 152.8 (C-3); 136,7 (C-4); 126,2 (C-5); 130,1 (C-6); 145,3 (C-7); 161,7 (C-10); 149,9 (C-2'); 122,0 (C-3'); 139,2 (C-4'); 122,0 (C-5'); 149,9 (C-6')
IR	1685 (C=O), 1547 (C=N)

Tablica 2. Iskorištenja reakcija sinteza *N*-acilhidrazona 1-8

Spoj	Kemijska formula	<i>M</i> /gmol ⁻¹	<i>t</i> /°C	Iskorištenje %
1	C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ O ₃	303,29	210-216	89,45
2	C ₁₅ H ₁₄ ClN ₃ O ₃	319,74	234-245	80,03
3	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₃	299,32	249-255	95,2
4	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₅	330,30	237-242	90,3
5	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₄	301,30	225-232	98,3
6	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₃	285,11	240-250 *111-113	97,45
7	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₃	286,29	238-247 *231-232 **235-236	93,80
8	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂	286,29	246-250 *217-219 **261-262	95,3

*[1], **[22]

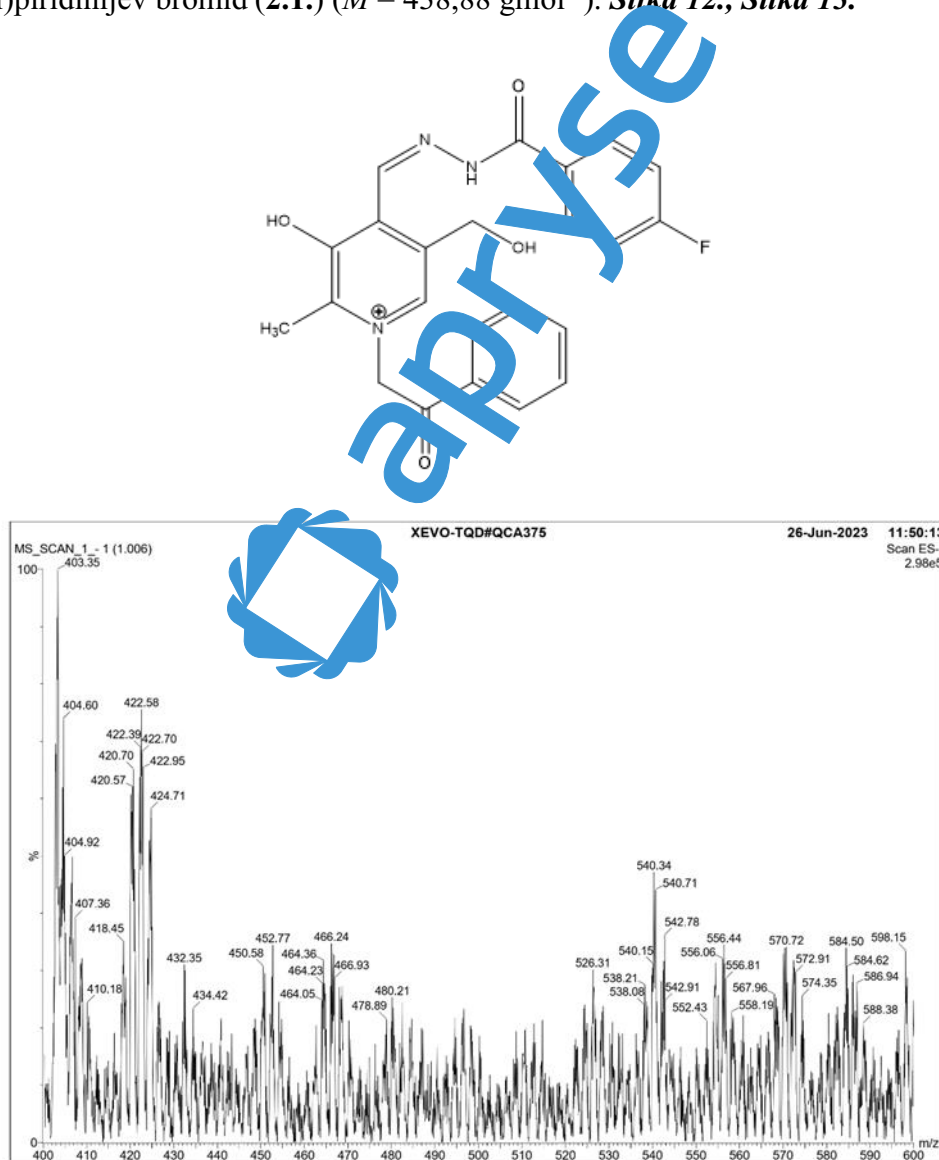
Spojeve **6**, **7**, **8** ranije su sintetizirali i Nogueira i suradnici[22], ali su iskorištenja u njihovom radu bila manja (79, 71 i 83 %) u odnosu na dobivena iskorištenja u ovom radu 96, 94 i 95 %. Uspoređena su tališta dobivenih spojevima s talištima iz literature [1, 22], ona se u određenoj mjeri razlikuju.

U IR spektrima jasno je vidljiva vrpca koja odgovara C=N dvostrukoj vezi u hidrazonima. Položaj vrpce C=N djelomično je posljedica suprotnih djelovanja induktivnih i rezonantnih utjecaja, kao i efekta sprege.

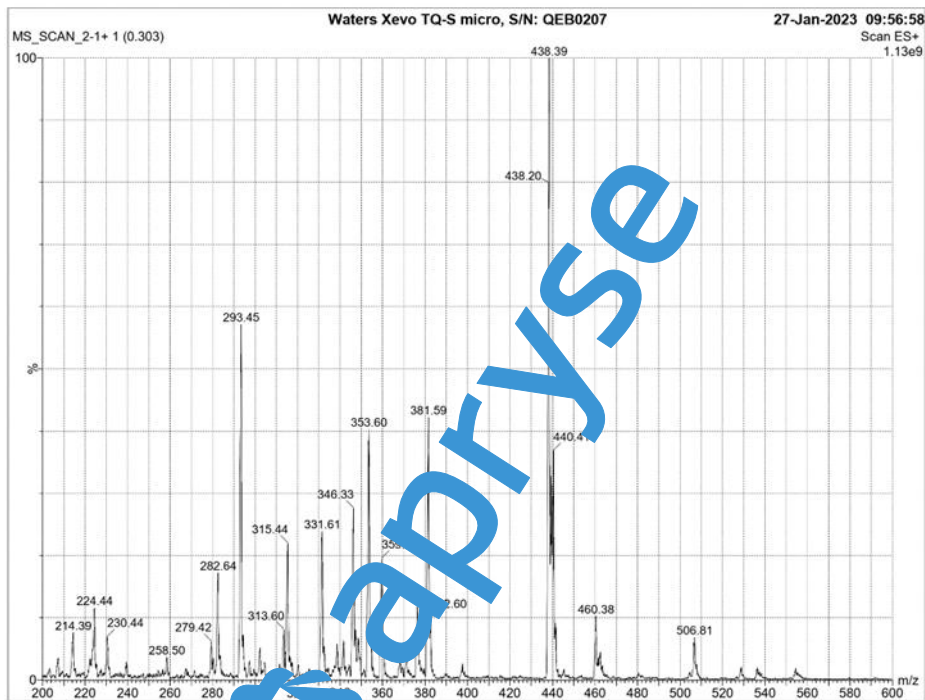
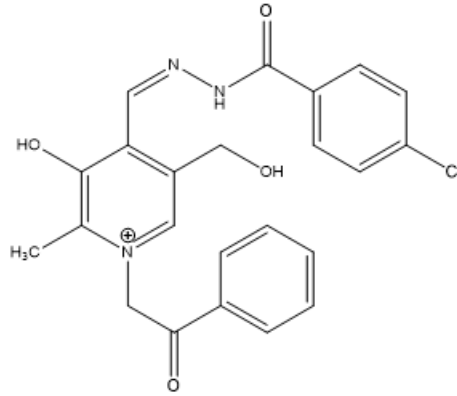
U drugom koraku sinteze cilj je bio pripremiti kvaterne soli priređenih *N*-acilhidrazonskih derivata piridoksal-hidroklorida (**1-8**). S obzirom da je riječ o solima s hidrokloridima, prvo je bilo potrebno ukloniti HCl i osloboditi nukleofilni dušik kako bi

mogao reagirati s 2-bromacetofenonom ili 2,4-dibromacetofenonom u reakciji nukleofilne supstitucije. Reakcije su rađene na dva načina, dodatkom NaHCO₃ ili dodatkom jače baze KOH. Dodatkom bilo soli bilo baze, dolazi do oslobađanja mjehurića zraka, a što je posljedica reakcije s HCl. Nakon uklanjanja HCl-a u reakcijsku smjesu se dodaje 2-bromacetofenon ili 2,4-dibromacetofenon. Pokušana je kvaternizacija svih priređenih spojeva **1-8**, tijekom reakcije praćen je TLC kromatografijom.

Na temelju MS spektra potvrđena je samo uspješna kvaternizacija spojeva **1** i **2**, i priprava kvaternih soli 4-((2-(4-florbenzoil)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-okso-2-feniletil)piridinijev bromid (**1.1.**) ($M = 422,4 \text{ g mol}^{-1}$) i 4-((2-(4-klorbenzoil)hidrazono)metil)-3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metil-1-(2-okso-2-feniletil)piridinijev bromid (**2.1.**) ($M = 438,88 \text{ g mol}^{-1}$). *Slika 12., Slika 13.*

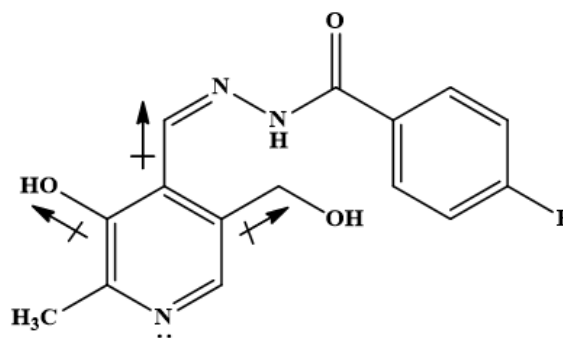


Slika 12. Struktura i MS spektar spoja 1.1



Slika 13. Struktura i MS spektar spoja 2.1

Ostale kvaterne soli nisu dobivene navedenim metodama sinteze. Pretpostavka je da supstituenti na piridinskom prstenu negativnim induktivnim efektom (-I) *Slika 14.* odvlače elektrone i na taj način smanjuju nukleofilnost dušika i otežavaju reakciju s 2-bromacetofenonima.



Slika 14. -I efekt skupina na piridinskom prstenu

5. ZAKLJUČCI

- ✓ Uspješno su pripremljeni *N*-acilhidrazonski derivati piridoksal hidroklorida **1-8**
- ✓ Iskorištenja reakcija bila su vrlo visoka, kretala su se od 80 do 98 %
- ✓ Strukture priređenih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom
- ✓ Prisutnost odgovarajućih funkcijskih skupina potvrđena je IR spektroskopijom
- ✓ Pokušane su sinteze svih kvaternih soli dobivenih derivata **1-8** pri čemu su korištena dva postupka koji se razlikuju u načinu na koji se uklanja HCl vezana na dušik piridinskog prstena (NaHCO_3 ili KOH)
- ✓ Zbog smanjenje reaktivnosti dušika u prstenu, reakcije su bile samo djelomično uspješne i sintetizirane su samo dvije kvaterne soli **1.1.** i **2.1.**
- ✓ Pretpostavljena struktura spojeva **1.1.** i **2.1.** potvrđena je snimanjem spektara masa

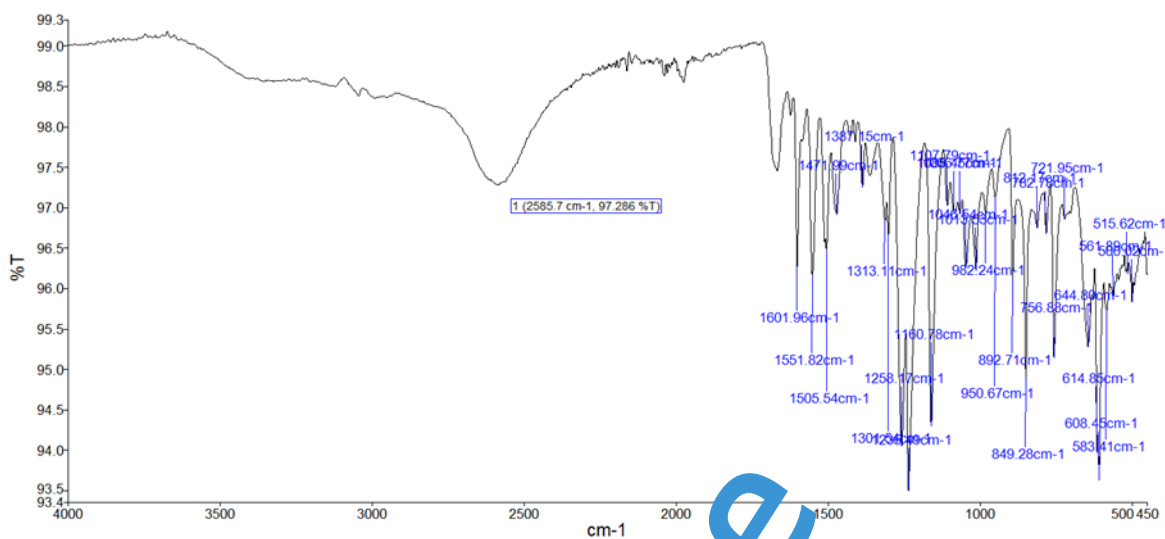


6. LITERATURA

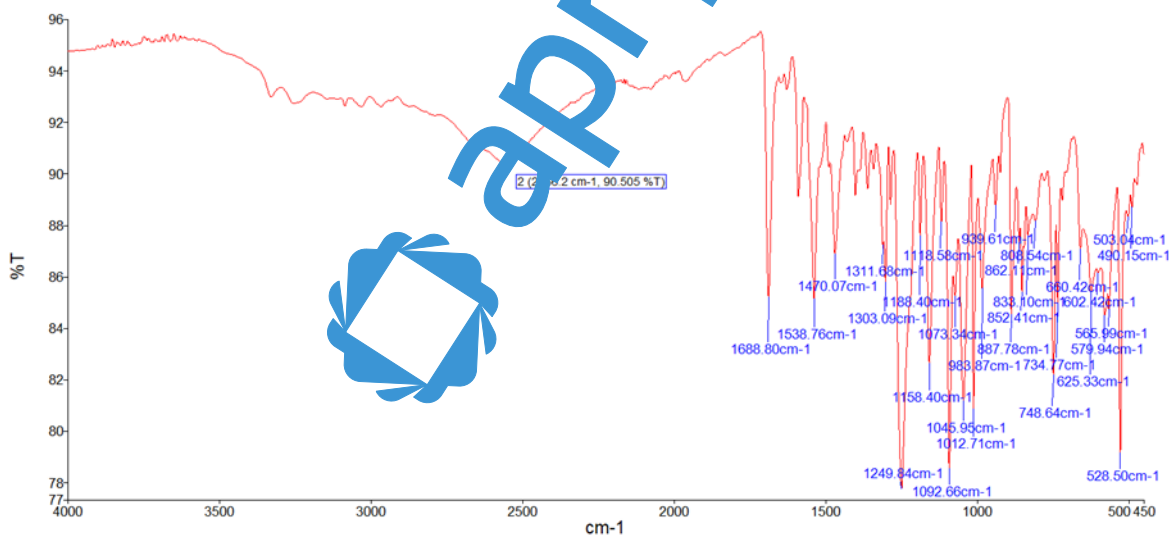
1. T. C. Mendonça Nogueira, L. dos Santos Cruz, M. C. Lourenço and M. V. N. de Souza, Design, Synthesis and Anti-tuberculosis Activity of Hydrazones and *N*-acylhydrazones Containing Vitamin B₆ and Different Heteroaromatic Nucleus, *Letters in Drug Design & Discovery*, 16 (2019), 792-798
2. G. A. Gamov, A. N. Meshkov, M. N. Zavalishin et al., Binding of pyridoxal, pyridoxal 5'-phosphate and derived hydrazones to bovine serum albumin in aqueous solution, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 233 (2020.), 118165
3. V. R. da Silva, J. F. Gregory, *Present Knowledge in Nutrition (Eleventh Edition)*, Academic Press, United States, 2020, 225-237
4. Y. G. Shtyrlin, A. S. Petukhov, A. D. Strelnik, N. V. Shtyrlin et al., Chemistry of pyridoxine in drug design, *Russian Chemical Bulletin (International Edition)*, 68 (2019), 911-945
5. H. Hayashi, Hydrazine Synthesis by a Catalytic Oxidation Process, *Catalysis Reviews*, 32(1990.), 229–277
6. Graham Solomons T. W., Fryhle Craig E., *Organic chemistry*, 10. Edition
7. E. F. Rothgery, Hydrazine and its Derivates, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 13 (2004.), 562-600
8. Md. Rahmat Ali, Akranth Marudh, Md. Tauquir Alam, et all., Review of biological activities of hydrazones, *Indonesian J. Pharm.*, 23 (2012.), 193-202
9. Yu.P. Kitaev, B.I. Buzykin, and T.V. Troepol'skaya, The Structure of Hydrazones, *Russian Chemical Review*, 39 (1970.), 441-452
10. L. Do Amaral, M. P. Bastos, Kinetics and mechanism for benzaldehyde phenylhydrazone formation. *The Journal of Organic Chemistry*, 36(1971.), 3412–3417
11. J. J. Li, *Name Reactions*, Springer, Cham, United States (2014). 331–332.
12. G. Uppal, S. Bala, S. Kamboj, M. Saini, Therapeutic Review Exploring Antimicrobial Potential of Hydrazones as Promising Lead, *Der Pharma Chimica*, 3 (2011.), 250-268
13. G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, et all., A review exploring biological activities of hydrazones, *J Pharm Bioallied Sci.*, 6 (2014), 69-80

14. S. Parlar, Y. Erzurumlu, R. Ilhan, E. Erciyas, et al., Synthesis and Evaluation of Pyridinium-Hydrazone Derivatives as Potential Antitumoral Agents, *Chemical Biology & Drug Design*, 92 (2018.), 1198–1205
15. V. S. Palekar, A. J. Damle, S. R. Shukla, Synthesis and antibacterial activity of some novel bis-1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazoles and bis-4-thiazolidinone derivatives from terephthalic dihydrazide, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2009.), 5112-5116
16. X. Chen, H. Li, H. Luo, Z. Lin, W. Luo, Synthesis and Evaluation of Pyridoxal Hydrazone and Acylhydrazone Compounds as Potential Angiogenesis Inhibitors, *Pharmacology*, (2019.), 1-14
17. N. V. Shtyrlin, R. M. Khaziev, V. G. Shtyrlin, E. M. Gilyazetdinov, et al., Isonicotinoyl hydrazones of pyridoxine derivatives: synthesis and antimycobacterial activity, *Medicinal Chemistry Research*, 30 (2021.), 952-963
18. O. E. Zhuravlev, N. V. Verolainen, L. J. Korochikhina, Effect of Structure of Nucleophile and Substrate on the Quaternization of Heterocyclic Amines, *Russian J of General Chemistry*, 80 (2010.), 1015-1028
19. T. A. Hamlin, M. Swart, F. M. Biedenhaupt, Nucleophilic Substitution (SN2): Dependence on Nucleophile, Leaving Group, Central Atom, Substituents, and Solvent, *ChemPhysChem*, 19 (2018.), 1315–1330
20. E. E. Şengül, T. Göktürk, C. Ş. Topkaya, R. Gup, Synthesis, characterization and DNA interaction of Cu(II) complexes with hydrazone-Schiff base ligands bearing-alkyl quaternary ammonium salts, *J. Chil. Chem. Soc.*, 65 (2020.), 4754 – 4758
21. V. Alptüzün, S. Parlar, H. Taşlı, E. Erciyas, Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Pyridinium Salts, *Molecules* 14 (2009.), 5203-5215
22. Eliot, A.C.; Kirsch, J.F. Pyridoxal phosphate enzymes: Mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, 73, 383-415
23. H. Gunzler, H.-U. Gremlich. *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga 2006.

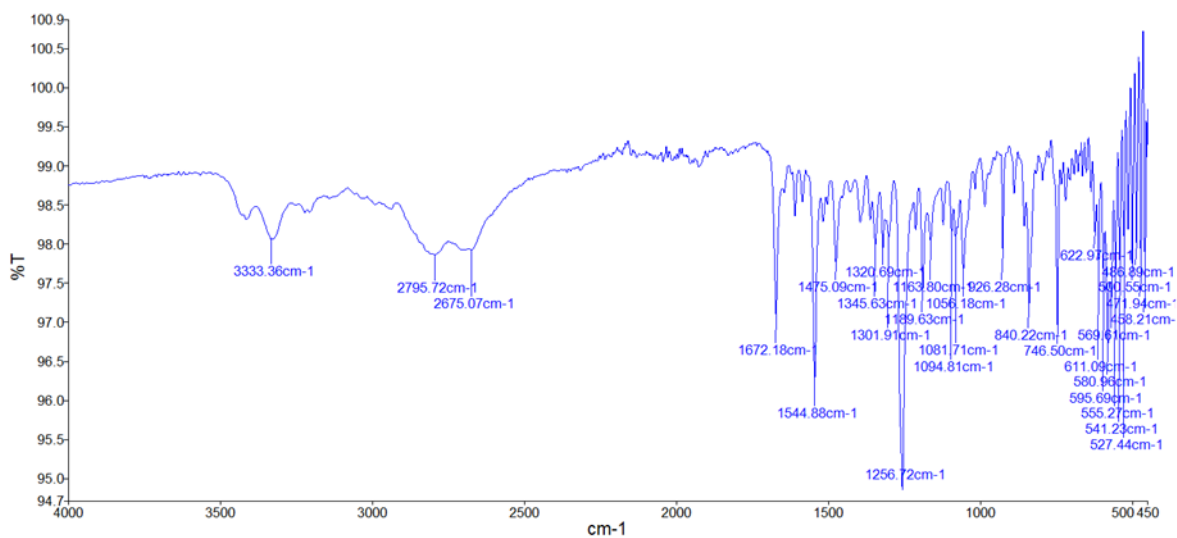
7. PRILOZI



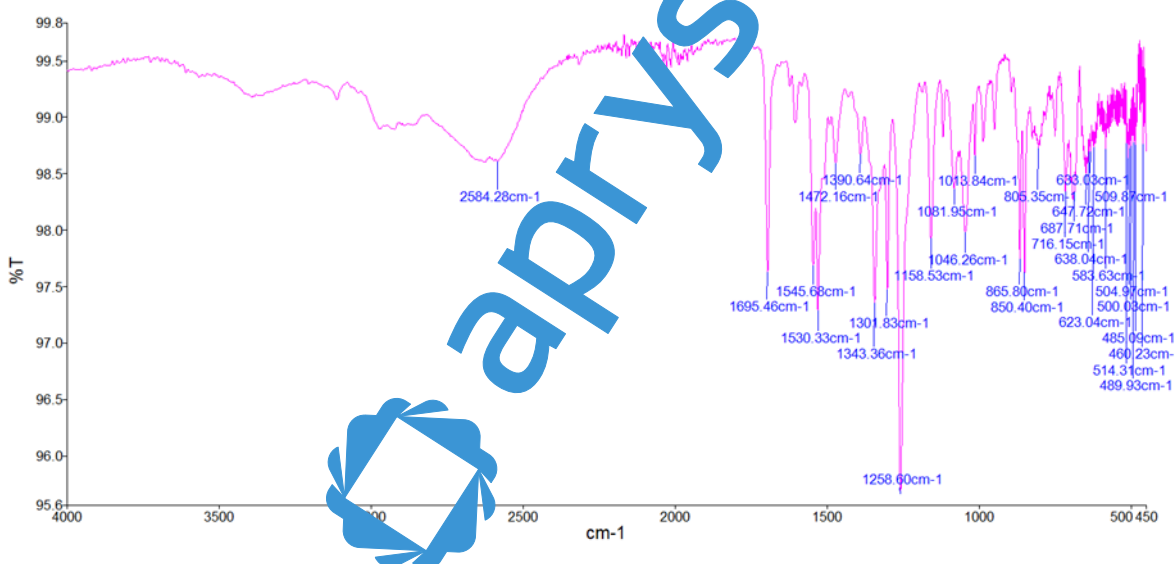
Slika 15. IR spektar 3-fluoro-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (1)



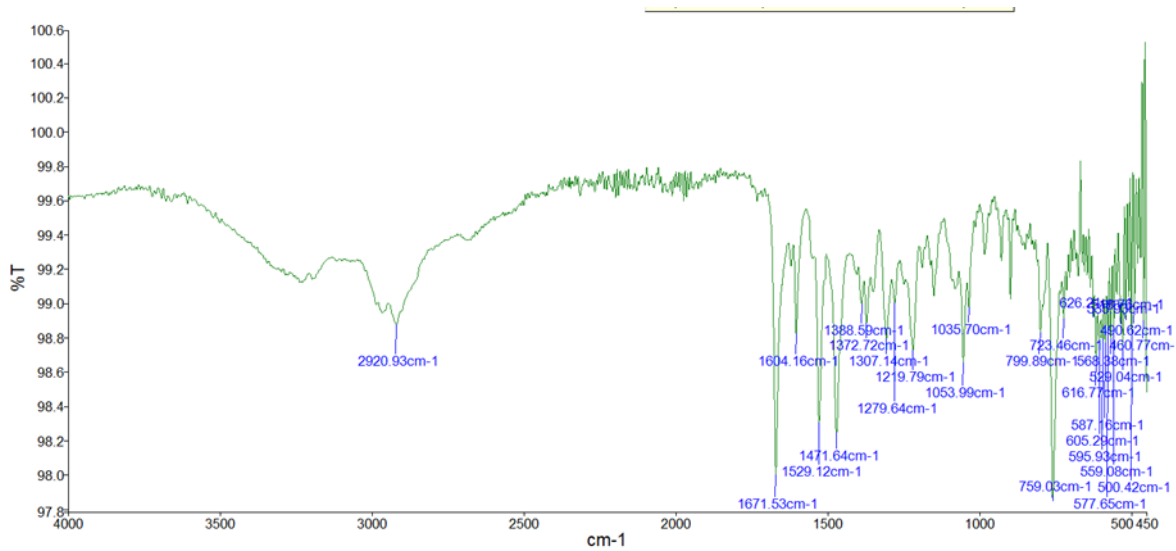
Slika 16. IR spektar 3-klor-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (2)



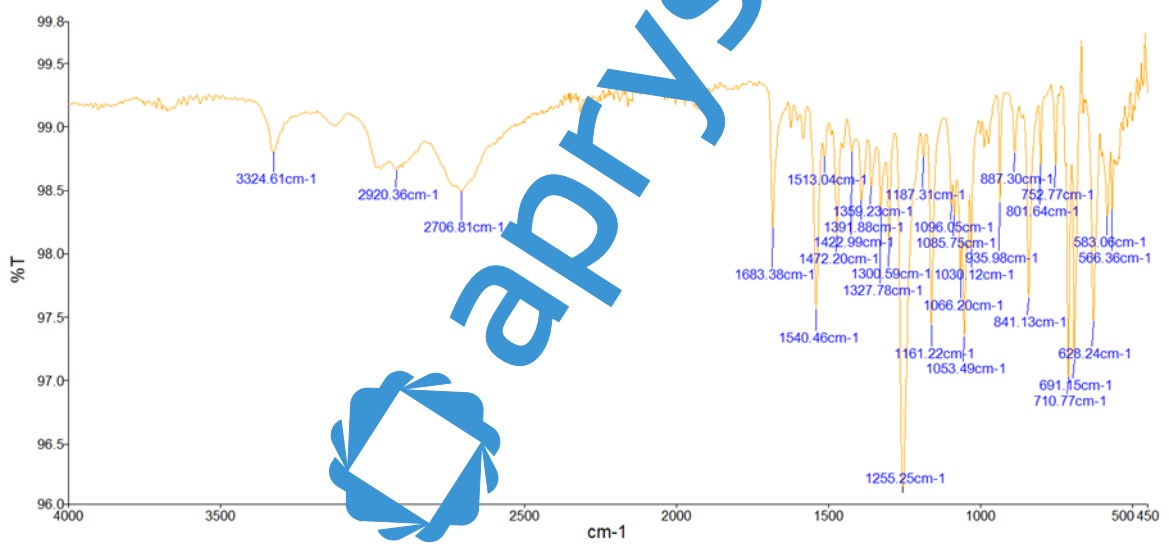
Slika 17. IR spektar N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-metilbenzohidrazida (3)



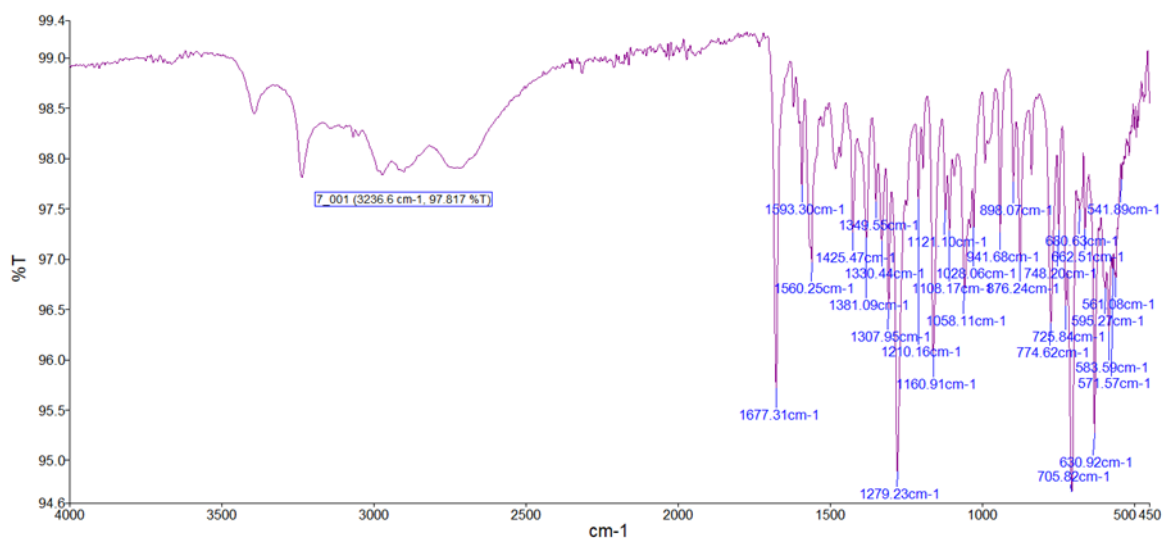
Slika 18. IR spektar N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-nitrobenzohidrazida (4)



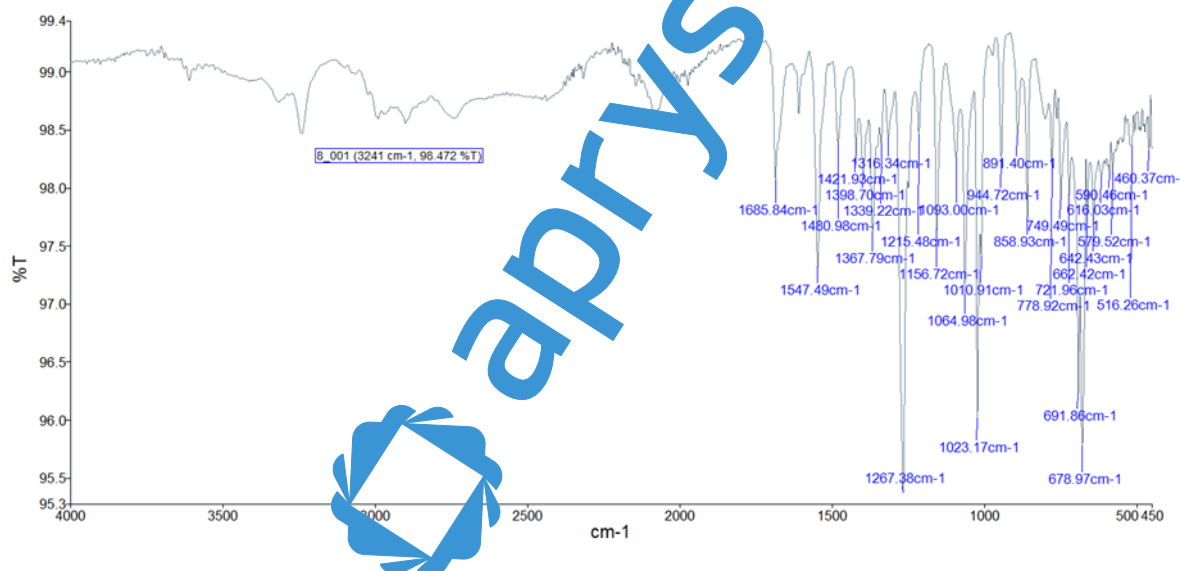
Slika 19. IR spektar 2-hidroksi-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (5)



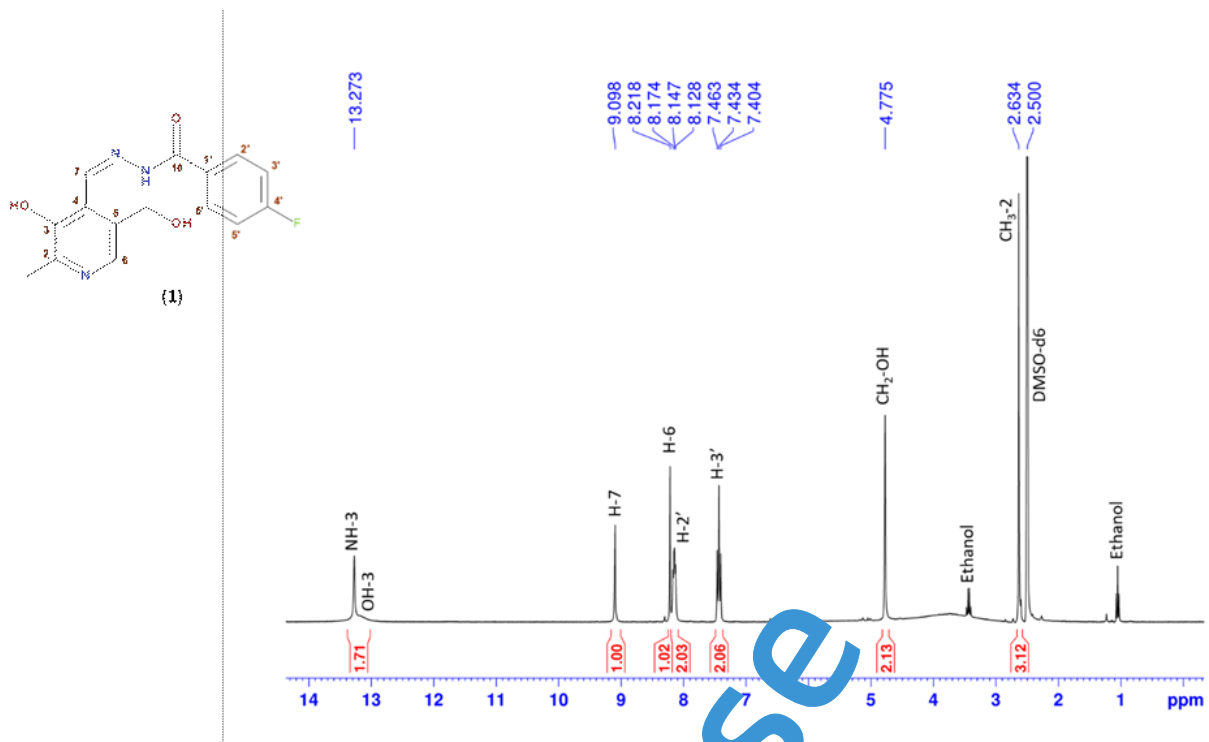
Slika 20. IR spektar N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (6)



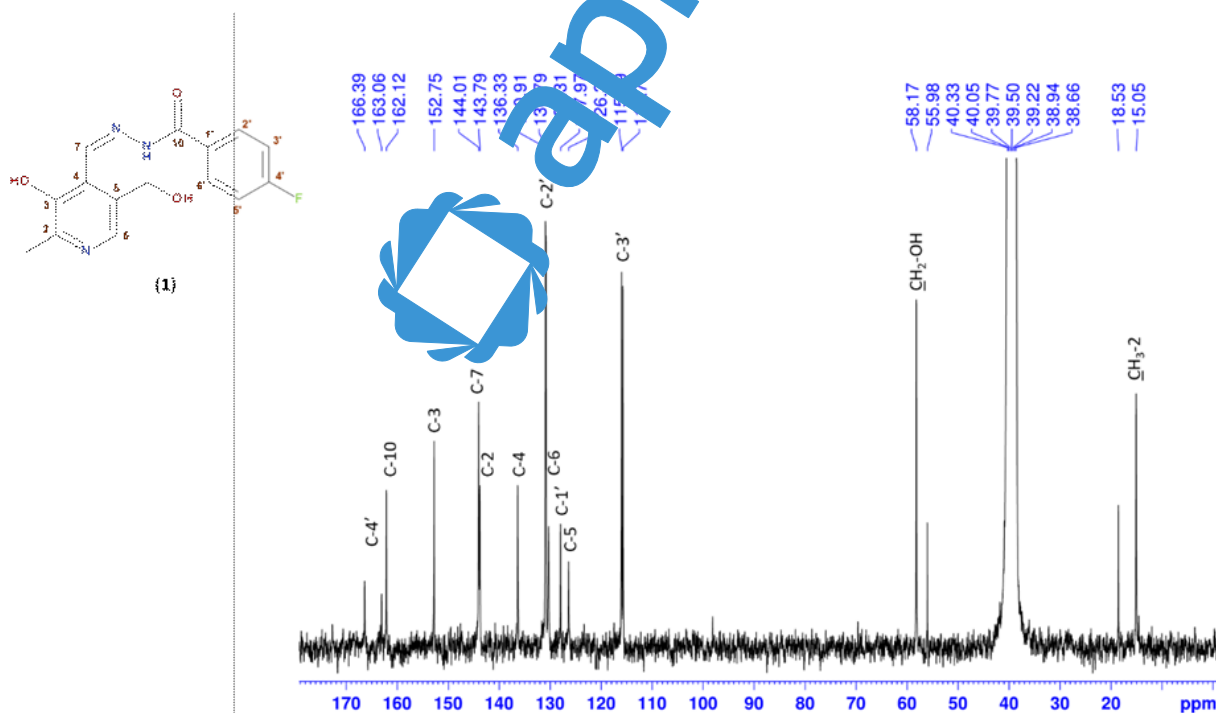
Slika 21. IR spektar *N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)nikotinohidrazi (7)



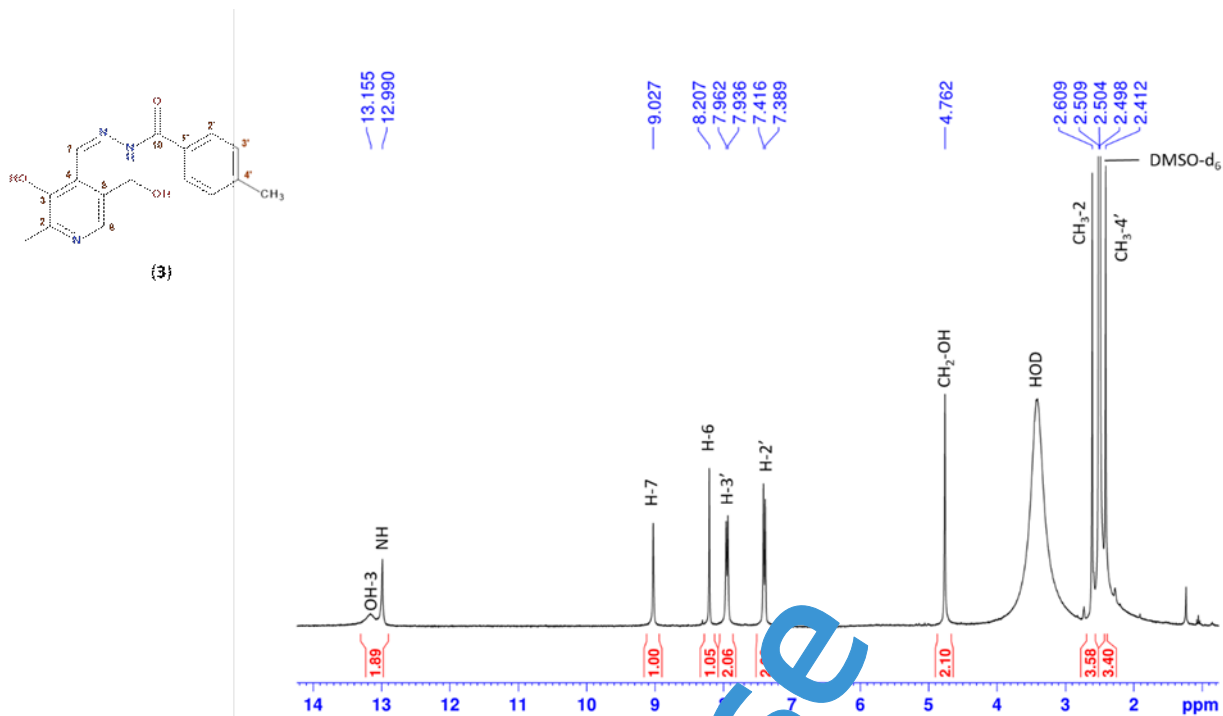
Slika 22. IR spektar *N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)izonikotinohidrazida (8)



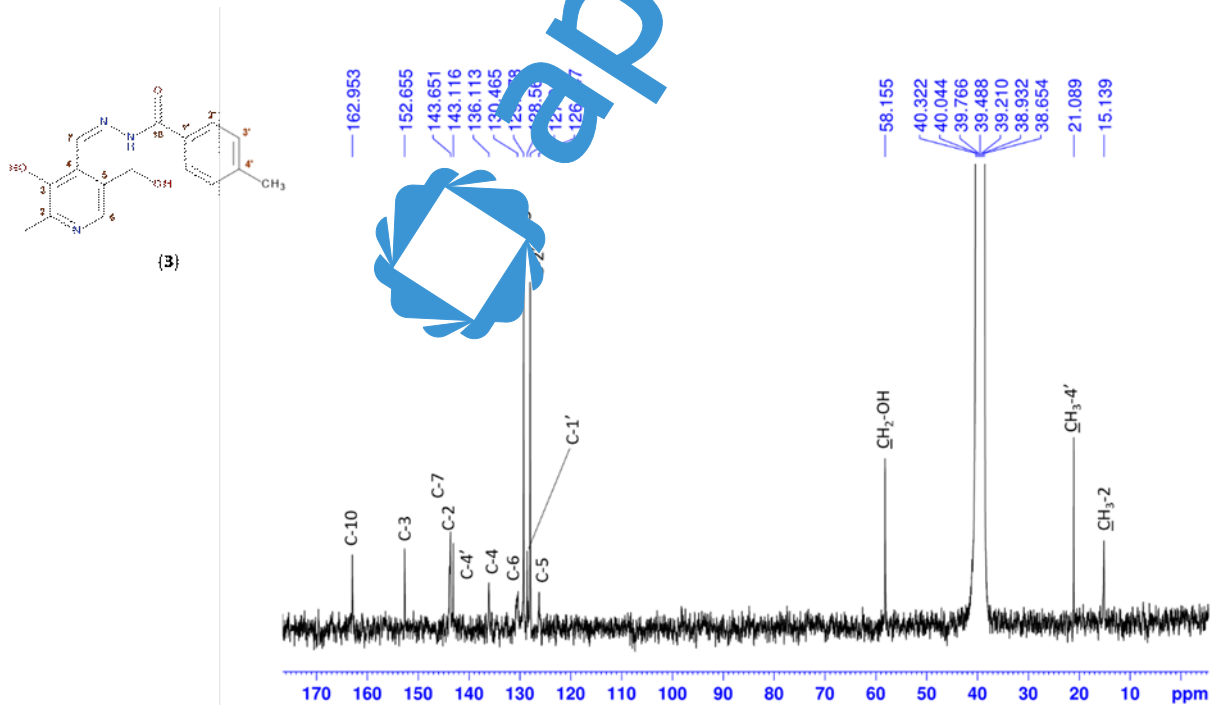
Slika 23. ^1H spektar 3-fluoro- N' -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (**1**)



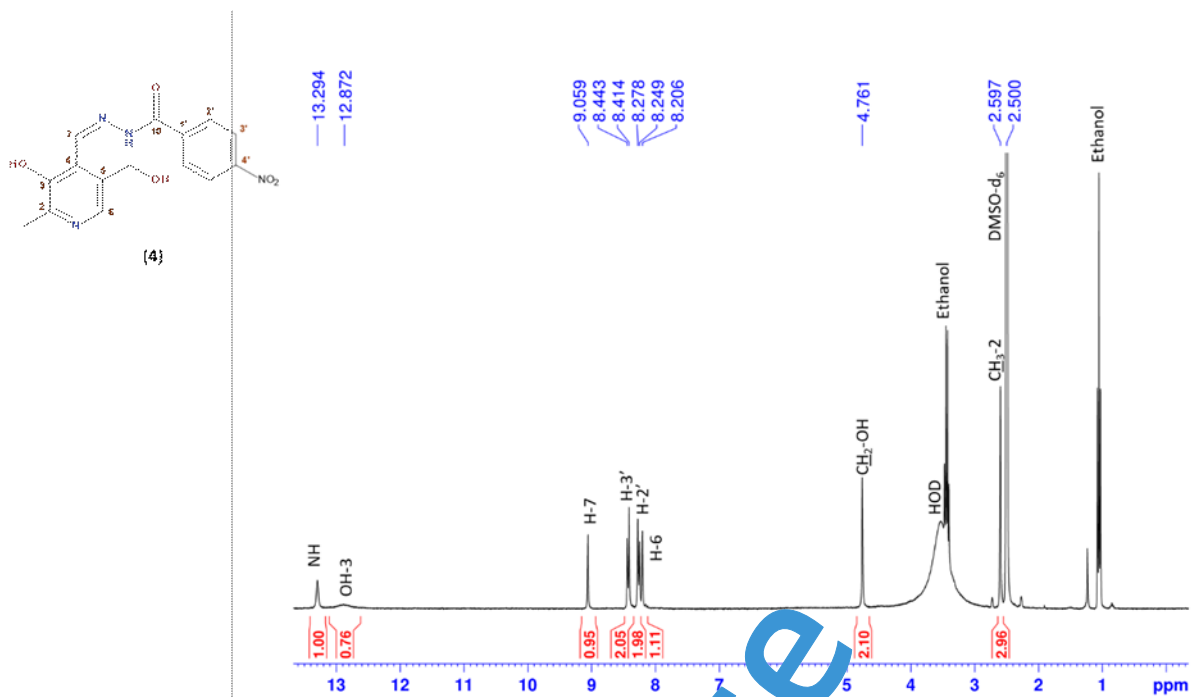
Slika 24. ^{13}C spektar 3-fluoro- N' -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (**1**)



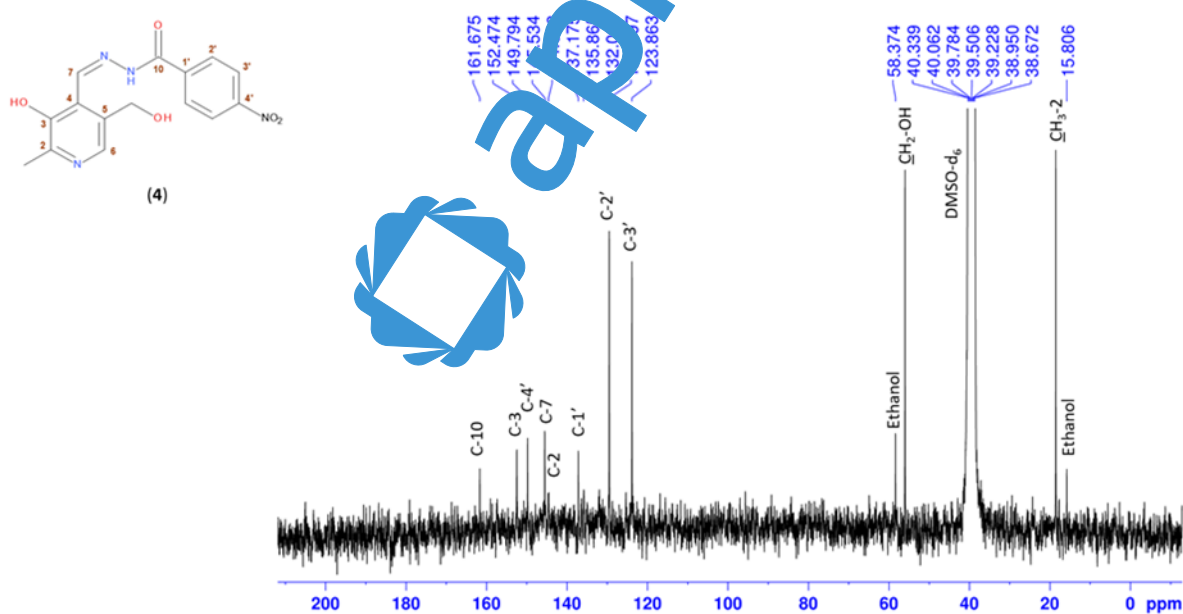
Slika 27. ¹H spektar N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-metilbenzohidrazida (3)



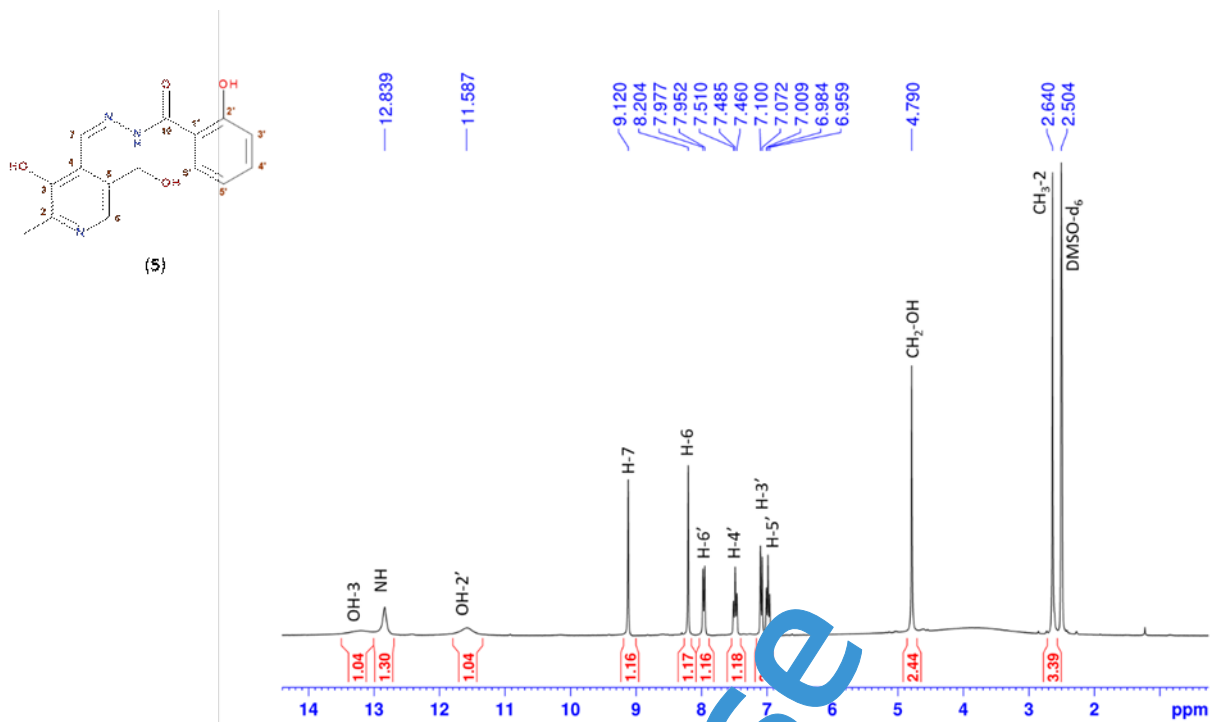
Slika 28. ¹³C spektar N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-metilbenzohidrazida (3)



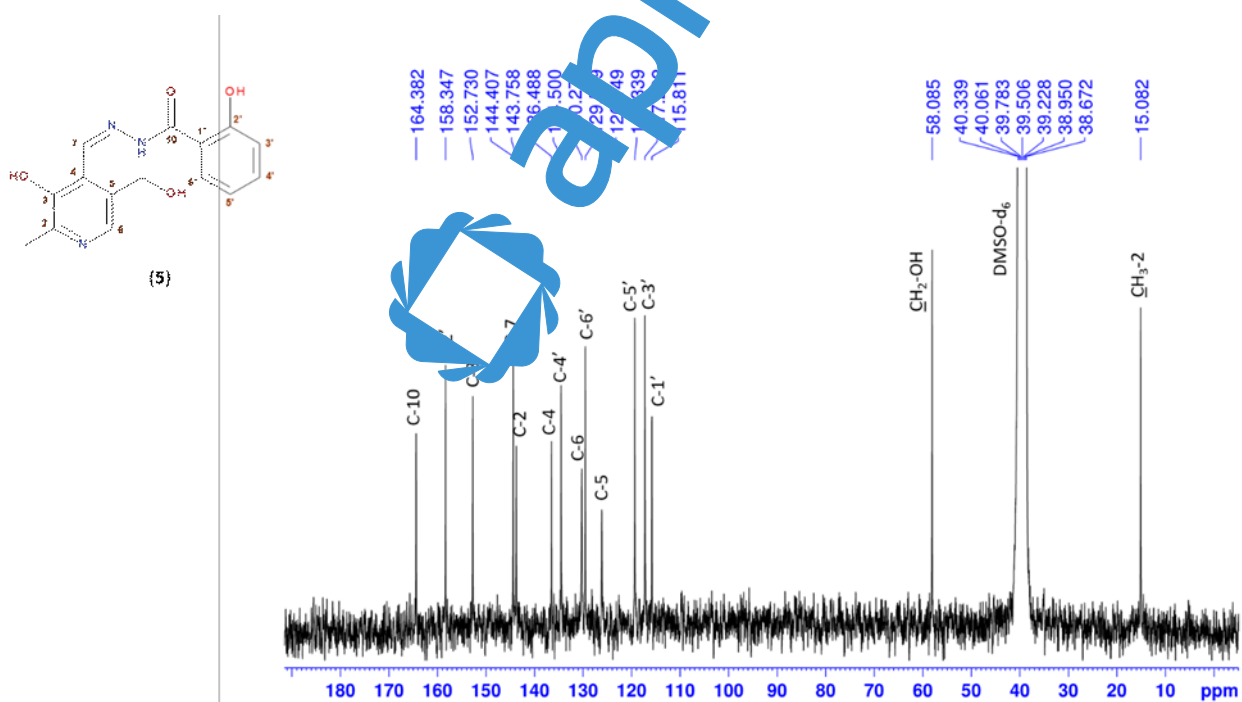
Slika 29. ^1H spektar N' -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-nitrobenzohidrazida (4)



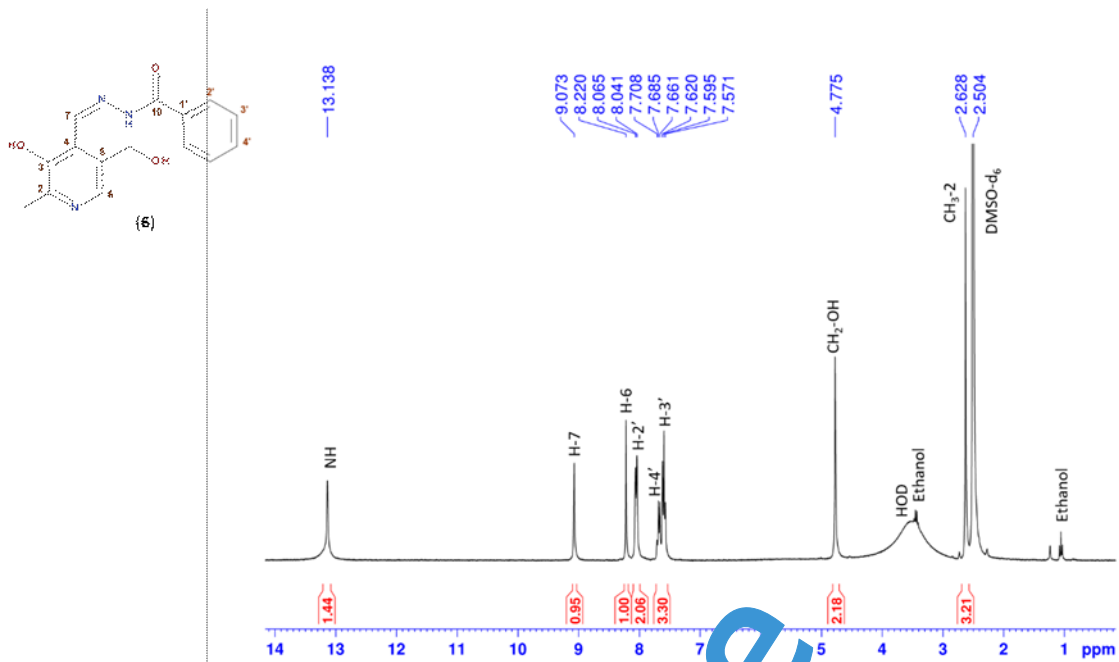
Slika 30. ^{13}C spektar N' -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)-3-nitrobenzohidrazida (4)



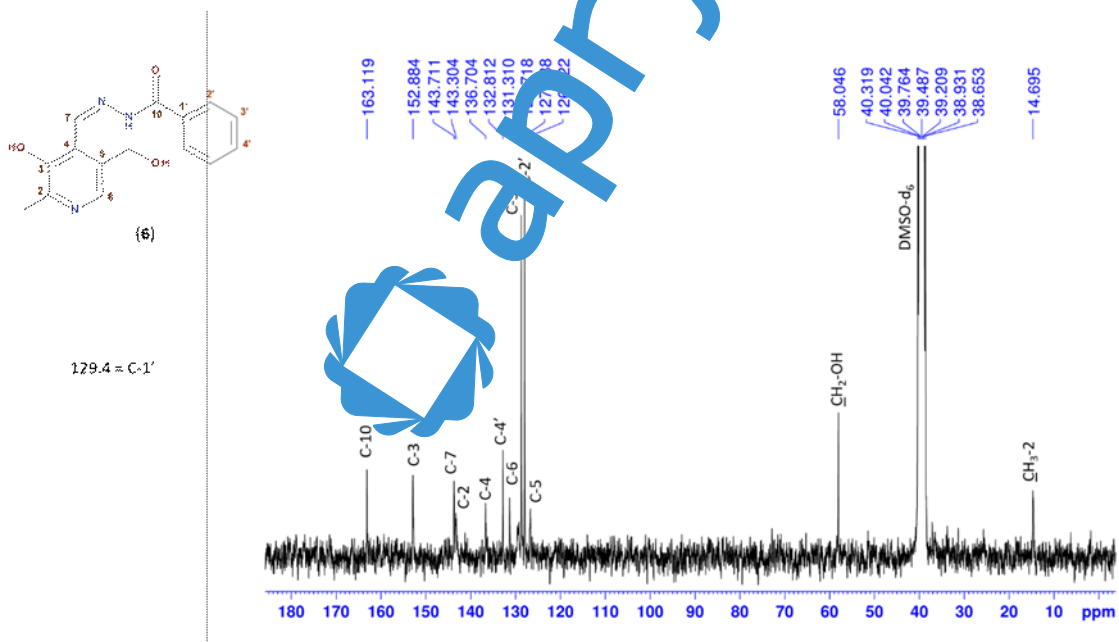
Slika 31. ¹H spektar 2-hidroksi-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (5)



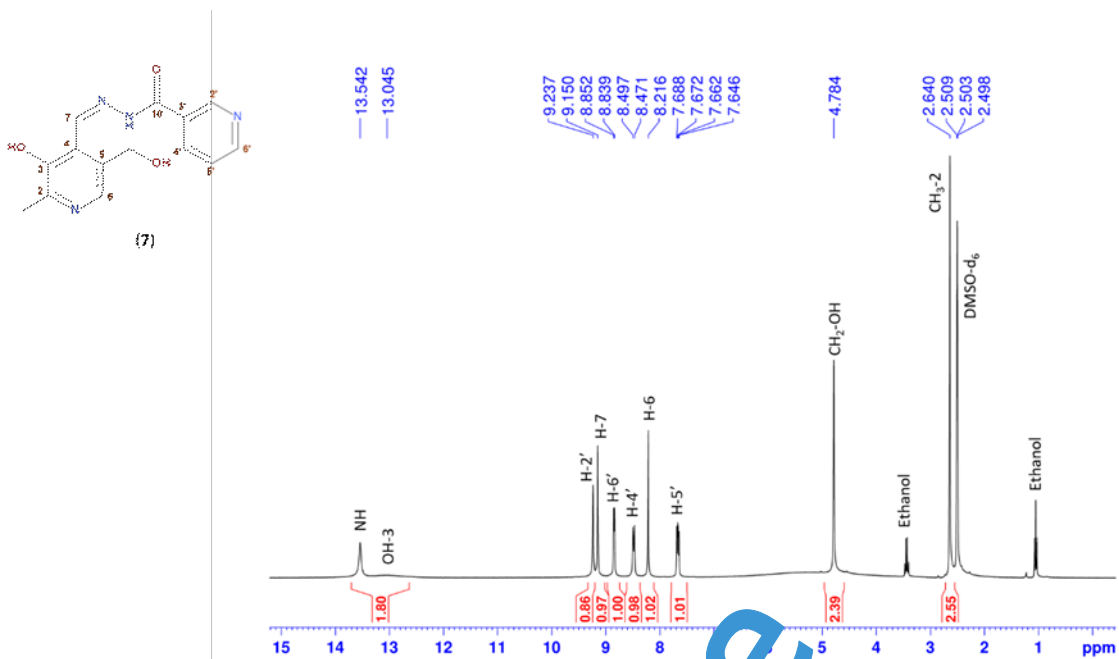
Slika 32. ¹³C spektar 2-hidroksi-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (5)



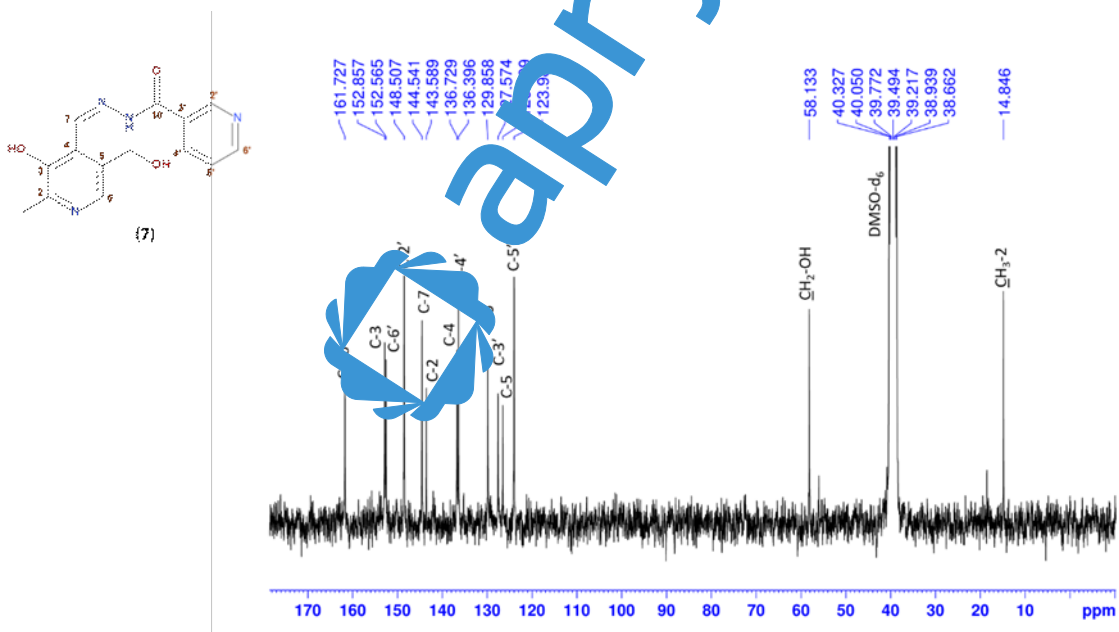
Slika 33. ^1H spektar N' -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (6)



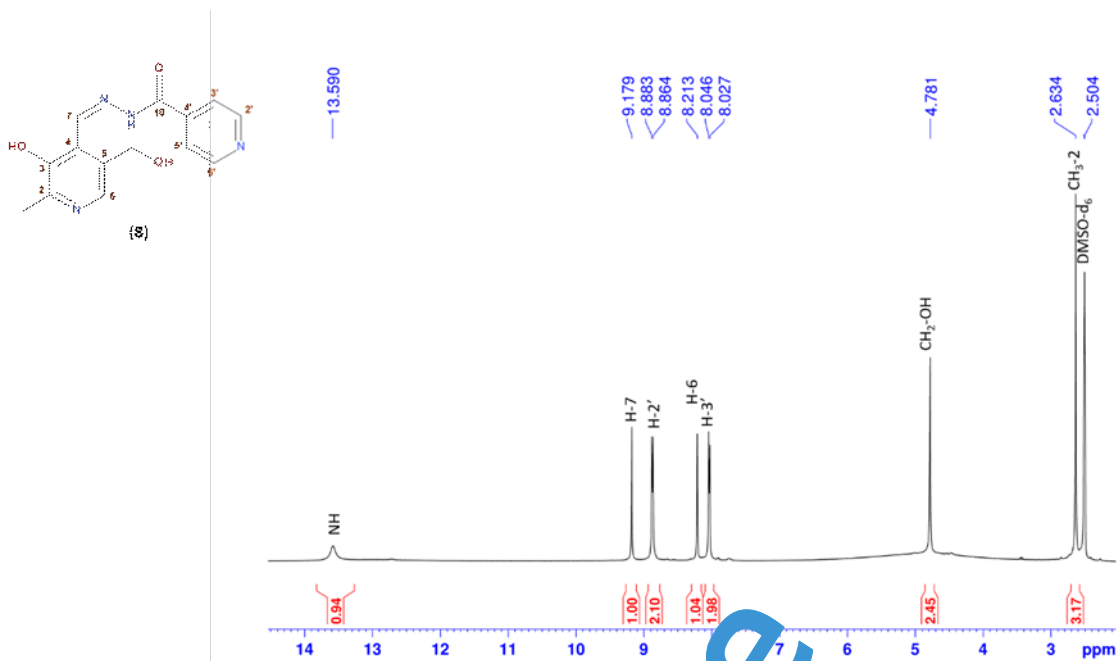
Slika 34. ^{13}C spektar N' -((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)benzohidrazida (6)



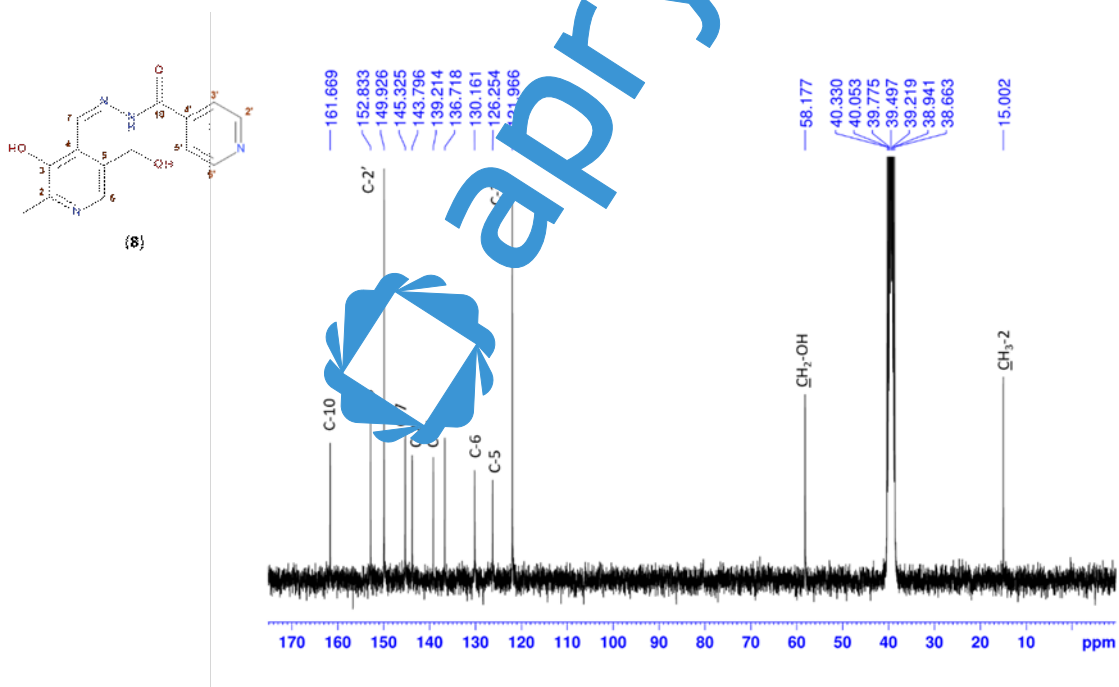
Slika 35. ^1H spektar *N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)nikotinohidrazida (7)



Slika 36. ^{13}C spektar *N'*-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)nikotinohidrazida (7)



Slika 37. ^1H spektar (Z)-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)izonikotinohidrazida (8)



Slika 38. ^{13}C spektar (Z)-N'-((3-hidroksi-5-(hidroksimetil)-2-metilpiridin-4-il)metilen)izonikotinohidrazida (8)

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Ana Horvat
Datum i mjesto rođenja	23.02.1999, Čakovec
Adresa	Mali Mihaljevec, Rade Končara 54
e-mail	ahorvat894@gmail.com
Obrazovanje	
2021.- 2023.	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2018.- 2021.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Pregled i usporedba metoda za izračunavanje Hildebrandonovog i Hansenovog parametra topljivosti Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
2014.- 2018.	Medicinska škola Varaždin, Ul. Vinka Međerala 11, 42000, Varaždin Farmaceutska tehničarka

Osobne vještine	
Materinski jezik	Hrvatski jezik
Strani jezici	Engleski jezik- aktivno u govoru i pismu Slovenski jezik – položena B2 razina
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom
Sudjelovanje na kongresima	2022. sudjelovanje na 2. međunarodnoj studentskoj Green konferenciji

