

# Priprava novih meta i para supstituiranih piridinonskih alfa-manozida i njihov antiadhezijski učinak

---

**Matišić, Mateja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:046696>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-31**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Mateja Matišić

**PRIPRAVA NOVIH *META* I *PARA*  
SUPSTITUIRANIH PIRIDINONSKIH  
MANOZIDA I NJIHOV ANTIADHEZIJSKI  
UČINAK**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković i neposrednim vodstvom dr. sc. Željke Car.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Sinteza, strukturna analiza i biološka evaluacija peptidomimetika i glikokonjugata* (IP-2014-09-7899).

## Zahvale

*Srdačno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na vodstvu, uloženom vremenu i trudu, stručnim savjetima i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade ovog diplomskog rada te nadasve na pruženoj pomoći i neizmjernoj potpori te stečenom znanju.*

*Zahvaljujem se neposrednoj voditejici dr.sc. Željki Car na predanosti, uloženom vremenu i trudu, pruženoj pomoći i potpori, strpljenju te brojnim stručnim savjetima tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada i pisanja rada, kao i na ugodnoj radnoj atmosferi i pruženoj utjesi u manje uspješnim trenucima.*

*Hvala svim dragim prijateljima i kolegama, posebno Antoniji, Antoniji, Nikolini, Anđeli i Zlati, na pruženoj potpori, nesebičnom pomaganju te brojnim druženjima. Hvala vam što ste znali skratiti ponekad duge i naporne dane studiranja i učiniti ih zabavnim i ljepšim.*

*Hvala i dragim prijateljima i prijateljicama iz srednjoškolskih dana, posebno Mariji, Silviji, Ivi, Doris, Anamariji i Tajani, na pruženoj potpori i ohrabrivanju, razumijevanju i savjetima. Hvala vam što ste me neprestano podsjećali da se sve može.*

*Najljepše hvala mom dragom Marku te njegovim roditeljima. Marko, hvala ti na razumijevanju, beskonačnom strpljenju, potpori i mnogobrojnim savjetima. Hvala što si uvijek bio uz mene, u svim trenucima, pogotovo u onim teškim i manje uspješnim kada si me ohrabrivao i tješio. Hvala ti na nesebično uloženom trudu i vremenu provedenom pomažući mi sve ove godine.*

*Za kraj, posebno se zahvaljujem bratu Manuelu i Ana-Mariji, mojim roditeljima i djedu na pomoći, razumijevanju i potpori prilikom svih mojih pokušaja da ostvarim sve svoje ciljeve i na tome što ste se odrekli mnogih stvari da ja budem ovdje gdje jesam i postanem što jesam. Hvala vam.*

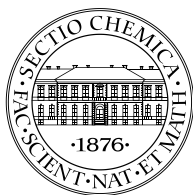
Zagreb, veljača 2018.

Mateja Matišić

# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Cilj i svrha rada.....</b>	<b>3</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Kojična kiselina .....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Uvod .....	5
2.1.2. Struktura kojične kiseline .....	5
2.1.3. Sinteza kojične kiseline .....	7
2.1.4. Kemijska svojstva.....	8
2.1.4.1. Jonesova oksidacija.....	9
2.1.5. Primjena kojične kiseline.....	11
<b>2.2. Hidroksipiridinoni .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Biološko djelovanje 3,4-HP .....	13
2.2.2. Sinteza 3-hidroksipiran-4-ona.....	15
2.2.2.1. Mehanizam pripreve 3,4-HP.....	16
<b>2.3. Manokonjugati .....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Struktura i sinteza glikozida .....	19
2.3.1.1. Koenigs-Knorrova reakcija.....	21
2.3.2. Biološko djelovanje manokonjugata.....	25
2.3.3. Manozni derivati 3,4-HP.....	28
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Priprava prekursora 1 i 2 za sintezu novih meta i para supstituiranih N-aril-3-hidroksipiridin-4-ona.....</b>	<b>31</b>
3.2.1. Priprava 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (1).....	31
3.2.2. Oksidacija 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (1) .....	32
3.2.2.1. Priprava Jonesovog reagensa .....	32
3.2.2.2. Priprava 5-benziloksipiran-4-on-2-karboksilne kiseline (2).....	32
<b>3.3. Priprava novih meta i para supstituiranih N-aril-3-hidroksipiridin-4-ona 3-7 .....</b>	<b>33</b>
3.3.1. Priprava 3-hidroksi-1-( <i>m</i> -metilfenil)piridin-4-ona (3).....	33
3.3.2. Priprava 3-hidroksi-1-( <i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-ona (4) .....	34
3.3.3. Priprava 3-hidroksi-1-( <i>m</i> -nitrofenil)piridin-4-ona (5) .....	35
3.3.4. Priprava 3-hidroksi-1-( <i>p</i> -metilfenil)piridin-4-ona (6).....	36

3.3.5. Priprava 3-hidroksi-1-( <i>p</i> -nitrofenil)piridin-4-ona (7) .....	37
<b>3.4. Priprava acetilmanoznih derivata 8-12 Koenigs-Knorrovom metodom glikozidacije iz spojeva 3-7 .....</b>	<b>38</b>
3.4.1. Priprava 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze .....	38
3.4.2. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>m</i> -metilfenil)piridin-4-ona (8).....	39
3.4.3. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-ona (9) .....	40
3.4.4. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>m</i> -nitrofenil)piridin-4-ona (10) .....	42
3.4.5. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>p</i> -metilfenil)piridin-4-ona (11).....	43
3.4.6. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>p</i> -nitrofenil)piridin-4-ona (12) .....	44
<b>3.5. Priprava manoznih derivata 13-16 Zemlénovim postupkom iz spojeva 8-11 .....</b>	<b>45</b>
3.5.1. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>m</i> -metilfenil)piridin-4-ona (13).....	45
3.5.2. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-ona (14) .....	46
3.5.3. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>m</i> -nitrofenil)piridin-4-ona (15) .....	47
3.5.4. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-( <i>p</i> -metilfenil)piridin-4-ona (16) .....	48
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>50</b>
4.1. Uvod .....	50
4.2. Priprava prekursora 1 i 2 za sintezu novih <i>meta</i> i <i>para</i> supstituiranih <i>N</i> -aril-3-hidroksipiridin-4-ona.....	51
4.2.1. Priprava 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (1).....	51
4.2.2. Priprava 5-benzilokspiran-4-on-2-karboksilne kiseline (2).....	53
4.3. Priprava novih <i>meta</i> i <i>para</i> supstituiranih <i>N</i> -aril-3-hidroksipiridin-4-ona 3-7 .....	54
4.4. Priprava acetilmanoznih derivata 8-12 Koenigs-Knorrovom metodom glikozidacije iz spojeva 3-7 .....	56
4.5. Priprava manoznih derivata 13-16 Zemlénovim postupkom iz spojeva 8-11 .....	59
4.6. Ispitivanje antiadhezijskog učinka piridinonskih manozida .....	60
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>62</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>64</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>66</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>VIII</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### PRIPRAVA NOVIH *META* I *PARA* SUPSTITUIRANIH PIRIDINONSKIH MANOZIDA I NJIHOV ANTIADHEZIJSKI UČINAK

Mateja Matišić

U ovom diplomskom radu opisane su sinteze *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona (**3-7**) i njihovih  $\alpha$ -D-manozida (**13-16**). Piridinonski prekursori **3-7** priređeni su modificiranom Harrisovom metodom iz 5-benzilokspiran-4-on-2-karboksilne kiseline (**2**), dobivene iz komercijalno dostupne kojične kiseline, i odgovarajućih anilina (*m*- i *p*-metilanilina, *m*- i *p*-nitroanilina te *m*-metoksianilina) uz dodatak kiselog katalizatora (*p*-TsOH) zagrijavanjem u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklav). Spojevi **3-7** prevedeni su u acetilirane manozne derivate (**8-11**) pomoću 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze uz AgOTf kao promotor i kolidin (Koenigs-Knorrova metoda glikozidacije). Uklanjanjem acetatnih skupina s manozne podjedinice spojeva **8-11** Zemplénovim postupkom priređene su ciljane molekule, *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-onskih  $\alpha$ -manozidi (**13-16**), kojima je ispitan inhibitorski učinak u procesu adhezije *E. coli* na stanice eritrocita.

Strukture svih priređenih spojeva određene su spektroskopijom NMR ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) i spektrometrijom masa (MS).

(68 + VIII stranica, 56 slika, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-oni, FimH inhibitori, Koenigs-Knorrova metoda glikozidacije, kojična kiselina, manokonjugati

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković  
Neposredni voditelj: dr. sc. Željka Car, stručni savjetnik

Ocjenitelji:

izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković.  
izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević.  
izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki.

Zamjena: prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović

Datum diplomskog ispita: 23. veljače 2018.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### SYNTHESIS OF NOVEL *META* AND *PARA* SUBSTITUTED PYRIDINONE MANNOSIDES AND THEIR ANTI-ADHESION ACTIVITY

Mateja Matišić

In this diploma thesis the syntheses of *meta* and *para* substituted *N*-aryl 3-hydroxypyridin-4-ones (**3-7**) and their  $\alpha$ -D-mannosides (**13-16**) are described. Pyridinone precursors **3-7** were prepared by Harris method from 5-benzyloxy pyran-4-one-2-carboxylic acid (**2**) and corresponding anilines (*m*- and *p*-methylaniline, *m*- and *p*-nitroaniline and *m*-methoxyaniline) with the addition of acid catalyst (*p*-TsOH) and heating in a sealed Teflon container (autoclave). Compound **2** was synthesized from commercially available kojic acid. Acetylated mannose derivatives (**8-11**) were obtained by Koenigs-Knorr glycosidation using 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-bromo- $\alpha$ -D-mannopyranose, collidine and AgOTf as promoter. The target compounds, *N*-aryl 3-hydroxypyridin-4-one  $\alpha$ -mannosides (**13-16**), were prepared by removal of acetyl groups from mannose subunit in compounds **8-11** (Zemplén procedure). The inhibitory activity of target molecules **13-16** in the *E. coli* adhesion to erythrocyte cells was evaluated.

The structures of all prepared compounds were determined by NMR ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) spectroscopy and mass spectrometry (MS).

(68 + VIII pages, 56 figures, 57 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: *N*-aryl 3-hydroxypyridin-4-ones, FimH inhibitors, glycosidation, Koenigs-Knorr method, kojic acid, mannoconjugates

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor  
Assistant mentor: Dr. Željka Car, Research Associate

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
2. Dr. Sanda Rončević, Associate Professor
3. Dr. Biserka Prugovečki, Associate Professor

Substitute: Dr. Srđanka Tomić-Pisarović, Professor

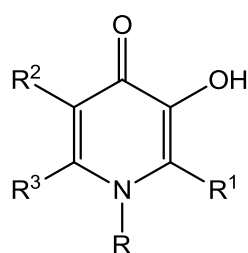
Date of exam: February 23<sup>rd</sup>, 2018



## § 1. UVOD

Hidroksipiridinoni (HP) su skupina šesteročlanih heterocikličkih spojeva koji sadrže dušikov atom u prstenu te hidroksilnu i karbonilnu skupinu koje su vezane na prsten međusobno u *ortho* položaju, što ih čini izvrsnim didentatnim kelatirajućim agensima metalnih iona.<sup>1</sup> S obzirom na položaj karbonilne i hidroksilne skupine u odnosu na dušikov atom uobičajeno se dijele na: 1-hidroksipiridin-2-one (1,2-HP), 3-hidroksipiridin-2-one (3,2-HP) i 3-hidroksipiridin-4-one (3,4-HP).<sup>2</sup> Jednostavnim sintetskim modifikacijama uvođenjem supstituenata na različite položaje u prstenu moguća je priprava velikog broja spojeva koji pokazuju različita biološka djelovanja, poput antimikrobnog, antitumorskog, antioksidativnog i antiadhezijskog djelovanja, te onih koji pokazuju svojstva potencijalnih antiprotozoika i antidementika.<sup>3</sup>

Najproučavanija skupina hidroksipiridinona su 3,4-HP, čija je struktura prikazana na slici 1. Ističu se velikom sposobnošću kelatiranja i visokim afinitetom prema *tvrdim* trovalentnim metalnim ionima, poput  $\text{Fe}^{3+}$  ili  $\text{Al}^{3+}$ , te se prvenstveno proučavaju kao agensi za uklanjanje ciljanih metalnih iona iz organizma (kelatoterapeutici). Godinama se primjenjuju u liječenju bolesti povezanih s prekomjernim nakupljanjem željeza u organizmu, primjerice hemosideroze izazvane liječenjem talasemije, ali pokazuju potencijal i u liječenju brojnih drugih bolesti, poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te Friedreichove ataksije.<sup>2-4</sup>



R = alkil, aril

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = H, alkil, aril

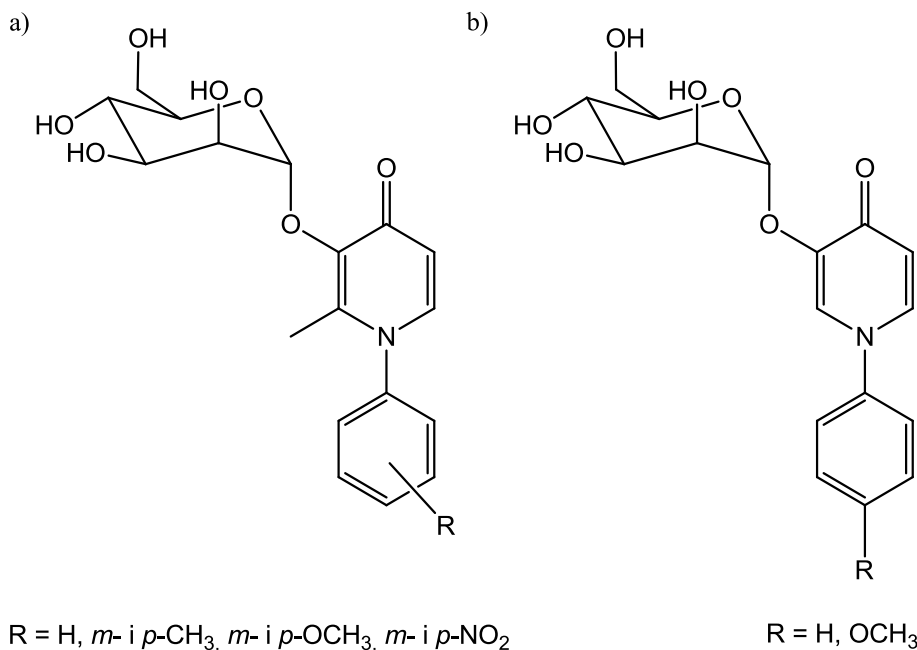
Slika 1. Općenita strukturna formula 3-hidroksipiridin-4-ona (3,4-HP)

Gram-negativne bakterije koje posjeduju manozno-specifičan protein FimH smješten na vrhu tip 1 fimbrije pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*, među kojima je i uropatogena bakterija *Escherichia coli*. Ona je uzročnik jedne od najčešćih bakterijskih infekcija, infekcije

urinarnog trakta.<sup>1,5</sup> Vežanje ove bakterije na površinu endotelne stanice urinarnog trakta ostvaruje se interakcijom bakterijskog lektina (proteina) FimH i  $\alpha$ -D-manopiranozidnih ostataka *N*-vezanog glikoproteina uroplakina Ia (UPIa) s površine napadnute stanice.<sup>6</sup> Istraživanja su pokazala da se u duboko smješteno i negativno nabijeno vezno mjesto FimH savršeno smješta jedan  $\alpha$ -D-manozni ostatak<sup>5,7</sup> te da se na ulazu u vezno mjesto nalaze dva aromatska ostatka, Tyr48 i Tyr137, koji čine tzv. *tirozinska vrata*. Ova saznanja omogućila su smisljeni dizajn odgovarajućih FimH inhibitora koji bi se mogli vezati u vezno mjesto FimH i time spriječiti adheziju patogenog organizma na stanice domaćina i nastanak bolesti. Ovakav pristup liječenju infektivnih bolesti koji se temelji na antiadhezijskoj terapiji predstavlja dobru alternativu antibioticima s obzirom na sve veći broj bakterija s razvijenom otpornošću na antibiotike.<sup>7,8</sup>

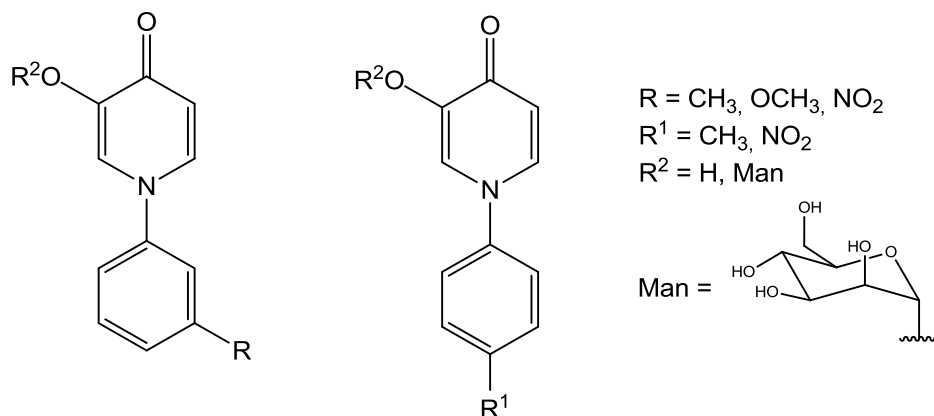
Potencijalni inhibitori FimH moraju imati određene strukturne karakteristike koje uključuju  $\alpha$ -konfiguraciju na anomernom ugljikovom atomu manopiranoznog prstena te aglikon koji bi mogao ostvarivati povoljne interakcije s aminokiselinskim ostacima smještenim na ulazu u vezno mjesto FimH. Upravo takve povoljne  $\pi$ - $\pi$  interakcije mogu se ostvariti ako se kao aglikon upotrijebi biciklički aromatski sustav 3,4-HP. Osim što posjeduju sve strukturne karakteristike dobrog FimH antagonista, piridinonski se manozidi relativno jednostavno mogu sintetizirati ili naknadno strukturno modificirati u svrhu poboljšanja inhibitorских svojstava.<sup>3,9,10</sup>

U sklopu dosadašnjih istraživanja provedenih na Zavodu za organsku kemiju pripravljeno je nekoliko  $\alpha$ -manozida s *meta* i *para* supstituiranim *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-onima kao aromatskim aglikonima dobivenim iz maltola (slika 2a). Ovi su spojevi pokazali umjeren do znatan antiadhezijski učinak koji bi se mogao poboljšati uklanjanjem metilne skupine na položaju 2.<sup>8,9</sup> Vodeći se time, pripremljeni su novi derivati 3,4-HP bez metila na položaju 2, polazeći iz kojične kiseline kao piranonskog sustava, koji su na stereospecifičan način manozilirani u svrhu dobivanja željenih  $\alpha$ -manozida (slika 2b).<sup>11</sup>

Slika 2. Općenite strukturne formule prethodno istraženih *N*-aril-3,4-HP  $\alpha$ -manozida<sup>8,9,11</sup>

## 1.1. Cilj i svrha rada

Cilj ovog diplomskog rada jest priprava novih *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona (**3-7**) i njihovih manoznih derivata (**13-16**) (slika 3).

Slika 3. Općenita strukturna formula ciljnih molekula –*meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona i odgovarajućih  $\alpha$ -manozida

Pošto 3-hidroksipiridin-4-onska komponenta potrebna za sintezu *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona (**3-7**) nije komercijalno dostupna, njihova sinteza će krenuti iz kojične kiseline (5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona). Kojična kiselina će se u nekoliko

koraka prevesti u odgovarajući piranon koji će u reakciji s odgovarajućim aromatskim aminima (*m*- i *p*-metilanilinom, *m*- i *p*-nitroanilinom te *m*-metoksianilinom) dati ciljne molekule **3-7**. Spojevi **3-7** će se zatim manozilirati pomoću 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze u uvjetima Koenigs-Knorrove reakcije glikozidacije. Uklanjanje acetatnih skupina s manozne podjedinice poznatim Zemplénovim postupkom rezultirat će nastankom konačnih ciljnih molekula, *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-onskih  $\alpha$ -manozida (**13-16**). Navedeni manozni derivati pripremit će se s ciljem ispitivanja njihovog inhibitorskog učinka u procesu adhezije *E. coli* na stanice eritrocita.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kojična kiselina

#### 2.1.1. Uvod

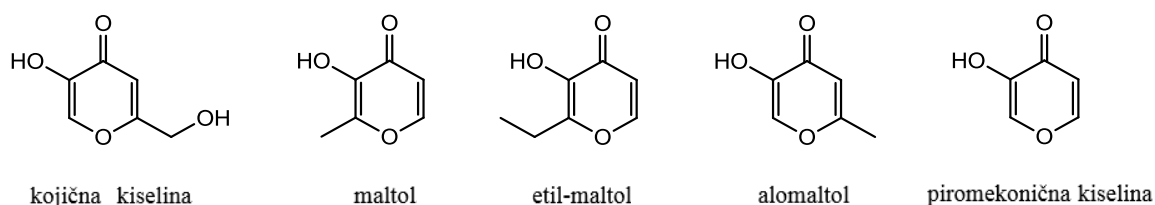
Praktična upotreba procesa fermentacije seže davno u prošlost i od antičkih vremena izaziva divljenje i zanimanje čovječanstva. Taj kompleksni proces koristio se stoljećima u Kini za pripremu alkoholnih pića iz žitarica, naročito riže, kao i prehrambenih proizvoda poput umaka i paste od soje.<sup>12</sup> Fascinirani procesom fermentacije, budistički svećenici u 7. stoljeću fermentacijske metode dovode i u Japan gdje se gljivični inokulum nakon rasta na riži kuhanoj na pari, ovdje poznat pod nazivom "koji", koristi u proizvodnji rižinog vina, slatkih napitaka, destiliranog žestokog pića, umaka i paste od soje.<sup>13,14</sup> Tako "koji" proces postaje preteča moderne fermentacije na čvrstoj fazi koja se danas koristi u industrijskoj proizvodnji različitih enzima, organskih kiselina, sekundarnih metabolita, biogoriva i za bioremedijaciju.<sup>13</sup>

#### 2.1.2. Struktura kojične kiseline

Upravo "koji" proces dovodi do izolacije "nove" organske tvari, kojične kiseline, koja se javlja u obliku bijelih kristala ili svijetlo žutog kristaliničnog praha.<sup>15</sup> Izolirao ju je japanski mikolog Kendo Saito iz micelija *Aspergillus oryzae* nakon rasta na riži kuhanoj na pari 1907. godine, čime postaje jedan od najranije izoliranih sekundarnih metabolita iz gljivica. Ime kojična kiselina dodjeljuje joj Teijiro Yabuta 1916. godine prema procesu kojim je dobivena. Isti znanstvenik sistematičnim proučavanjem 1924. godine dolazi do zaključka da kojična kiselina pripada skupini spojeva pod nazivom hidroksipiranoni.<sup>16-18</sup>

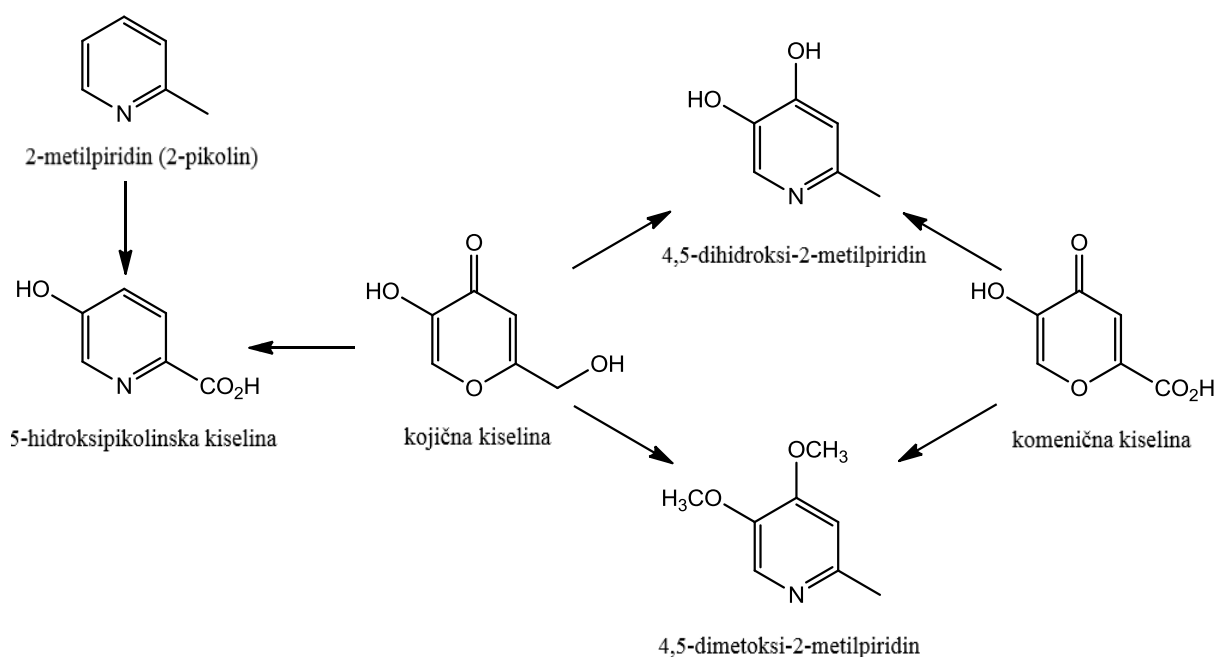
Hidroksipiranoni su nezasićeni šesteročlani heterociklički spojevi s kisikovim atomom u prstenu i hidroksilnom te karbonilnom skupinom na različitim mjestima na prstenu.<sup>11</sup> Mogu se izolirati iz biljaka, sintetizirati, a neki od njih su i komercijalno dostupni. 3-hidroksipiran-4-oni pokazali su se kao dobri kelatirajući reagensi zbog visokog afiniteta prema metalnim ionima, pri čemu tvore komplekse velike stabilnosti.<sup>11,19</sup> Međutim, u medicini njihovi kompleksi mogu poslužiti kao izvor metalnih iona potrebnih organizmu zahvaljujući nešto manjoj stabilnosti kompleksa uslijed slabijeg didentatnog vezanja nego što je to kod hidroksipiridinona, a čemu također pogoduje to što piranonski ligandi sami po sebi nisu

toksični.<sup>19</sup> Najproučavaniji spojevi koji pripadaju 3-hidroksipiran-4-onima su, uz kojičnu kiselinu, maltol, etil-maltol, alomaltol i piromekonična kiselina (slika 4). Maltol, koji se može izolirati iz prženog slada, kore ariša i iglica bora ili prirediti primjerice iz piromekonične kiseline ili derivata furfuralnog alkohola, poznat je po niskoj toksičnosti i visokoj biokompatibilnosti.<sup>11,19</sup> Zajedno s etil-maltolom proizvodi se u velikoj količini i koristi kao dodatak prehrani (E636 i E637). Utvrđeno je da maltol povećava topljivost antitumorskih lijekova na bazi platine uslijed koordiniranja fragmenta cisplatina  $Pt(NH_3)_2$ , te da je porasla bioraspoloživost nekih farmaceutski aktivnih supstancija u obliku maltolato kompleksa, što je pronađeno u slučaju kompleksa sa Fe(III), kompleksa s vanadilnim ionom i Zn(II) koji pokazuju potencijal u liječenju dijabetesa tipa 2, kompleksa s Ga(II) koji pokazuje antitumorsko djelovanje i mnogih drugih.<sup>19</sup>



Slika 4. Strukturne formule najproučavanijih 3-hidroksipiran-4-ona

Kao što je navedeno, Yabuta je došao do zaključka da je kojična kiselina 3-hidroksipiran-4-on i na temelju kemijskih opažanja predložio 2 strukture koje bi mogle odgovarati kojičnoj kiselini, a koje su usko povezane sa strukturama do tada već poznatih spojeva, maltola i komeične kiseline (slika 32). Strukturu kojične kiseline kao 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona potvrđuje prevođenjem kojične i komeične kiseline u iste produkte, 4,5-dihidroksi-2-metilpiridin i 4,5-dimetoksi-2-metilpiridin. Daljnji dokaz točnosti navedene strukture dobiven je prevođenjem kojične kiseline u 5-hidroksipikolinu kiselinu, koja se literaturno poznatim postupcima dobiva iz 2-pikolina, te konačno rješavanjem kristalne strukture difrakcijom rendgenskog zračenja (slika 5).<sup>18,20</sup>



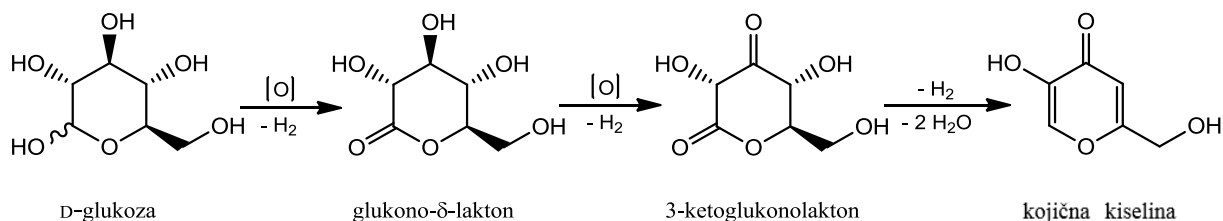
Slika 5. Shematski prikaz načina dokazivanja strukture kojične kiseline

### 2.1.3. Sinteza kojične kiseline

Kojična kiselina nastaje fermentacijom ugljikohidrata u aerobnim uvjetima pomoću različitih mikroorganizama. U te mikroorganizme ubrajaju se mnoge vrste gljivica iz roda *Aspergillus*, od kojih je najpoznatija *Aspergillus oryzae* iz koje je kojična kiselina prvi puta izolirana, neke vrste iz roda *Penicillium*, kao i određene bakterije - *Bacterium xylinoides*, *Gluconacetobacter opacus* var. *mobilis*, *G. roseum* te nekoliko vrsta bakterija octene kiseline. Razne tvari koje sadrže od dva do sedam atoma ugljika po molekuli mogu poslužiti kao izvor ugljika za izgradnju piranonskog prstena kojične kiseline, među kojima su reducirajući šećeri, njihove kiseline i alkoholi, nešto složeniji di-, tri- i polisaharidi, ali i kompleksni materijali poput riže, batata, zobi, raži i drugih. Međutim, najčešće se koristi glukoza.<sup>18,20</sup>

Iako je kojična kiselina jedan od rijetkih prirodnih piranona prilično jednostavne strukture, mehanizam njezine biosinteze još nije u potpunosti razjašnjen, a razjašnjavanje tog mehanizma dodatno otežava širok spektar tvari koje mogu poslužiti za njezinu biosintezu. Nije začuđujuće što su neki znanstvenici pretpostavili da biosinteza ide preko heksopiranoza zbog strukturne sličnosti piranonskog prstena heksoza i piranonskog prstena kojične kiseline. Istraživanje Arnsteina i Bentleya,<sup>21</sup> u kojem se glukoza koristila kao izvor ugljika, dovelo je do zaključka da se kojična kiselina formira većinom izravno iz glukoze bez promjene u

osnovnoj strukturi šesteročlanog prstena. Predložen je mehanizam koji uključuje enzimsku oksidaciju glukoze do glukonolaktona, daljnju oksidaciju do 3-ketoglukonolaktona te redukciju i dehidratiranje pri čemu nastaje kojična kiselina (slika 6).<sup>20</sup>



Slika 6. Shematski prikaz biosinteze kojične kiseline iz glukoze

Osim navedenog mehanizma predloženi su i brojni drugi s obzirom na to da za biosintezu kojične kiseline kao izvor ugljikovih atoma mogu poslužiti različite tvari.<sup>20</sup>

Kojična kiselina uspješno je kemijski sintetizirana 1930. godine u svrhu razjašnjavanja mehanizma nastajanja  $\gamma$ -piranonskog prstena iz ugljikohidrata, pri čemu su u sintezi korištene samo heksoze i njihovi derivati. Nažalost, poznavanje mehanizma kemijske sinteze nije doprinijelo rješavanju problema mehanizama biosinteze kojične kiseline.<sup>20</sup>

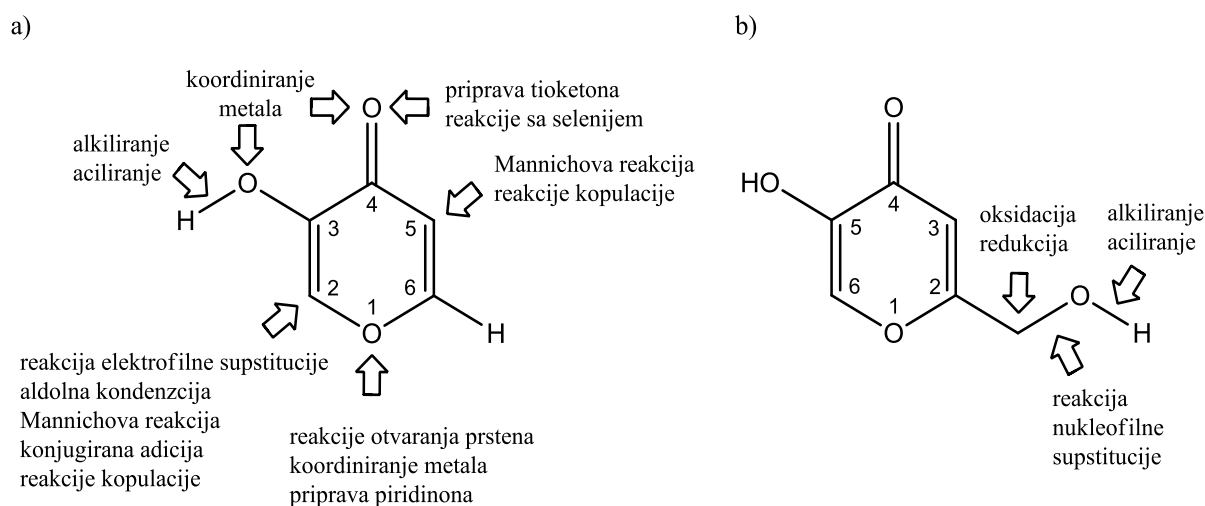
#### 2.1.4. Kemijska svojstva

Strukturni motiv 3-hidroksipiran-4-ona i njihovih derivata može se naći unutar velikog broja biološki aktivnih molekula. Zbog različite reaktivnosti pojedinih položaja u hidropiranonskom prstenu ovakvi sustavi ulaze u različite tipove kemijskih reakcija, čime je omogućena priprava čitavog niza derivata (slika 7a).<sup>16,19</sup> Najreaktivniji položaj 3-hidroksipiran-4-ona u prstenu je položaj 2 koji sudjeluje u reakcijama poput aldolne kondenzacije<sup>22</sup> (produkti  $\alpha,\beta$ -nezasićeni karbonilni spojevi) i Mannichove reakcije<sup>23</sup> (produkti  $\beta$ -aminokarbonilni spojevi).<sup>19</sup>

Kojična kiselina pokazuje sličnu reaktivnost kao i ostali 3-hidroksipiran-4-oni, no za razliku od njih sadrži hidroksimetilnu skupinu kao dodatni reaktivni centar, čime je otvoren put ka sintezi mnoštva drugih spojeva (slika 7b). Hidroksimetilna skupina ulazi u reakcije karakteristične za primarne alkohole, pa tako, zajedno s hidroksilnom skupinom koja posjeduje fenolni karakter, tvori etere i estere, a koji produkt će nastati ovisi o vrsti i količini reagensa i baze primijenjene u reakciji. Lako se prevodi u klormetilnu skupinu u prisutnosti tionil-klorida ili koncentrirane klorovodične kiseline, nakon čega se klorid može supstituirati



nekom drugom skupinom poput amino-, tio- i tiocijanato-skupine ili se reducirati do metilne skupine u svrhu pripreme novih derivata. Neki derivati klorkojične kiseline mogu se prevesti u kvaterne soli s tercijarnim alifatskim aminima, piridinom, tioureom kako bi postali topljivi u vodi.<sup>20</sup> Osim navedenog, hidroksimetilna skupina može se oksidirati do aldehidne skupine pomoću manganovog(IV) oksida ili do komeične kiseline pomoću Jonesovog reagensa.<sup>16</sup>

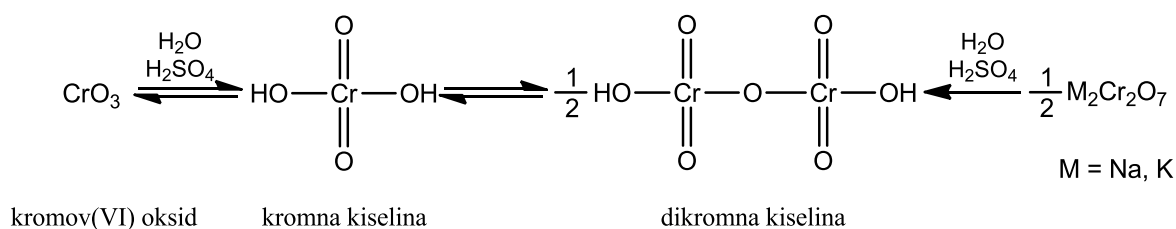


Slika 7. Reaktivni centri a) 3-hidroksipiran-4-ona, b) kojične kiseline koja posjeduje dodatni reaktivni centar na položaju 2. Napomena: reaktivnost pojedinih položaja u prstenu kojične kiseline slična je kao i kod ostalih 3-hidroksipiran-4-ona<sup>16,19,24</sup>

Također, utvrđeno je da kojična kiselina i njezini derivati podliježu i sudjeluju u mnoštvu drugih reakcija poput Claisenove pregradnje, cikloadicije, Wittigove reakcije, reakcije adicije na karbonilnu skupinu.<sup>16</sup>

#### 2.1.4.1. Jonesova oksidacija

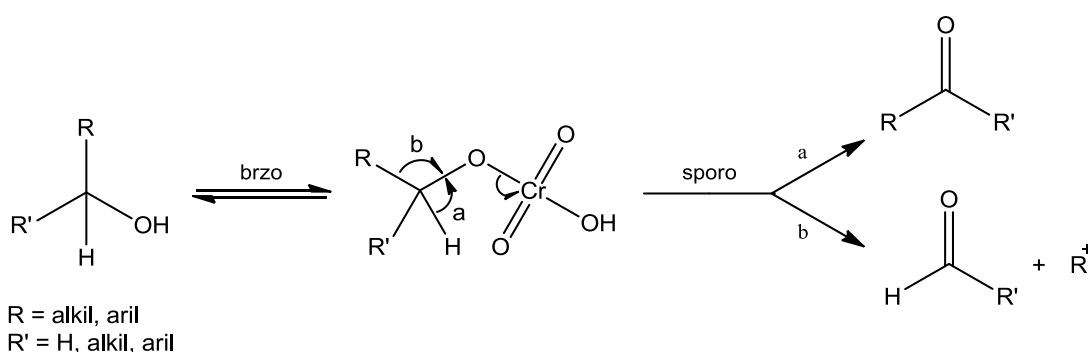
Uloženo je mnogo truda kako bi se pronašao odgovarajući reagens koji bi oksidirao hidroksimetilnu skupinu 5-benzilkojične kiseline do karboksilne skupine, dajući 5-benzilkomeičnu kiselinu koja će poslužiti kao prekursor u sintezi odabranih 3,4-HP derivata piromekonične kiseline i u ovome radu. Uspjeh je postignut primjenom Jonesova reagensa, otopine kromovog(VI) oksida<sup>11</sup> ili natrijeva odnosno kalijeva dikromata u razrijeđenoj sumpornoj kiselini, koji se koristi za oksidaciju organskih spojeva otopljenih u acetonu, jednom od rijetkih organskih otapala s kojima kromov(VI) oksid ne daje potencijalno eksplozivnu otopinu. Kao oksidans djeluje kromna kiselina koja nastaje otapanjem spoja kroma(VI) u razrijeđenoj sumpornoj kiselini (slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz nastanka kromne kiseline iz kromova(VI) oksida i dikromata

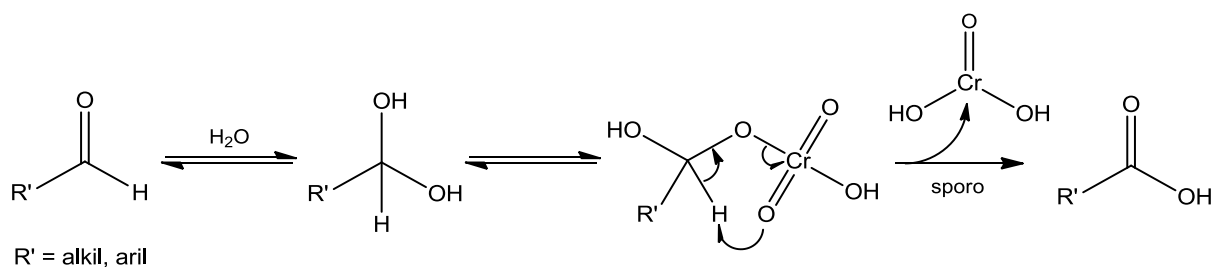
Naime, ovaj reagens osobito je prikladan za oksidaciju sekundarnih alkohola do ketona ili primarnih alkohola do karboksilnih kiselina te rijetko do aldehida zbog njihove tendencije prema daljnjoj oksidaciji, a reakcija je popraćena prelaskom narančaste otopine spojeva kroma(VI) u zelenu otopinu koja sadrži krom(III).<sup>25</sup>

Mehanizam Jonesove oksidacije uključuje nastanak estera iz odabranih alkohola i kromne kiseline, koji, ovisno radi li se o primarnom ili sekundarnom alkoholu, prelazi u aldehyd ili keton (slika 9, put a). Kod sekundarnih alkohola, iz kojih cijepanjem C-C veze može nastati stabilni karbokation, postoji mogućnost odvijanja paralelne kompetitivne reakcije i nastajanja nusprodukta (slika 9, put b).

Slika 9. Shematski prikaz oksidacije primarnog odnosno sekundarnog alkohola pomoću Jonesova reagensa (put a) i moguća sporedna reakcija (put b)<sup>25</sup>

U slučaju nastanka ketona, reakcija ovdje završava. Međutim, aldehyd obično dalje reagira s vodom dajući hidrat koji prelazi u karboksilnu kiselinu (slika 10).<sup>25</sup>

Ova reakcija ne zahtijeva niti suhe uvjete, niti inertnu atmosferu, ali nedostatak su izrazito kiseli uvjeti koji mogu utjecati na određene funkcijske i zaštitne skupine. Ipak, posljedice su ublažene odvajanjem organskog i vodenog sloja, pa je količina nastalih nusprodukata obično manja od očekivane.<sup>25</sup>



Slika 10. Shematski prikaz oksidacije aldehida do karboksilne kiseline pomoću Jonesova reagensa

Otkriće navedene reakcije, Jonesove oksidacije, i navedenog reagensa pripadaju Sir Ewartu Rayu Herbertu Jonesu i datira iz 1946. godine,<sup>26</sup> te predstavlja uvod u široku uspješnu primjenu kromovih(VI) spojeva kao oksidansa u organskoj kemiji.<sup>25</sup> Danas je Jonesov reagens jedan od brojnih oksidansa baziranih na kromu(VI), uz koji su najpoznatiji Collinsov reagens, piridinijev dikromat (PDC) te piridinijev klorkromat (PCC).<sup>27</sup>

### 2.1.5. Primjena kojične kiseline

Nakon otkrića kojične kiseline, mnoga su istraživanja bila posvećena proučavanju njezinih bioloških i kemijskih svojstava, kao i biosintezi, međutim primjenu u industriji nalazi skoro pola stoljeća kasnije. Danas se primjenjuje u kozmetičkoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji te u medicini i agronomiji.<sup>28</sup>

Kojična kiselina inhibira aktivnost enzima tirozinaze uslijed kelatiranja bakrovog iona u aktivnom mjestu tog enzima,<sup>28</sup> čime je spriječen nastanak prekursora u sintezi melanina, s kojim kojična kiselina u nekim slučajevima može i reagirati dajući različite produkte ili uzrokovati njegovu redukciju što za posljedicu ima nemogućnost stvaranja melanina.<sup>18</sup> Ovo djelovanje kojične kiseline koristi se u kozmetičkoj industriji u svrhu posvjetljivanja kože i zaštite od UV zračenja,<sup>24</sup> u liječenju dermatoloških poremećaja uzrokovanih hiperpigmentacijom kože poput melasme, te u prehrambenoj industriji kako bi se spriječilo tamnjenje uskladištenog voća, povrća<sup>29</sup> i nekih vrsta rakova,<sup>18</sup> gdje se također koristi i kao antioksidans te konzervans.<sup>30</sup>

Kojična kiselina sa željezovim ionima tvori stabilne komplekse te ima važnu ulogu u liječenju bolesti poput  $\beta$ -talasemije i anemije,<sup>31</sup> a pokazuje i potencijalna antibakterijska, antimikrobna, antileukemijska i antifungalna svojstva.<sup>16</sup> Osim toga, koristi se i u analitičkoj kemiji za spektrofotometrijsko određivanje metala s kojima tvori obojene komplekse, te indirektno određivanje spojeva poput alifatskih karboksilnih kiselina i peroksisikiselina koje u

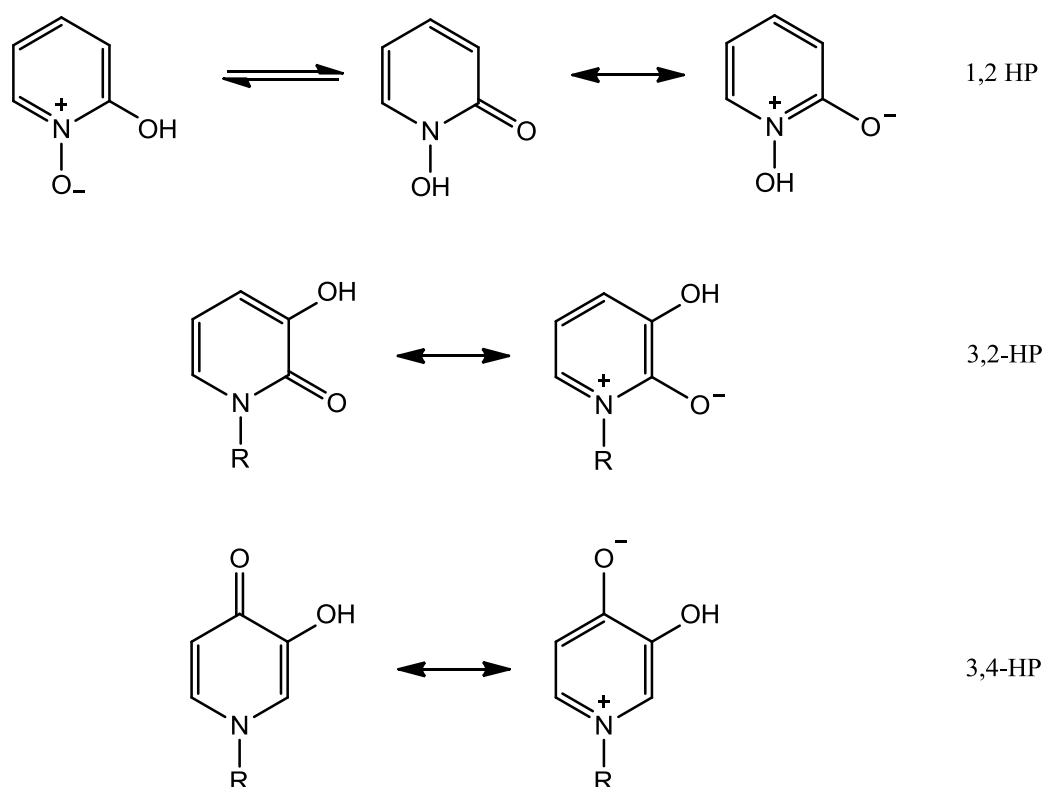
prisutnosti enzima daju hipohalite koji kojičnu kiselinu prevode u žuto-zeleni fluorescentni produkt (engl. *bright greenish-yellow fluorescence*, BGYF). Ista pojava zamijećena je djelovanjem peroksidaze na kojičnu kiselinu, stoga se koristila za detekciju gljivice *A. flavus* u zrnima kukuruza koja može, osim kojične kiseline, proizvesti i štetne alfatoksine.<sup>18</sup> Zbog velikog broja mogućih kemijskih transformacija, kojična kiselina se koristi kao polazni materijal u sintezi raznovrsnih spojeva s poboljšanim biološkim svojstvima i širom primjenom.

## 2.2. Hidroksipiridinoni

Hidroksipiridinoni (HP) su skupina šesteročlanih heterocikličkih spojeva koji sadrže dušikov atom u prstenu te hidroksilnu i karbonilnu skupinu koje su vezane na prsten međusobno u *ortho* položaju. Zbog ovakvog položaja skupina, HP su izvrsni didentatni kelatirajući agensi metalnih iona u području fiziološkog pH u kojem su relativno stabilni, netoksični i otporni na cijepanje katalizirano enzimima.<sup>1</sup>

S obzirom na položaj karbonilne i hidroksilne skupine u odnosu na dušikov atom uobičajeno se dijele na: 1-hidroksipiridin-2-one (1,2-HP), 3-hidroksipiridin-2-one (3,2-HP) i 3-hidroksipiridin-4-one (3,4-HP) (slika 11).<sup>2</sup>

Za razliku od 1,2-HP koji se pri fiziološkim uvjetima nalaze u anionskom obliku zbog čega su suviše hidrofilni, 3,2-HP i 3,4-HP su neutralni i tvore neutralne komplekse što je izrazito važno kod biološke primjene.<sup>2</sup> Ipak, najproučavaniji su 3,4-HP jer imaju veći afinitet prema metalnim ionima i stvaraju stabilnije komplekse u fiziološkim uvjetima u odnosu na druge hidroksipiridinone, uglavnom zahvaljujući odgovarajućem položaju (*O,O*)-donorskih skupina na prstenu koji osigurava da je njihova hidroksilna skupina najbazičnija ( $pK_a$  9-9,5), a elektronska gustoća na koordinirajućim atomima najveća.<sup>2,19</sup> Također, biokompatibilni su i jednostavno se sintetski mogu modificirati uvođenjem supstituenata na različite položaje u prstenu, uključujući dušikov atom koji je ujedno najreaktivniji te kisikov atom hidroksilne skupine na položaju 3, čime se znatno utječe na njihova fizikalno-kemijska te farmakološka svojstva s ciljem poboljšavanja potencijalnog biološkog djelovanja,<sup>1,3,4</sup> ponajviše bioraspoloživosti i interakcije s različitim biološkim metama. Zbog navedenih svojstava strukturni motiv hidroksipiridinona često se pojavljuje u biološki aktivnim spojevima s potencijalnim ljekovitim učinkom.<sup>4</sup>



Slika 11. Shematski prikaz tautomernih oblika i rezonantnih struktura hidroksipiridinona:

1,2-HP, 3,2-HP, 3,4-HP

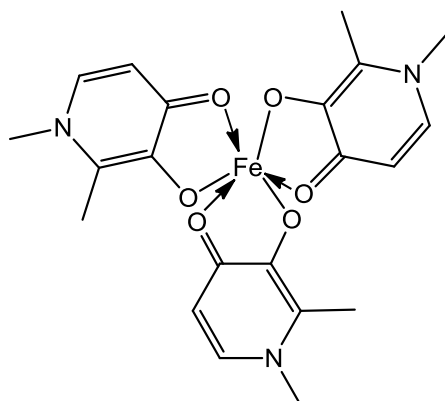
### 2.2.1. Biološko djelovanje 3,4-HP

Velik broj patoloških stanja uzrokovan je poremećajem u metabolizmu biološki važnih metala poput željeza, cinka, bakra, molibdena, ali i onih koji se akumuliraju u organizmu pretjeranim izlaganjem štetnom vanjskom utjecaju, poput aluminija i aktinida. Takva stanja mogu se liječiti ili barem ublažiti djelovanjem kelatirajućih agenasa. Pošto pokazuju visok afinitet prema trovalentnim, *tvrdim* metalnim ionima, u koje se ubrajaju Fe(III) i Al(III), i selektivnost prema tim metalima u odnosu na ostale biološki važne dvovalentne ione poput Cu(II), Zn(II), Fe(II), 3,4-HP se istražuju ponajprije kao agensi za uklanjanje ciljanih iona metala te kao nosači metala u terapijske svrhe, kao antimikrobni i antitumorski agensi, potencijalni antiprotozoici i antidementici, u dijagnostičke i analitičke svrhe, te kao ekstraktori metala iz različitih otopina.<sup>2-4,32</sup>

Željezo je esencijalni element za sve žive organizme, ponajprije zahvaljujući njegovom velikom afinitetu za kisik, i ključan je u brojnim staničnim procesima. U mnogim biokemijskim putovima ima ulogu kofaktora, a njegova mogućnost postojanja u dva oksidacijska stanja (Fe<sup>3+</sup> i Fe<sup>2+</sup>) daje mu posebnu katalitičku aktivnost. Međutim, u suvišku

postaje izrazito toksično jer, s obzirom na to da željezo redovito alternira između svoja dva redoks-stanja, odnosno prima ili donira elektrone, može pridonijeti stvaranju reaktivnih vrsta kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Fentonova reakcija) koje svojim djelovanjem mogu dovesti do različitih patoloških stanja. Također, povišena razina željeza može dovesti do zasićenja transportnog proteina transferina i skladišnog proteina feritina u krvnoj plazmi ili unutar stanica što rezultira većom količinom nevezanog željeza koje se nakuplja u specifičnim organima poput jetre, gušterače, srca i mozga, i može uzrokovati otkazivanje organa i smrt. Prekomjerno nakupljanje željeza u organizmu javlja se najčešće kao posljedica određene genetičke nasljedne bolesti kao što je hemokromatoza, ili talasemije koja uslijed čestih transfuzija krvi dovodi do hemosideroze, a povezuje se i s drugim patološkim stanjima, rakom te neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti te Friedreichove ataksije.<sup>2,4,10</sup>

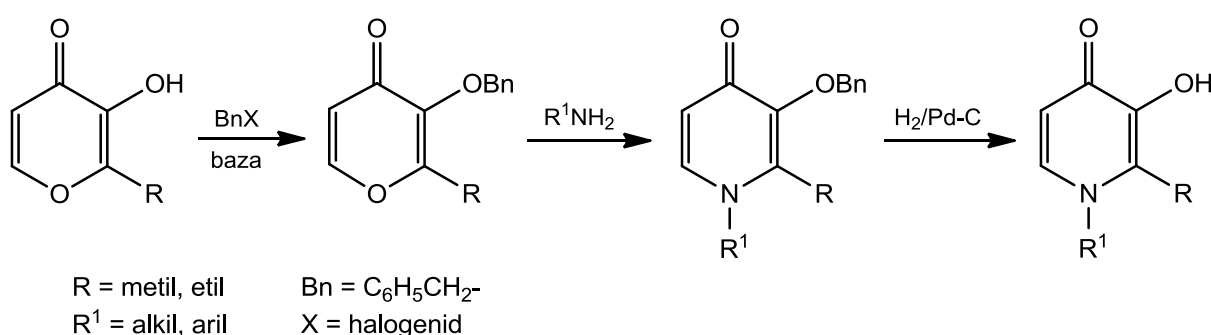
Kako ne postoji fiziološki mehanizam odstranjivanja željeza iz organizma, liječenje bolesti povezanih s prekomjernim nakupljanjem željeza omogućeno je otkrićem desferioksamina, prirodne siderofore izolirane iz *Streptomyces pilosum*, prvog i mnogo godina jedinog klinički odobrenog kelatora željeza. Potraga za novim kelatirajućim agensima željeza s višom bioraspoloživošću, oralnom aktivnošću te nižim troškovima proizvodnje dovela je do otkrića deferiprona, didentatnog oralno aktivnog kelatora koji pripada skupini 3-hidroksipiridin-4-ona i koji, kao ostali 3,4-HP, veže metal, u ovom slučaju željezo, u omjeru 1:3 (slika 12). Ovime hidroksipiridinoni, pogotovo 3,4-HP, i njihovi derivati postaju predmet intenzivnog istraživanja u svrhu razvoja novih kelatirajućih agenasa s potencijalnim farmakološkim učinkom. Do danas je razvijen velik broj didentatnih i polidentatnih kelatora koji se većinom koriste za uklanjanje toksičnih količina željeza, ali se eventualno mogu primijeniti i za uklanjanje drugih *tvrdih* metala.<sup>2,4,11</sup>

Slika 12. Strukturna formula kompleksa  $\text{Fe}^{3+}$  iona i deferiprona

### 2.2.2. Sinteza 3-hidroksipiran-4-ona

3-hidroksipiridin-4-oni mogu se pripremiti iz odgovarajućeg 3-hidroksipiran-4-ona, poput komercijalno dostupnog maltola, etil-maltola, alomaltola ili kojične kiseline (slika 4), i amonijaka ili primarnog amina uključujući aminokiseline.<sup>19</sup> U literaturi je opisano nekoliko metoda pripreve osnovne heterocikličke strukture 3,4-HP od kojih su najkorištenije Harrisova metoda i izravni postupak. Prednost ovih metoda jest relativno jeftin i lako dostupan polazni materijal, ali reakcije su obično dugotrajne, provode se pri visokim temperaturama, a prinosi većine do sada opisanih reakcija su niski ili umjereni.<sup>3</sup>

Harrisova metoda koristi se za sintezu *N*-alkilnih i *N*-arilnih 3,4-HP spojeva iz maltola ili etil-maltola. Reakcija se provodi u tri koraka (slika 13).



Slika 13. Shematski prikaz sinteze 3-hidroksipiridin-4-ona Harrisovom metodom

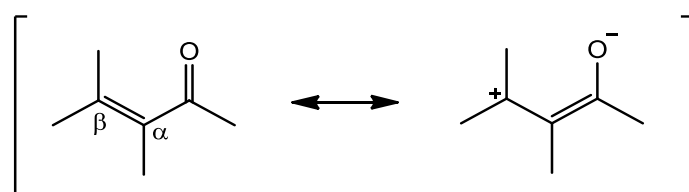
U prvom koraku se hidroksilna skupina 3-hidroksipiranona zaštićuje eterskom zaštitom, najčešće benzilnom, koja se uvodi reakcijom s benzil-kloridom ili bromidom u baznim uvjetima. Zaštićeni piranon zatim reagira s primarnim aminom ili amonijakom dajući odgovarajući piridinonski derivat.<sup>33</sup> Ovaj korak se provodi u reakcijskim uvjetima koji ovise o

strukturi, a time i svojstvima, samog aaminskog derivata koji se upotrebljava kao nukleofil. U slučaju alifatskih amina reakcija se provodi u alkoholno-vodenim otopinama uz refluks, dok se kod aromatskih amina reaktanti zagrijavaju na nešto višim temperaturama ( $\approx 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) bez dodatka otapala ili u zatvorenim sustavima uz dodatak odgovarajućih otapala (autoklav,  $\approx 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).<sup>3</sup> U posljednjem koraku uklanjanjem benzilne zaštite hidrogenolizom u kiselim, neutralnim ili bazičnim uvjetima nastaje željeni *N*-supstituirani 3,4-HP. Kako bi se produkt dobio u što boljem prinosu, potrebno je optimizirati reakcijske uvjete u svakom koraku, što je moguće, kao što je već navedeno, promjenom temperature, otapala, ali i pH vrijednosti smjese ili uvođenjem druge eterske zaštite, na primjer metilne.<sup>34</sup>

3,4-HP mogu se pripremiti i izravnom metodom u jednom koraku. Željeni produkt dobije se zagrijavanjem odgovarajućeg nezaštićenog piranonskog derivata i amina uz refluks prikladnih otapala ili u autoklavu s minimalnom količinom vode pri visokim temperaturama sa ili bez dodatka kiselog katalizatora, obično Brønstedove kiseline poput HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *p*-TsOH. Metoda se najčešće koristi za pripremu *N*-arilnih 3,4-HP, ali zadovoljavajući prinosi mogu se dobiti i kada se kao reaktanti koriste primarni kratkolančani alifatski amini.<sup>3</sup>

### 2.2.2.1. Mehanizam priprave 3,4-HP

3-hidroksipiran-4-oni posjeduju dvije  $\alpha,\beta$ -nezasićene karbonilne skupine. Uslijed rezonantne stabilizacije tih skupina dolazi do osiromašenja  $\beta$ -ugljikovog atoma elektronima odnosno on postaje elektrofilan i podložan nukleofilnom napadu (slika 14).<sup>35</sup>

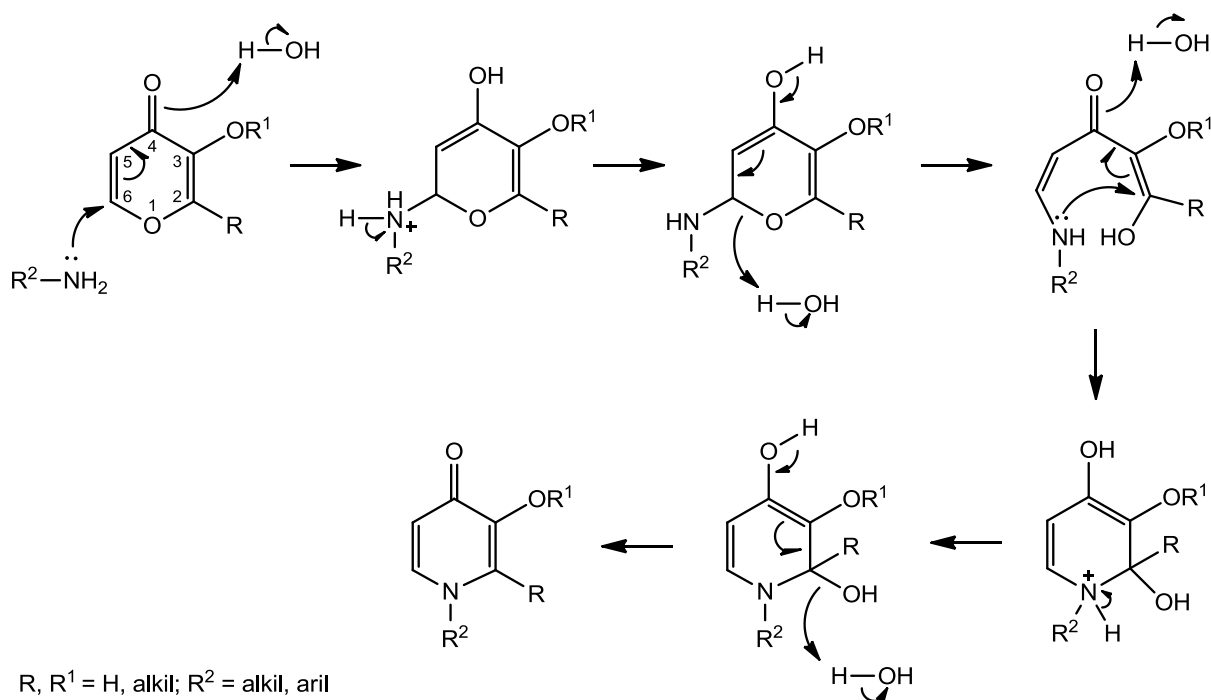


Slika 14. Prikaz rezonantnih struktura  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonilnog spoja

Upravo zato omogućena je reakcija konjugirane adicije Michaelovog tipa u prisutnosti amina. Kako je riječ o specifičnoj reakciji, primarni amin (nukleofil) ujedno je i Michaelov donor, a  $\alpha,\beta$ -nezasićeni hidroksipiranonski sustav je Michaelov akceptor (elektrofil). Dvostrukim nukleofilnim napadom primarnog amina najprije na položaj 6  $\alpha,\beta$ -nezasićenog hidroksipiranonskog sustava, pri čemu dolazi do otvaranja prstena, a zatim na položaj 2, pri

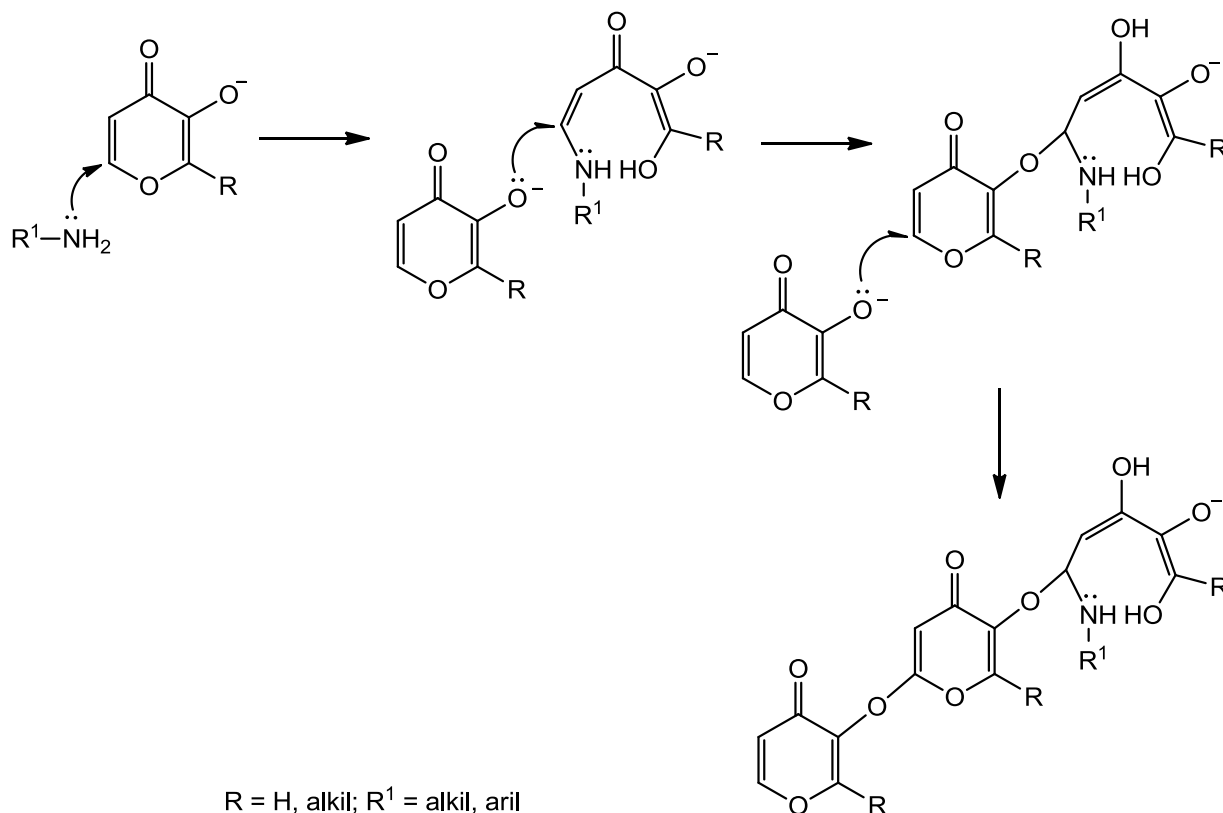


čemu se prsten ponovno zatvara, dolazi do nastajanja 3-hidroksipiridin-4-ona uz gubitak jedne molekule vode (slika 15).<sup>34,35</sup>



Slika 15. Shematski prikaz mehanizma sinteze 3,4-HP Michaelovom adicijom iz 3-hidroksipiran-4-ona i primarnog amina

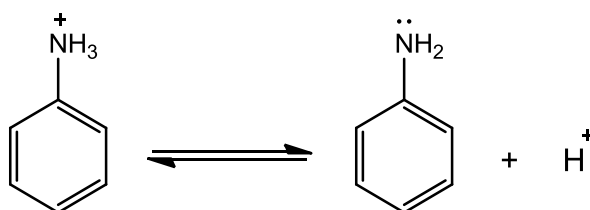
Prinosi ovih reakcija uvelike ovise o strukturi amina. U prisutnosti voluminoznijih alkilamina, koji su u pravilu bazičniji, veća je vjerojatnost deprotoniranja nezaštićene hidroksilne skupine na položaju 3 i nastajanja anionskog oblika 3-hidroksipiran-4-ona koji, kao dobar nukleofil, može ući u reakciju konjugirane adicije Michaelovog tipa s  $\alpha,\beta$ -nezasićenim karbonilnim sustavom međuprodukta nastalog tijekom aminacijskog koraka (slika 16). Posljedice toga su nastajanje kondenzacijskih nusprodukata te smanjeni prinos reakcije. Zbog toga se za pripremu *N*-alkilnih 3,4-HP koristi isključivo Harrisova metoda gdje se hidroksilna skupina na položaju 3 zaštićuje eterskom zaštitom, osim u slučaju kratkolančanih primarnih alkilamina koji mogu dati zadovoljavajuće prinose i izravnom metodom koja je jednostavnija i vremenski manje zahtjevnja.<sup>3,35</sup>



Slika 16. Shematski prikaz mehanizma nastajanja kondenzacijskog nusprodukta u reakciji priprave 3,4-HP

Iako su aromatski amini manje bazični i u reakciji priprave 3,4-HP izravnim postupkom daju dobre prinose, moguće je smanjiti utjecaj neželjnih sporednih reakcija dodatkom kiselog katalizatora, najčešće *p*-TsOH ili HCl. Optimalno vrijeme trajanja reakcije i njezin prinos ovise o vrsti katalizatora,<sup>36</sup> a on je općenito veći u odnosu na prinos nekatalizirane reakcije. U kiselim reakcijskim uvjetima hidroksilna skupina na položaju 3 je protonirana i nema izražena nukleofilna svojstva, stoga neće ući u reakciju konjugirane adicije Michaelovog tipa s  $\alpha,\beta$ -nezasićenim karbonilnim sustavom međuprodukta nastalog tijekom aminacijskog koraka i dati nusprodukte. Međutim, doći će i do protoniranja dušikovog atoma amina čime on prestaje biti nukleofilan. To predstavlja problem kod alkilamina, ali aromatski amini u kiselim uvjetima nisu u potpunosti protonirani i postoji ravnoteža između protoniranog i deprotoniranog oblika (slika 17) te taj deprotonirani oblik amina u reakciji sudjeluje kao nukleofil.<sup>35</sup>

Osim već navedenog, na prinos *N*-arilnih produkata utječu i elektronska svojstva skupina koje se nalaze u *para* odnosno *meta* položaju na polaznim anilinskim derivatima koje dirigiraju njihovu nukleofilnost. Sinteze u kojima se upotrebljavaju nukleofilniji anilinski derivati odnosno oni s elektron-donirajućim supstuentima rezultiraju višim prinosima.



Slika 17. Prikaz ravnoteže između protonirane i deprotonirane vrste anilina

S obzirom na to da je izravna metoda puno jednostavnija od Harrisove, a izolacija i pročišćavanje dobivenog produkta provodi se jednostavnim filtriranjem i rekristalizacijom,<sup>35</sup> ova metoda je prikladnija za sintezu *N*-arilnih 3,4-HP bez obzira na nešto manje prinose.

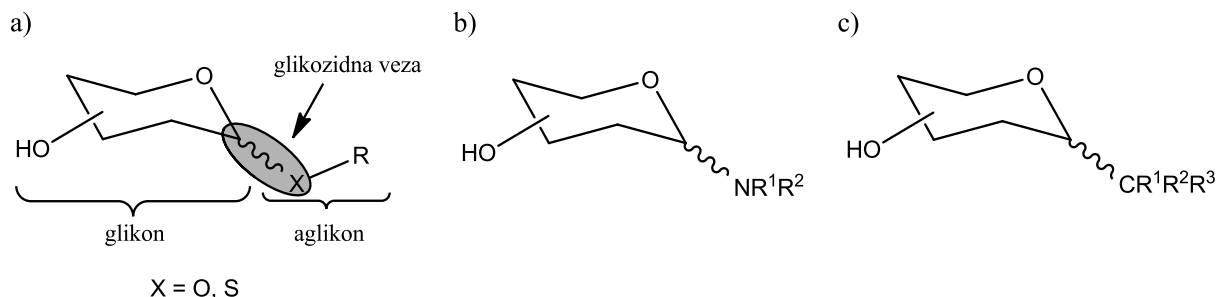
### 2.3. Manokonjugati

Derivati 3,4-HP pokazali su brojne biološke učinke i, kao što je već navedeno, istražuju se kao potencijalni kelatoterapeutici, antidementici, antimalarici, antibakterijska sredstva, ali pokazuju i antiadhezijsku aktivnost. Derivati koji se sintetiziraju i čiji se antiadhezijski utjecaj proučava upravo su manozni derivati 3,4-HP,<sup>3,10</sup> koji pripadaju skupini spojeva pod nazivom *O*-glikozidi.

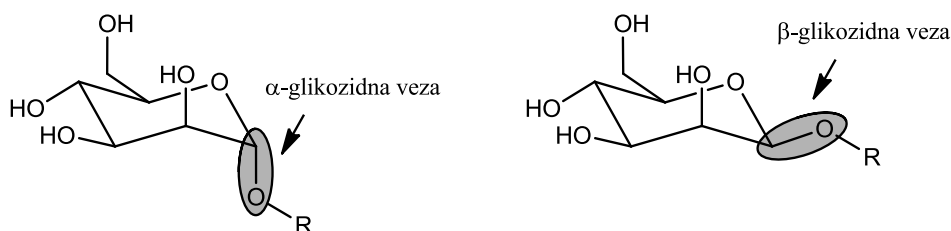
#### 2.3.1. Struktura i sinteza glikozida

Glikozidi su acetali ili ketali cikličke aldoze ili ketoze. Drugim riječima, to je skupina organskih spojeva u kojoj je anomerna hidroksilna skupina ugljikohidratne komponente (monosaharid ili kraći oligosaharid) zamijenjena nekom drugom neacilnom skupinom, poput ugljikohidratne ili neke druge skupine (aglikonska komponenta). Veza između glikonske i aglikonske komponente glikozida naziva se glikozidnom vezom, a s obzirom na to da aglikonska komponenta može potjecati od alifatskih i aromatskih alkohola, tiola i amina, razlikujemo *O*- (*O*-glikozidi), *S*- (tioglikozidi) i *N*- (glikozilamini) glikozidnu vezu (slika 18a,b). *O*-glikozidna veza prisutna je također i između ugljikohidratnih jedinica di-, oligo- te polisaharida. Osim navedenih, postoje i spojevi s *C*-glikozidnom vezom (slika 18c).<sup>37</sup>

Glikozidi su u prirodi najrasprostranjeniji u biljkama, a mnogi od njih se koriste u terapijske svrhe, gdje djeluju protuupalno, laksativno, kao antipiretici, analgetici, diuretici, antioksidansi, kardiotonici i tako dalje. Njihova efikasnost ovisi o obje komponente glikozida, dok biološko djelovanje i primjena obično ovisi o odgovarajućem aglikonu. Biološki aktivna vrsta ne mora biti sam glikozid, nego može biti i neki od njegovih metabolita.<sup>38</sup>

Slika 18. Strukturne formule a) *O*-glikozida i tioglikozida, b) glikozilamina i c) *C*-glikozilnih spojeva

Za efikasno biološko djelovanje glikozida, osim samih komponenata, iznimno je važan način njihovog povezivanja, odnosno konfiguracija na anomernom ugljikovom atomu (slika 19). Tako je za efikasno antiadhezijsko djelovanje manoznih derivata 3,4-HP preduvjet da konfiguracija na anomernom ugljikovom atomu manoze bude  $\alpha$ , što je detaljnije opisano u poglavlju 2.3.2.

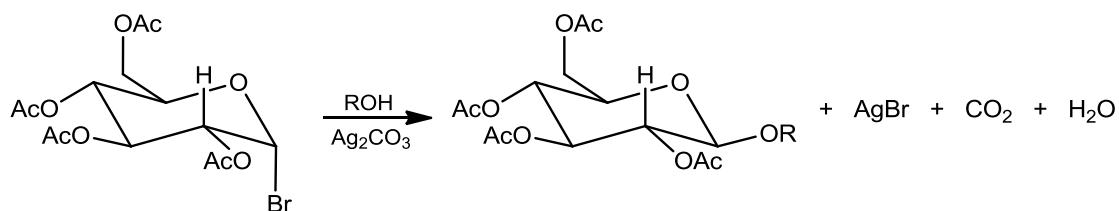
Slika 19. Strukturne formule  $\alpha$ - i  $\beta$ -D-manopiranozida<sup>39</sup>

Iako se priroda pobrinula da se reakcija glikozilacije u sintezi kompleksih poli- i oligosaharida odvija neprestano besprijekorno, u laboratorijskoj je praksi ishode ove reakcije često teško predvidjeti zbog nemogućnosti efikasne kontrole stereoselektivnosti reakcije, što je iznimno važno u kemijskoj sintezi, a posljedica je nepotpunog razumijevanja mehanizama ove reakcije.<sup>39</sup> Otkako je Arthur Michael 1879. godine uspješno proveo prvu kemijsku sintezu glikozida,<sup>40</sup> mnogi su se znanstvenici posvetili istraživanju ovog tipa reakcije i razvoju različitih metoda mijenjajući izlazne skupine, promotore, zaštitne skupine, otapala i ostale reakcijske uvjete koji mogu utjecati na ishod reakcije u svrhu dobivanja željenog produkta.<sup>39</sup> Među prvima se našao Emil Fischer koji je za pripremu *O*-glikozida koristio nezaštićeni monosaharid i odgovarajući alkohol u prisutnosti kiseline kao katalizatora. Reakcija se pokazala nestereoselektivnom rezultirajući smjesom anomera različite veličine prstena, piranozida i furanozida, čiji omjer ovisi o reakcijskim uvjetima te o stabilnosti svakog izomera, stoga je prikladna samo za pripravu manjih alkilnih glikozida.<sup>41</sup>

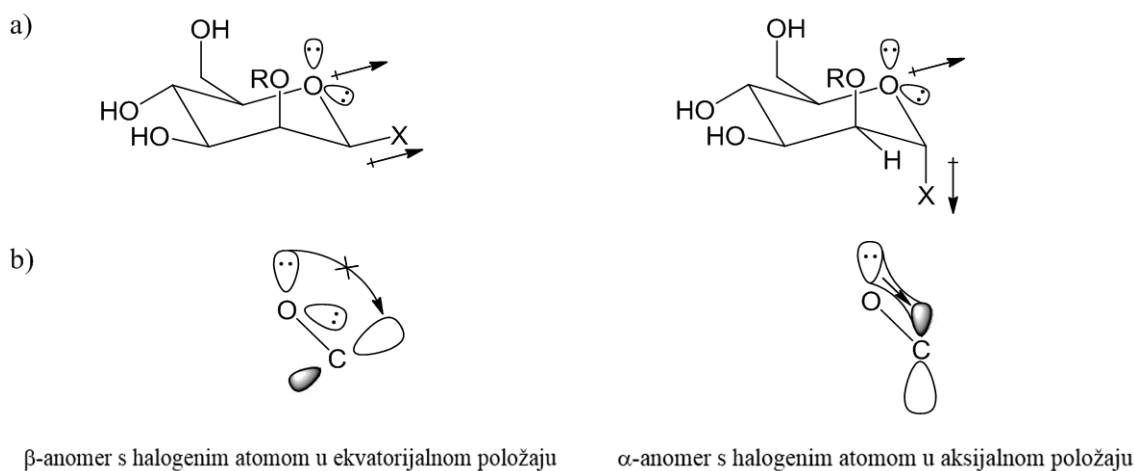
Kako se korištenjem nezaštićenog ugljikohidrata, unatoč jednostavnosti metode, ne postiže željena selektivnost, kasnije razvijene metode temeljile su se na upotrebi već zaštićenog ugljikohidrata definirane veličine prstena, po uzoru na već poznatu Michaelovu metodu. Najčešće korištene metode su imidatna te Koenigs-Knorrova metoda. Imidatna metoda temelji se na korištenju trikloacetimidatnog glikozida kao glikozilnog donora koji se dobiva reakcijom zaštićenog ugljikohidrata i trikloracetonitrila u prisutnosti baze ( $K_2CO_3$ , NaH). Ova metoda je prikladna za pripravu svih vrsta glikozida, od *O*-glikozida do *C*-glikozilnih spojeva, ovisno o upotrebljenom nukleofilu. Iako je trikloacetimidatna skupina dobra izlazna skupina, da bi reakcija glikozidacije bila potpuna, potrebno ju je aktivirati promotorima poput AgOTf, TMSOTf ili  $BF_3 \times Et_2O$ .<sup>42</sup>

### 2.3.1.1. Koenigs-Knorrova reakcija

Nekoliko godina nakon razvoja Fisherove metode glikozilacije, poučeni prednostima odnosno nedostacima prethodnih metoda, Koenigs i Knorr 1901. godine razvijaju metodu glikozilacije koja se i danas široko primjenjuje za pripravu različitih *O*-glikozida s jednostavnim i kompleksnim alkilnim i arilnim skupinama vezanim na anomerni ugljikov atom, uključujući oligosaharide. Općenito se može reći da se ova metoda temelji na reakciji peracetiliranog glikozil-halogenida i odgovarajućeg alkohola u prisutnosti soli teških metala i/ili organske baze. Izvorna metoda uključivala je, uz odgovarajući bromid i alkohol, srebrov oksid i srebrov nitrat koji su imali ulogu i promotora i akceptora kiseline nastale reakcijom (slika 20).<sup>39,43</sup> Međutim, sve šira upotreba dovela je do različitih modifikacija metode u smislu korištenja različitih promotora ( $Ag_2O$ ,  $Ag_2CO_3$ , AgOTf,  $CdCO_3$ ,  $Hg(CN)_2$ ), različitih inertnih otapala niske polarnosti (diklormetan, cikloheksan, petroleter, dioksan, benzen) i sredstava za sušenje ( $Na_2SO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $CaCl_2$ , drierit ( $CaSO_4 \times 0,5 H_2O$ )) u svrhu uklanjanja vode iz reakcijske smjese.<sup>44</sup> Određeni promotori i organske baze ponašaju se kao akceptori kiseline čime se ubrzava reakcija i sprječavaju neželjene sporedne reakcije poput deacetiliranja, transesterifikacije ili transglikozilacije. Bolji prinosi uočeni su dodatkom joda kao katalizatora, snažnim miješanjem te zaštitom reakcijske smjese od svjetlosti.<sup>42</sup>

Slika 20. Priprava glikozida Koenigs-Knorrovom reakcijom uz srebrov oksid kao promotor<sup>11</sup>

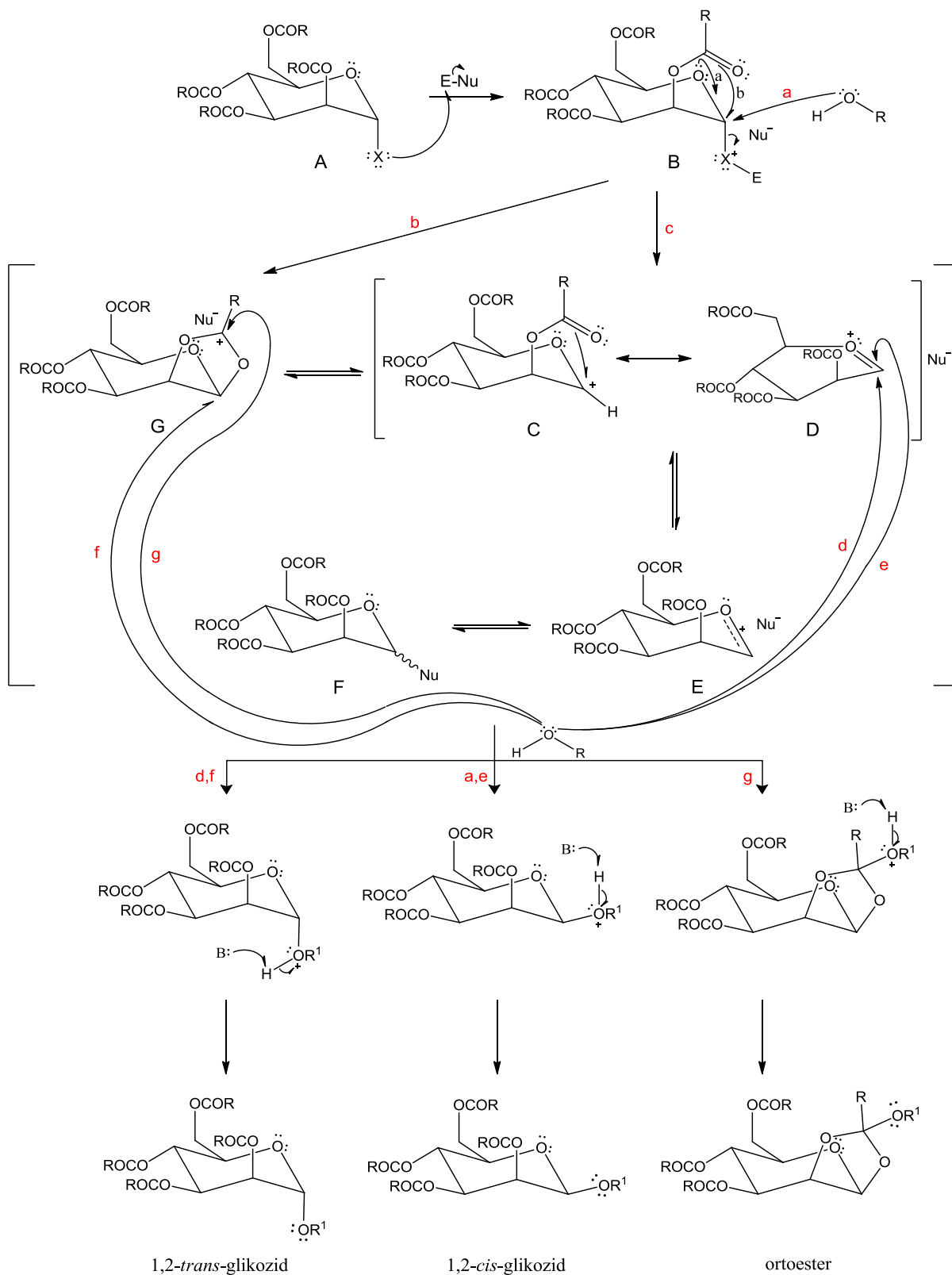
Jedan od važnih faktora u reakciji jest reaktivnost spojeva što se odražava na učestalost njihove upotrebe. Tako se u ovoj reakciji najčešće upotrebljavaju glikozil-bromid zahvaljujući dobroj reaktivnosti, ali i stabilnosti. Kloridi se također uspješno primjenjuju iako su manje reaktivni, međutim fluoridi su dosta nereaktivni u uvjetima Koenigs-Knorrove reakcije, a jodidi nestabilni pa je njihova praktična primjena zanemariva. Svima im je zajedničko da im je halogeni supstituent na anomernom ugljikovom atomu smješten u aksijalni položaj. To je posljedica anomernog efekta što takav anomer čini termodinamički stabilnijim i u uobičajenim reakcijskim uvjetima samo će on biti prisutan u otopini. Anomerni efekt može se objasniti time što destabilizirajuće elektrostatske odbojne interakcije između nepodijeljenih parova endocikličkog kisikovog atoma i halogenog atoma, koje su inače prisutne u slučaju kad se halogeni atom nalazi u ekvatorijalnom položaju, ne postoje kada je on smješten u aksijalni položaj (slika 21a). Također, može se objasniti i hiperkonjugacijom donosno premještanjem nepodijeljenog elektronskog para kisika u praznu protuveznu orbitalu ugljika što djeluje stabilizirajuće na elektron-odvlačeći halogeni atom vezan na taj ugljikov atom (slika 21b).<sup>39,41</sup>

Slika 21. Anomerni efekt: a) elektrostatske interakcije, b) hiperkonjugacija<sup>39</sup>

Unatoč mnogim pokušajima da se utvrdi mehanizam ove reakcije, mnogi aspekti reakcijskog mehanizma i danas su nerazjašnjeni. Uzrok tome je heterogenost reakcijskih uvjeta uslijed praktične primjene ove metode, kao i nekvantitativni prinosi, što ograničava primjenu klasičnih fizikalno-organskih metoda u proučavanju ove reakcije.<sup>43</sup> U nastavku je predložen pojednostavljeni mehanizam kojim se djelomično može objasniti stereokemijski ishod Koenigs-Knorrove reakcije s ograničenom količinom alkohola (nesolvolička reakcija) u prisutnosti topljivog promotora i organske baze (slika 22).

Reakcija započinje interakcijom elektrofilnog promotora s glikozilnim donatorom A pri čemu nastaje aktivirana vrsta, donor-promotor kompleks B. Atom halogena ovime poprima parcijalni pozitivan naboj i dolazi do smanjenja elektronske gustoće na anomernom C-atomu pa on postaje podložniji nukleofilnom napadu. Ovaj korak može biti ireverzibilan ili reverzibilan ovisno o sustavu. Disocijacijom halogenida B nastaje glikozilni karbokation C koji je stabiliziran preko oksokarbenijevog iona D, i koji može u otopini postojati kao slobodan ion, u obliku otapalom odijeljenog ionskog para ili intimnog ionskog para E. Nukleofilna vrsta (Nu) može biti sam halogenid, protuion promotora, a može potjecati i od otapala, aditiva, vlage. Interakcija s nukleofilnom vrstom iz reakcijskog medija može rezultirati nastankom druge reaktivne vrste (F) ili nereaktivnih sporednih produkata. Ako je na ugljikov atom C-2 vezana acilna skupina, disocijacija halogenida bit će potpomognuta intramolekulskim nukleofilnim napadom esterske skupine na ugljikov atom C-1 (participacija susjedne skupine) te dolazi do nastajanja aciloksonijevog iona G. Bilo koji od navedenih intermedijera može reagirati s alkoholom i ovisno o strukturi dati određeni produkt u dva koraka koji uključuju nukleofilni napad alkohola i prijenos protona.<sup>39,41,45</sup>

Relativne brzine svih mogućih reakcija i njihov doprinos sadržaju produkata ovise o reakcijskim uvjetima i strukturnim karakteristikama reaktanata. Prema tome, ishodi Koenigs-Knorrove reakcije su izrazito osjetljivi čak i na male promjene u prirodi otapala, temperaturi, strukturi reaktanata i njihovoj koncentraciji, tipu akceptora kiseline, itd.<sup>43</sup>



Slika 22. Shema predloženog mehanizma Koenigs-Knorrve reakcije u prisutnosti topljivog promotora i organske baze



Koenigs-Knorrova reakcija s acilglikozil-halogenidom kao reaktantom uslijed participacije susjedne skupine rezultira nastankom 1,2-*trans*-glikozida kao glavnog produkta. Naime, participacija esterske skupine uzrokuje znatno smanjenje energije aktivacije pa je reakcijski put koji uključuje aciloksonijev ion povoljniji od bimolekulske nukleofilne supstitucije halogenida ili neke druge izlazne skupine ili reakcijskog puta koji ide preko intimnog ionskog para.<sup>43</sup> Nastajanje ortoestera i 1,2-*cis*-glikozida u manjim količinama primjećeno je korištenjem 1,2-*trans*-glikozil-halogenida,<sup>39</sup> dok navedeni produkti nisu karakteristični za 1,2-*cis*-glikozil-halogenide.<sup>43</sup> 1,2-*cis*-glikozidi mogu se dobiti korištenjem neparticipirajuće zaštitne skupine na C-2, primjerice benzilne skupine (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>-), ili upotrebom živinih soli kao promotora.<sup>41</sup>

Jedan od ciljeva ovog rada jest Koenigs-Knorrovom metodom manozilirati odabrane *N*-arilne 3,4-HP koristeći 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranozu kao glikozilni donor uz srebrov triflat (srebrov trifluormetansulfonat, AgOTf) kao promotor te ukloniti acetatne zaštitne skupine poznatim Zemplénovim postupkom odnosno korištenjem katalitičke količine natrijeva metoksida u metanolu.

### 2.3.2. *Biološko djelovanje manokonjugata*

Jedan od osnovnih bioloških fenomena u prirodi jest specifična adhezija receptora i liganda. Zahvaljujući tom fenomenu omogućene su interakcije stanica, stanično prepoznavanje i signalizacija, vezanje bakterija i virusa na ciljane stanice te stvaranje biofilma na medicinskim implantatima. Ovaj proces obično je posredovan interakcijama protein-protein, protein-lipid i protein-ugljikohidrat.<sup>46</sup>

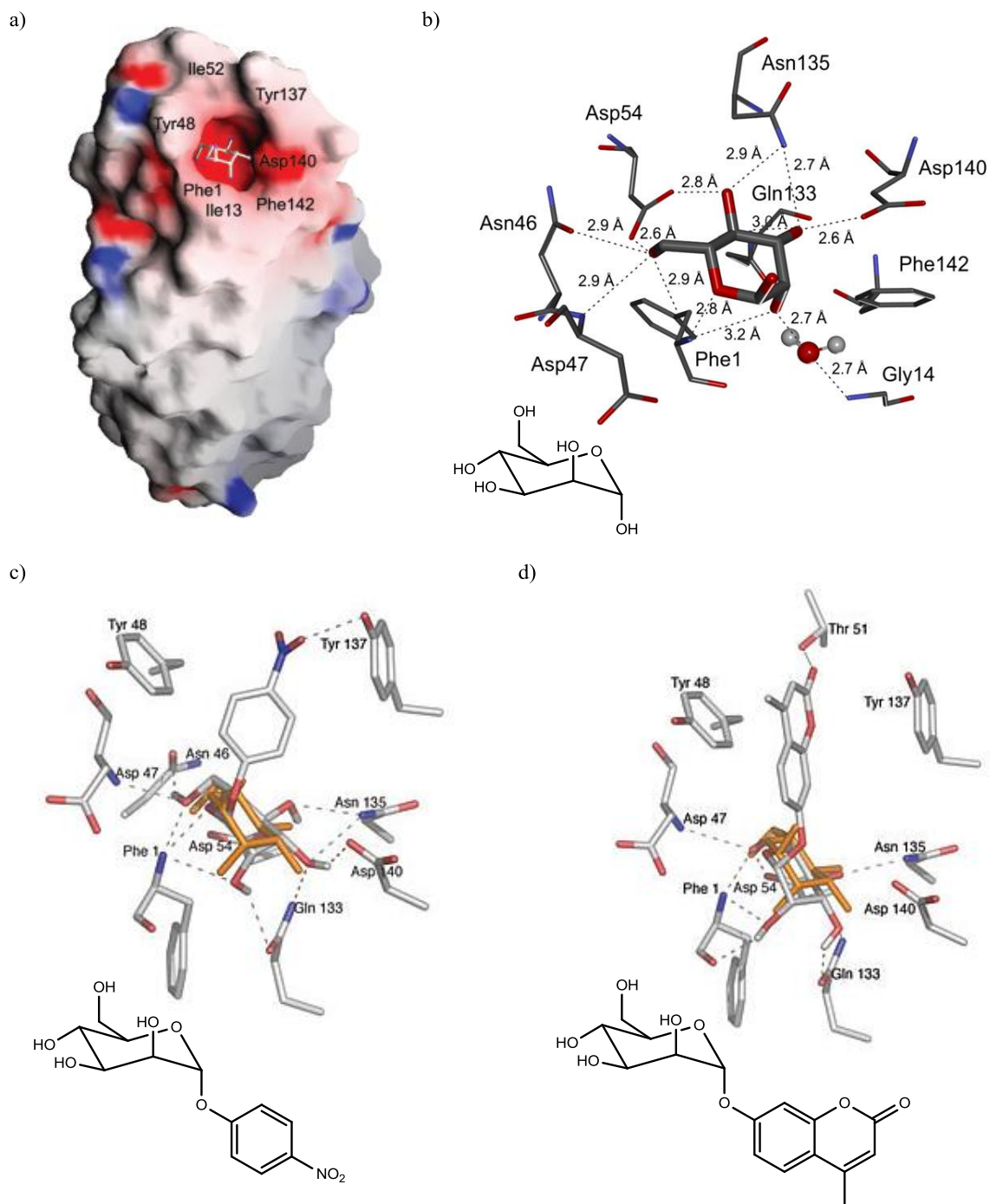
Mnogi organizmi, od biljaka i mikroorganizama do kralježnjaka, uključujući čovjeka, posjeduju lektine,<sup>47</sup> proteine koji vežu komplementarne ugljikohidrate na površini stanica domaćina i imaju sposobnost aglutinacije eritrocita i drugih tipova stanica, a mogu biti različitih struktura i imati različite funkcije.<sup>5</sup> Lektinima smještenim na površini infektivnog organizma posredovana je adhezija patogenih organizama na stanice domaćina koja uzrokuje većinu infektivnih bolesti.<sup>8</sup> Kako bi se spriječio nastanak mikrobijalnih bolesti, osmišljen je koncept antiadhezijske terapije koji se bazira na principu sprječavanja interakcija između lektina i ugljikohidrata na tkivu domaćina unošenjem odgovarajućih ugljikohidratnih antagonista lektina, što je dobra alternativa antibioticima u liječenju infektivnih bolesti s obzirom na sve veći broj bakterija s razvijenom otpornošću na antibiotike.<sup>5,8</sup>

Gram-negativne bakterije posjeduju različite lektine, smještene na adhezivnim organelima zvanim fimbrije ili pili, koji specifično vežu različite ugljikohidrate. Najvažniji i najbolje okarakterizirani lektin na površini patogena *Escherichia coli*, uzročnika jedne od najčešćih bakterijskih infekcija, infekcije urinarnog trakta, i ostalih bakterija u porodici *Enterobacteriaceae* jest manozno-specifičan protein FimH smješten na vrhu tip 1 fimbrije. Do sada je ispitan inhibitorski potencijal mnoštva prirodnih, ali i sintetiziranih manoznih liganada u svrhu razvoja prikladnih antagonista FimH proteina. Nakon ranih istraživanja temeljenih na prirodnim manozidima i oligosaharidima, brojne studije posvećene su multivalentnim glikomimeticima koji pokazuju veliki afinitet vezanja na FimH<sup>5</sup> i time velik stupanj inhibicije hemaglutinacije. Međutim, nisu prikladni za oralnu uporabu zbog velike molarne mase, velike polarnosti i male permeabilnosti kroz gastrointestinalni trakt.<sup>8</sup>

Na temelju ispitivanja inhibitorskog potencijala serije oligosaharida i odnosa strukture i aktivnosti serije jednostavnih manozida kojima je variran aglikon predstavljen je prvi model veznog mjesta lektina FimH, međutim smisleni dizajn odgovarajućih FimH inhibitora omogućen je tek rješavanjem kristalne strukture cikloheksilbutanoil-*N*-hidroksietil-D-glukamida, D-manoze, *n*-butil-manozida i oligomanoze-3 vezane na FimH/FimC šaperon-adhezin kompleks.<sup>5</sup> Istraživanja su pokazala da se u duboko smješteno i negativno nabijeno vezno mjesto FimH savršeno smješta jedan  $\alpha$ -D-manozni ostatak koji polarnim hidroksilnim skupinama stvara vodikove veze s bočnim lancima polarnih aminokiselina i prisutnom vodom (slika 23a,b)<sup>5,7</sup> te da se na ulazu u vezno mjesto nalaze dva aromatska ostatka, Tyr48 i Tyr137, koji čine tzv. *tirozinska vrata*. Ta dva aromatska ostatka mogu stvoriti povoljne  $\pi$ - $\pi$  interakcije s aromatskom aglikonskom podjedinicom manozida, poput *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-manozida (pNPMan) i 5-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-manozida (MeUmbMan) (slika 23c,d), što te spojeve čini dobrim inhibitorima hemaglutinacije.<sup>5,8</sup>

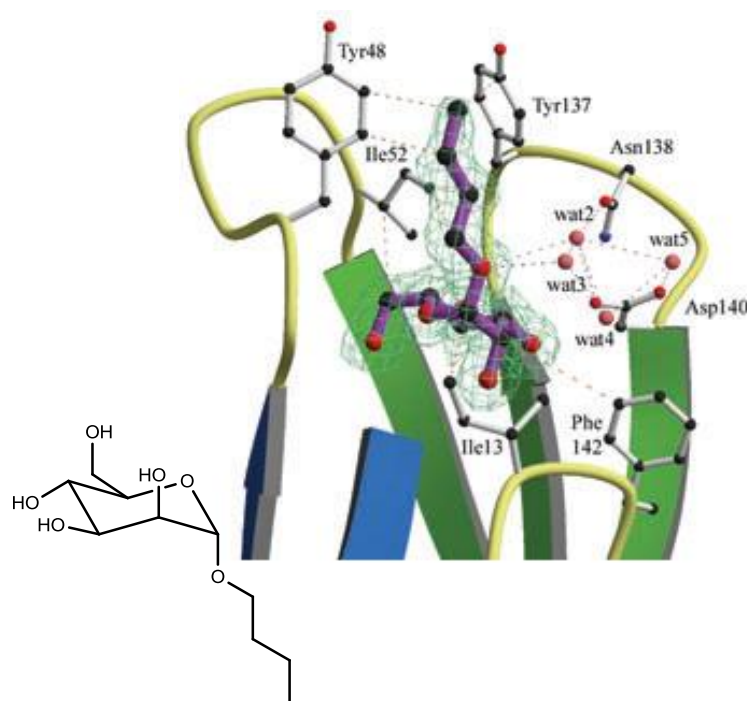
Osim navedenih interakcija, veliku uogu u stabilizaciji kompleksa manoznih spojeva i ovog proteina imaju CH- $\pi$  hidrofobne interakcije mnogih nepolarnih CH skupina koje potječu od liganada i aromatskih ostataka prisutnih u veznom i na ulazu u vezno mjesto FimH.<sup>7</sup>

Kako bi se ispitao doprinos ovih interakcija sintetizirana je serija manozida s alkilnim aglikonom, uključujući *n*-butil-manozid. Uočen je porast afiniteta različitih alkilnih  $\alpha$ -D-manozida s porastom duljine aglikonskog alkilnog lanca, što je posljedica porasta broja nepolarnih CH skupina koje interagiraju s tirozinskim ostacima te dodatno s Ile52 na ulazu u vezno mjesto FimH (slika 24).<sup>5</sup> Ovakvi rezultati doveli su do ideje sinteze manozida s dva



Slika 23. a) Kristalna struktura FimCH šaperon-adhezin kompleksa s vezanom D-manozom (prikaz aminokiselinskih ostataka: pozitivno nabijeni – plavo, negativno nabijeni – crveno, neutralni i hidrofobni – bijelo; posebno naznačeni hidrofobni aminokiselinski ostaci smješteni oko veznog mjesta)<sup>48</sup>; b) interakcije  $\alpha$ -D-manoze s aminokiselinskim ostacima i vodom unutar veznog mjesta FimH<sup>8</sup>; interakcije c) pNPMan i d) MeUmbMan s aminokiselinskim ostacima unutar veznog mjesta FimH (za usporedbu narančastom bojom prikazan kristalografski određen položaj  $\alpha$ -D-manoze)<sup>49</sup>

aglikonska arilna sustava, poput bifenilnih manozida, koji bi, uslijed jačih  $\pi$ - $\pi$  interakcija, imali veći afinitet prema FimH i time veći inhibitorski potencijal u odnosu na one s jednim arilnim sustavom.<sup>8</sup>



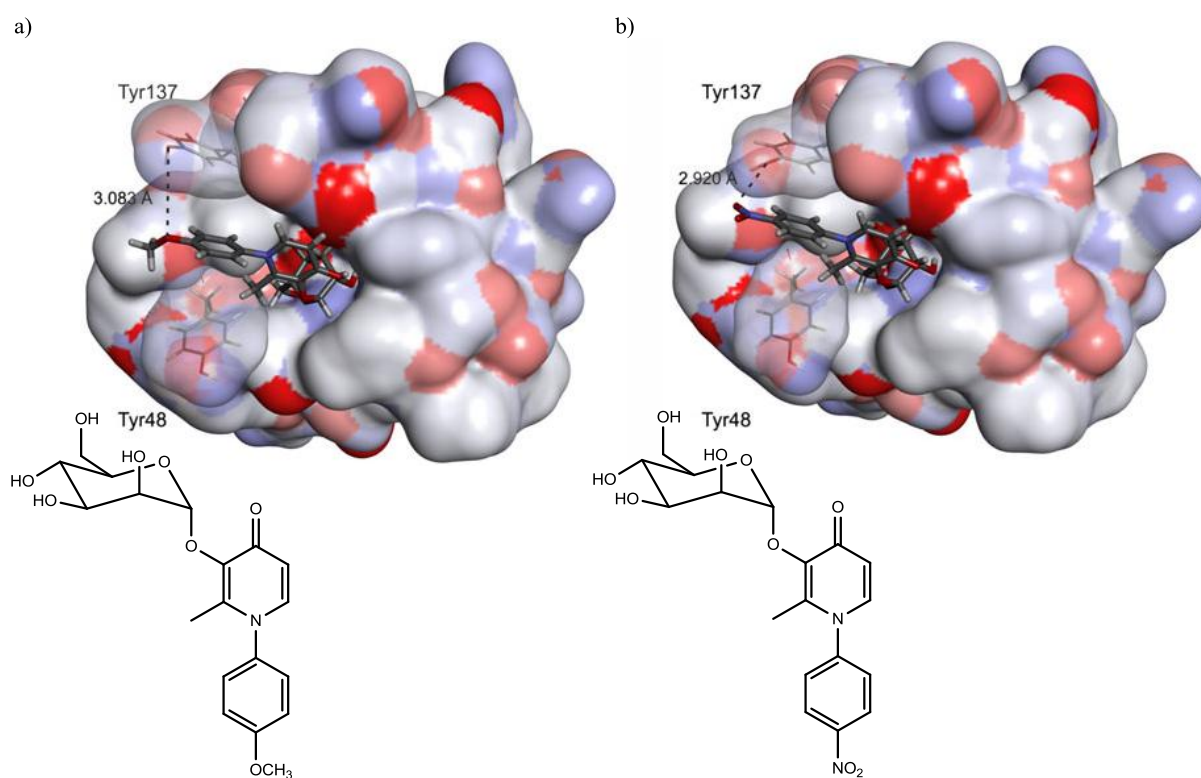
Slika 24. Interakcije *n*-butil- $\alpha$ -D-manozida s aminokiselinskim ostacima i vodom unutar veznog mjesta FimH<sup>49</sup>

### 2.3.3. Manozni derivati 3,4-HP

Skupina spojeva koja posjeduje sve potrebne strukturne karakteristike inhibitora FimH su monovalentni manozidi s *N*-aril-supstituiranim 3,4-HP aglikonom. Bolji potencijal inhibicije hemaglutinacije u odnosu na referentni spoj metil- $\alpha$ -D-manopiranozid (MeMan) te velik broj mogućih strukturnih modifikacija čini ih zanimljivim predmetom daljnjih istraživanja u ove svrhe.<sup>3,9</sup>

Dosad je pripravljena serija *N*-aril-supstituiranih 3,4-HP manozida s metilnom, metoksi- i nitro-skupinom u *para* i *meta* položaju na fenilnom produžetku 3,4-HP jezgre kod kojih je osnovni 3,4-HP skelet izveden iz maltola. Istražen je utjecaj položaja skupina i same prirode skupina na afinitet vezanja na FimH testom inhibicije hemaglutinacije. Specifične interakcije odgovorne za uočenu aktivnost prema bakterijskom FimH lektinu objašnjenje su studijom molekuskog modeliranja.<sup>8,9</sup> Rezultati su pokazali da supstituenti na fenilnom dijelu, bilo u *para* ili *meta* položaju, povoljno utječu na inhibitorska svojstva ovih spojeva zbog

hidrofobnih interakcija s Tyr48 i Tyr137. Metoksi- i nitro-skupine povoljnije djeluju ako su smještene u *para* položaju, što bi se moglo objasniti nastajanjem povoljnih vodikovih veza između tih skupina i hidroksilne skupine na Tyr137 ostatku u veznom mjestu FimH (slika 25), dok metilna skupina kao hidrofobni supstituent povećava afinitet ovih spojeva prema FimH ako se nalazi u *meta* položaju. Ovi podatci usmjeravaju na dodatne kemijske modifikacije 3,4-HP aglikonskog dijela kojima bi se mogla poboljšati inhibitorska svojstva i time dizajnirati efikasniji antagonisti FimH lektina.<sup>9,10</sup>



Slika 25. Optimizirane strukture kompleksa odabranih *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona s FimH<sup>8</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

U sintezama su korišteni komercijalno dostupni reagensi i otapala: 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on (kojična kiselina, *Sigma-Aldrich*), benzil-klorid (*Sigma-Aldrich*), kromov(VI) oksid (*Kemika*), *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, *Merck*), *m*-metilanilin (*Aldrich*), *m*-metoksianilin (*Aldrich*), *m*-nitroanilin (*Aldrich*), *p*-metilanilin (*Merck*), *p*-nitroanilin (*Aldrich*), D-(+)-manoza (*Sigma-Aldrich*), anhidrid octene kiseline (*Sigma-Aldrich*), 33 %-tna otopina HBr/AcOH (*Fluka*), kolidin (*Fluka*), srebrov triflat (AgOTf, *Fluka*), natrijev metoksid u metanolu (NaOMe/MeOH; 25 %, *Sigma-Aldrich*), natrijev hidroksid (*Merck*), sumporna kiselina (*Sigma-Aldrich*), klorovodična kiselina (*Sigma-Aldrich*), bezvodni natrijev sulfat (*Merck*), univerzalni indikator (*Macherey-Nagel*), metanol (*Fluka*), dietil-eter (*Merck*), petroleter (*Carlo Erba Reagents*), aceton (*Sigma-Aldrich*), etil-acetat (*Fluka*), toluen (*Kemika*), diklormetan (*Lach-Ner*), 1,4-dioksan (*Sigma-Aldrich*), benzen (*Kemika*), acetonitril (*Sigma-Aldrich*). Sva korištena otapala su pročišćavana i sušena uobičajenim postupcima.<sup>50</sup>

Spojevi su pročišćavani kolonskom kromatografijom sa silikagelom kao stacionarnom fazom (0,063-200 mm, *Sigma-Aldrich*) ili prekrystalizacijom iz odgovarajućeg otapala. Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkata korištena je tankoslojna kromatografija na pločicama silikagela (60 F 254, 0,25 mm, *Fluka*) uz detekciju UV svjetlom ( $\lambda = 254$  nm), reverzibilnom adicijom joda i 10 % sumpornom kiselinom uz zagrijavanje. Za tankoslojnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu korišteni su sljedeći sustavi otapala:

Sustav A: etil-acetat / metanol, 10 : 1, v/v

Sustav B: etil-acetat / metanol, 5 : 2, v/v

Sustav C: etil-acetat / metanol, 5 : 1, v/v

Sustav D: benzen / etil-acetat, 1 : 1, v/v

Sustav E: acetonitril / metanol / voda, 5 : 1 : 1, v/v/v.

Dobiveni spojevi su identificirani pomoću nuklearne magnetske rezonancije i spektrometrije masa.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker Avance III HD pri 400 MHz te 100 MHz u deuteriranom dimetilsulfoksidu ( $\text{DMSO-}d_6$ ), deuteriranom kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) ili deuteriranom metanolu ( $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$ ) pri čemu su kemijski pomaci izraženi prema tetrametilsilanu ( $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ , TMS) kao unutarnjem standardu u ppm vrijednostima.

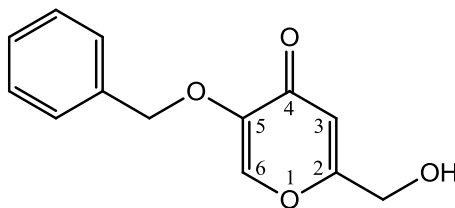
Spektri masa snimljeni su na spektrometru masa Agilent 6410 uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI).

Optičko skretanje je mjereno na polarimetru Schmidt + Haensch Polartronic NH8 pri sobnoj temperaturi.

## 3.2. Priprava prekursora 1 i 2 za sintezu novih *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona

### 3.2.1. Priprava 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (1)

U otopinu kojične kiseline (1 g, 7 mmol) u metanolu (7 mL) doda se vodena otopina natrijeva hidroksida (700  $\mu\text{L}$ ,  $c = 11 \text{ mol dm}^{-3}$ , 7,7 mmol). Dobivena smjesa zagrije se do temperature povratnog hlađenja (refluks). U vruću smjesu dokapa se benzil-klorid (894  $\mu\text{L}$ , 7,8 mmol). Dobivena reakcijska smjesa refluksira se 20 sati uz miješanje te se dodaje ponovno vodena otopina natrijeva hidroksida iste koncentracije (3,85 mmol), metanol (2 mL) i dokapa benzil-klorid (447  $\mu\text{L}$ , 3,9 mmol). Reakcijska smjesa se refluksira još 4 sata, a tijekom reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A) uz detekciju UV svjetlom i reverzibilnom adicijom joda.<sup>51</sup> Nakon što je reakcija završena, otapalo se djelomično upari pod sniženim tlakom i reakcijska smjesa se hladi u ledenoj kupelji. Iskristalizirani svjetlosmeđi produkt se odfiltrira preko sinter lijevka i ispere smjesom otapala eter i petroleter (eter : petroleter = 1 : 1,  $v/v$ ). Matičnica se djelomično upari i hladi u ledenoj kupelji pri čemu kristalizira nova količina produkta koji se odfiltrira također uz ispiranje. Postupak se ponavlja do prestanka kristalizacije produkta. Produkt se dodatno pročisti kolonskom kromatografijom (sustav otapala A). Dobiveni spoj **1** je blijedo žute boje (1,38 g, 84 %); *t.t.* 124,0-126,2 °C;  $R_f = 0,50$  (sustav otapala A) (slika 26).



Slika 26. Strukturna formula spoja 1

$^1\text{H NMR}$  spoj 1 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  / ppm: 8,16 (s, 1H, H-6), 7,34-7,41 (m, 5H, H-Ar), 6,32 (s, 1H, H-3), 5,66 (s, 1H, OH), 4,96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4,29 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-O).

$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  / ppm: 173,08 (C=O), 167,88 (C-2), 146,48 (C-5), 141,20 (C-6), 136,05-127,95 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 111,07 (C-3), 70,49 (CH<sub>2</sub>-Ar), 59,20 (CH<sub>2</sub>-O).

ESI-MS:  $m/z$  255,1 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 3.2.2. Oksidacija 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (1)

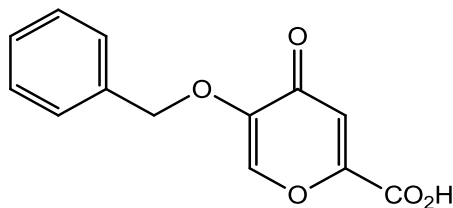
#### 3.2.2.1. Priprava Jonesovog reagensa

Kromov(VI) oksid otopi se u destiliranoj vodi (12,5 mL). U dobivenu otopinu dokapa se koncentrirana sumporna kiselina (5,8 mL). Nastali tamnocrveni kristali otope se dodatkom destilirane vode (4,8 mL). Tamnocrvena otopina se čuva u frižideru (do tjedan dana) i koristi po potrebi za pripravu spoja 2.<sup>11</sup>

#### 3.2.2.2. Priprava 5-benziloksipiran-4-on-2-karboksilne kiseline (2)

Spoj 1 (1 g, 4,3 mmol) otopi se u acetonu (50 mL) uz miješanje. Otopina se ohladi u ledenoj kupelji i doda se Jonesov reagens (3,7 mL). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj mješalici 2 sata uz održavanje temperature. Dobiveni zeleni talog se odfiltrira preko Büchnerovog lijevka uz ispiranje acetonom. Matičnica se upari pod sniženim tlakom nakon čega se doda minimalni volumen metanola potreban da se u otopini primijeti bijeli talog. Nastali bijeli produkt se odfiltrira. Matičnica se ponovno upari i doda se metanol pri čemu kristalizira nova količina produkta. Postupak se ponavlja do prestanka njegove kristalizacije. Čisti spoj 2 u obliku bijelih igličastih kristala dobije se prekrizacijom iz metanola (355 mg, 67 %); *t.t.* 184,9-185,9 °C, lit.<sup>52</sup> 129-130 °C;  $R_f$  = 0,20 (sustav otapala B) (slika 27).





Slika 27. Strukturna formula spoja 2

$^1\text{H NMR}$  spoj 2 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  / ppm: 8,36 (s, 1H, H-6), 7,45-7,35 (m, 5H, H-Ar), 6,95 (s, 1H, H-3), 4,98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, Bn).

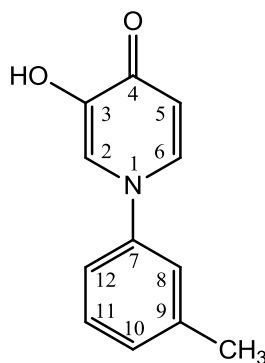
$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  /ppm: 172,92 (C=O), 160,69 (C=O, CO<sub>2</sub>H), 152,44 (C-2), 148,14 (C-5), 141,39 (C-6), 135,72 (C-Ar), 128,15, 128,23, 128,4 (CH-Ar), 117,07 (C-3), 70,57 (CH<sub>2</sub>, Bn).

ESI-MS:  $m/z$  269,1 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 3.3. Priprava novih *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona 3-7

#### 3.3.1. Priprava 3-hidroksi-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (3)

Spoju 2 (450 mg, 1,83 mmol) doda se *m*-metilanilin (196  $\mu\text{L}$ , 1,83 mmol), *p*-TsOH (0,183 mmol) i voda (7 mL). Reakcija se provodi u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklav) 48 h pri temperaturi od 150 °C.<sup>11</sup> Reakcijska smjesa se ohladi, te kiselo-bazno ekstrahira na sljedeći način: doda se vodena otopina natrijeva hidroksida ( $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ , 30 mL) i vodeni sloj se ekstrahira dva puta s etil-acetatom ( $2 \times 30 \text{ mL}$ ); sakupljeni organski slojevi se ekstrahiraju s vodenom otopinom NaOH ( $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ , 30 mL). Spojeni slojevi bazične vodene otopine neutraliziraju se s 10 %-tnom vodenom otopinom HCl do pH 7. Neutralna vodena otopina ekstrahira se s etil-acetatom tri puta ( $3 \times 50 \text{ mL}$ ) nakon čega se organski sloj suši pomoću bezvodnog natrijeva sulfata te upari. Produkt, spoj 3, je nakon uparavanja uljast, žućkastosmeđe boje, no kristalizira duljim stajanjem na zraku (201 mg, 55 %); *t.t.* 151,5-153,0 °C (raspad);  $R_f = 0,15$  (sustav otapala C) (slika 28).



Slika 28. Strukturna formula spoja 3

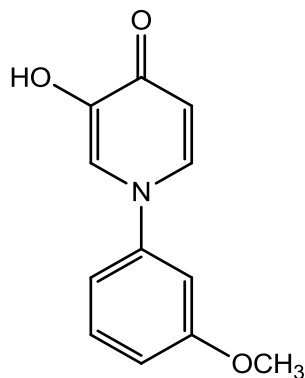
$^1\text{H NMR}$  spoj 3 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  / ppm: 7,85 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 7,12$  Hz,  $J_{2,6} = 1,53$  Hz, H-6), 7,75 (d, 1H,  $J_{2,6} = 1,61$  Hz, H-2), 7,43 (t, 1H,  $J = 7,77$  Hz, H-Ar), 7,34-7,28 (m, 3H, H-Ar), 6,56 (d, 1H,  $J_{5,6} = 7,18$  Hz H-5), 2,43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  /ppm: 173,10 (C=O), 149,65 (C-3), 144,88 (C-N), 140,90 (C-CH<sub>3</sub>), 138,11 (C-6), 131,05 (C-2), 130,53, 124,75, 124,07, 121,25 (4 CH, Ar), 114,79 (C-5), 21,36 (CH<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  202,0 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.3.2. Priprava 3-hidroksi-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (4)

Spoju 2 (450 mg, 1,83 mmol) doda se *m*-metoksianilin (205,4  $\mu\text{L}$ , 1,83 mmol), *p*-TsOH (0,183 mmol) i voda (7 mL). Reakcija se provodi u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklav) 48 h pri temperaturi od 150 °C. Reakcijska smjesa se ohladi u ledenoj kupelji, a zatim se bijeli talog (spoj 4) filtrira preko sinter lijevka uz ispiranje s destiliranom vodom. Vodena matičnica i smeđe-crni talog zaostao u autoklavu obrađeni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.1 pri čemu je izolirano još produkta. Talози spoja 4 se sakupe, suše na zraku te važu (217,3 mg, 52 %); *t.t.* 172,3 °C (raspad);  $R_f = 0,21$  (sustav otapala C) (slika 29).



Slika 29. Strukturna formula spoja 4

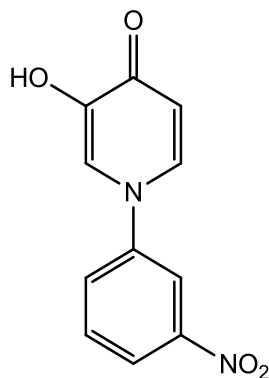
**$^1\text{H NMR}$**  spoj 4 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  / ppm: 7,90 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 7,37$  Hz,  $J_{2,6} = 2,48$  Hz, H-6), 7,75 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,48$  Hz, H-2), 7,43 (t, 1H,  $J = 8,07$  Hz, H-Ar), 7,14-7,10 (m, 2H, H-Ar), 7,01-6,98 (m, 1H, H-Ar), 6,31 (d, 1H,  $J_{5,6} = 7,35$  Hz H-5), 3,83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  /ppm: 170,94 (C=O), 160,10 (OCH<sub>3</sub>), 147,84 (C-3), 144,05 (C-N), 136,20 (C-6), 130,61 (C-2), 120,74, 113,64, 113,08, 108,20 (4 CH, Ar), 114,46 (C-5), 55,49 (OCH<sub>3</sub>).

**ESI-MS:**  $m/z$  218,0 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.3.3. Priprava 3-hidroksi-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (5)

Spoju 2 (450 mg, 1,83 mmol) doda se *m*-nitroanilin (252,5 mg, 1,83 mmol), *p*-TsOH (0,183 mmol) i voda (7 mL). Reakcija se provodi u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklav) 48 h pri temperaturi od 150 °C. Reakcijska smjesa se ohladi u ledenoj kupelji. Nastali žuti kristali spoja 5 filtriraju se uz ispiranje destiliranom vodom i suše na zraku (174,6 mg, 41 %); *t.t.* 261,8 °C (raspad);  $R_f = 0,19$  (sustav otapala C) (slika 30). U zaostaloj matičnici tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala C) nije primijećena znatnija količina produkta pa ona nije dalje dodatno obrađivana.



Slika 30. Strukturna formula spoja 5

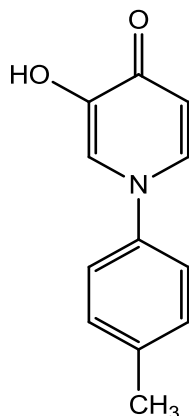
**$^1\text{H NMR}$**  spoj 5 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  / ppm: 8,41 (t, 1H,  $J = 2,09$  Hz, H-Ar), 8,26 (dd, 1H,  $J = 8,14$  Hz,  $J = 2,09$  Hz, H-Ar), 8,07 (dd, 1H,  $J = 8,02$  Hz,  $J = 1,72$  Hz, H-Ar), 8,02 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 7,40$  Hz,  $J_{2,6} = 2,38$  Hz, H-6), 7,87 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,39$  Hz, H-2), 7,43 (t, 1H,  $J = 8,18$  Hz, H-Ar), 7,14-7,10 (m, 2H, H-Ar), 6,35 (d, 1H,  $J_{5,6} = 7,39$  Hz H-5).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  /ppm: 171,27 (C=O), 148,32 (C-NO<sub>2</sub>), 147,91 (C-3), 143,032 (C-N), 136,28 (C-6), 131,16 (C-2), 129,13, 122,10, 120,50, 113,49 (4 CH, Ar), 117,81 (C-5).

**ESI-MS:**  $m/z$  233,0 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.3.4. Priprava 3-hidroksi-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-ona (6)

Spoju 2 (450 mg, 1,83 mmol) doda se *p*-metilanilin (195,8 mg, 1,83 mmol), *p*-TsOH (0,183 mmol) i voda (7 mL). Reakcija se provodi u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklav) 48 h pri temperaturi od 150 °C. Reakcijska smjesa se ohladi u ledenoj kupelji. Bijeli kristali (spoj 6) filtriraju se preko sinter lijevka uz ispiranje s destiliranom vodom. Vodeni filtrat se ekstrahira tri puta s etil-acetatom (3 × 30 mL). Slojevi etil-acetata se spoje i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon uparavanja etil-acetata, nastali talog spoja 6 se trituiru acetonom. Smeđe-crni talog zaostao u autoklavu trituiru se sa smjesom acetona i dietil-etera (acetone / dietil-eter, 1 : 1,  $v/v$ ) do željene čistoće koja se provjerava tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala B). Talozni produkta se sakupe, suše na zraku i izvažu (203,4 mg, 55 %); *t.t.* 193,5-195,2 °C;  $R_f = 0,18$  (sustav otapala B) (slika 31).

Slika 31. Strukturna formula spoja **6**

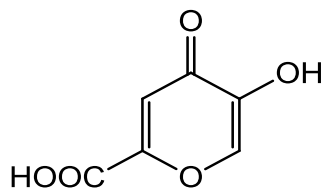
**<sup>1</sup>H NMR** spoj **6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  / ppm: 7,83 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 7,33$  Hz,  $J_{2,6} = 2,46$  Hz, H-6), 7,69 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,46$  Hz, H-2), 7,42-7,45 (m, 2H, H-Ar), 7,32-7,34 (m, 2H, H-Ar), 6,30 (d, 1H,  $J_{5,6} = 7,32$  Hz H-5), 2,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  / ppm: 170,72 (C=O), 147,89 (C-3), 140,64 (*p*-CH<sub>3</sub>), 137,22 (C-N), 136,16 (C-6), 130,14 (2 CH, Ar), 122,36 (2 CH, Ar), 120,77 (C-2), 113,02 (C-5), 20,33 (CH<sub>3</sub>).

**ESI-MS:**  $m/z$  202,1 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.3.5. Priprava 3-hidroksi-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (**7**)

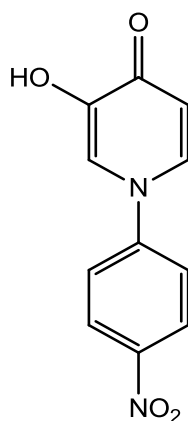
Spoju **2** (450 mg, 1,83 mmol) doda se *p*-nitroanilin (252,5 mg, 1,83 mmol), *p*-TsOH (0,183 mmol) i voda (7 mL). Reakcija se provodi u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklav) 48 h pri temperaturi od 150 °C. Reakcijska smjesa se ohladi u ledenoj kupelji. Žuti talog (nusprodukt, kromična kiselina (slika 32) se filtrira uz ispiranje s destiliranom vodom (99,8 mg, 35 %). Smeđe-crni talog zaostao u autoklavu se kiselo-bazno ekstrahira prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.1. Nakon uparavanja etil-acetata, dobiveni talog spoja **7** se trituiru dietil-eterom do željene čistoće koja se provjerava tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala C) i suši na zraku (114,6 mg, 27 %);  $R_f = 0,17$  (sustav otapala C) (slika 33).



Slika 32. Strukturna formula komenične kiseline

$^1\text{H NMR}$  nusprodukta ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  / ppm: 7,69 (s, 1H, H-6), 7,17 (s, 1H, H-3).

**ESI-MS:**  $m/z$  157,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



Slika 33. Strukturna formula spoja 7

$^1\text{H NMR}$  spoj 7 ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  / ppm: 8,35 (d, 2H,  $J = 9,00$  Hz, H-Ar), 8,04 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 7,41$  Hz,  $J_{2,6} = 2,15$  Hz, H-6), 7,88 (d, 2H,  $J = 9,19$  Hz, H-Ar), 6,37 (d, 1H,  $J_{5,6} = 7,44$  Hz, H-5).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  /ppm: 171,56 (C=O), 148,00 (C-NO<sub>2</sub>), 147,14 (C-3), 145,69 (C-N), 135,87 (C-6), 125,18 (C-2), 123,15 (2 CH, Ar), 119,99 (2 CH, Ar), 113,88 (C-5).

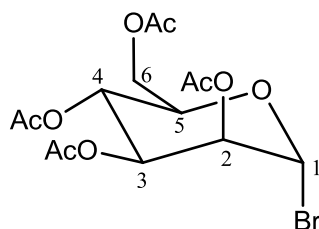
**ESI-MS:**  $m/z$  233,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3.4. Priprava acetilmanoznih derivata 8-12 Koenigs-Knorrovom metodom glikozidacije iz spojeva 3-7

#### 3.4.1. Priprava 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze

Ovaj spoj pripremljen je prema literaturno poznatom postupku.<sup>53</sup> D-manozi (1 g, 5,55 mmol) se doda svježe predestilirani acetanhidrid (5 mL). Uz miješanje, doda se 1,36 mL 33 %-tne otopine HBr u ledenoj octenoj kiselini (AcOH). Nakon što se manaza u potpunosti otopi,

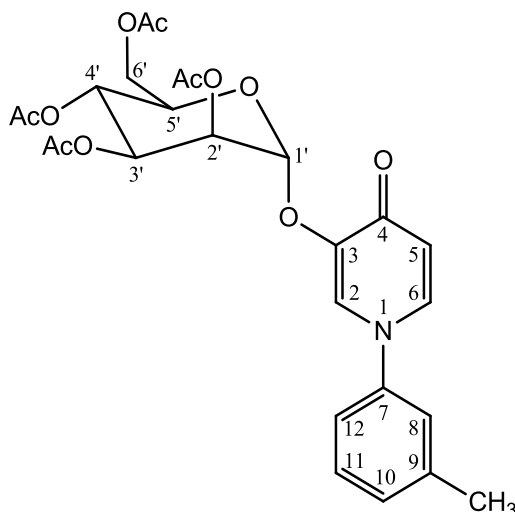
doda se još 6,3 mL 33 %-tne otopine HBr u AcOH. Stavi se klor-kalcijeva cjevčica na tikvicu i reakcija se provodi 2 h na sobnoj temperaturi bez prisutnosti svjetlosti (omotati aluminijskom folijom). Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala D) uz detekciju prskanjem 10 % sumpornom kiselinom uz zagrijavanje. Nakon 2 h reakcijska smjesa se upari uz kodestilaciju suhim toluenom, a sirovi blijedo žuti uljasti produkt se koristi za pripravu spojeva **8-12**;  $R_f = 0,51$  (sustav otapala D) (slika 34).



Slika 34. Strukturna formula 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze

#### 3.4.2. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (**8**)

Spoj **3** (163 mg, 0,81 mmol) otopi se u bezvodnom diklormetanu (4 mL). Otopini se doda kolidin (126,7  $\mu$ L, 0,96 mmol) i srebrov triflat (AgOTf, 245,6 mg, 0,96 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa uz hlađenje u suhom ledu. Nakon što se 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza otopi u bezvodnom diklormetanu (2 mL), potreban alikvot dobivene otopine (625  $\mu$ L, 666,1 mg, 1,62 mmol) se dokapa u ohlađenu reakcijsku smjesu i ostavi miješati 7 h bez prisutnosti svjetla (omotati aluminijskom folijom). Tada se doda još AgOTf (122,8 mg, 0,48 mmol). Reakcijska smjesa se ostavi miješati još 17 h bez prisutnosti svjetla. Tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala C) uz detekciju UV svjetlom i prskanjem 10 % sumpornom kiselinom uz zagrijavanje. Nakon 24 h reakcijska smjesa se profiltrira preko sinter lijevka prethodno napunjenog celiteom uz ispiranje s diklormetanom. Filtrat se potom ekstrahira tri puta: prvo hladnom destiliranom vodom, zatim hladnom 3 % klorovodičnom kiselinom te ponovo destiliranom vodom. Nakon sušenja organske faze na bezvodnom natrijevom sulfatu te uparavanja, dobivena smjesa se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala C). Uparavanjem otapala dobije se spoj **8** u obliku blijedo žute krutine (49,2 mg, 11 %);  $R_f = 0,12$  (sustav otapala C) (slika 35).

Slika 35. Strukturna formula spoja **8**

**<sup>1</sup>H NMR** spoj **8** (CDCl<sub>3</sub>) δ / ppm: 7,68 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,29$  Hz, H-2), 7,44 (t, 1H,  $J = 7,67$  Hz, H-Ar), 7,37 (d, 1H,  $J = 7,66$  Hz, H-Ar), 7,27-7,25 (m, 2H, H-Ar), 7,22 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,30$  Hz,  $J_{5,6} = 6,33$  Hz, H-6), 7,11 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,35$  Hz, H-5), 6,32 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 1,49$  Hz, H-1'), 5,69 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,57$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,87$  Hz, H-3'), 5,65 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,81$  Hz,  $J_{2',3'} = 3,54$  Hz, H-2'), 5,39 (app t, 1H,  $J = 9,92$ , H-4'), 4,31-4,21 (m, 2H, H-5', H6'a), 4,10 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,16$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,02$  Hz, H-6'b), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,20, 2,06, 2,02 (3 s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub>, Ac).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>) δ /ppm: 170,50, 169,74, 169,65 (4 C=O, Ac), 160,91 (C=O), 159,04 (C-3), 143,55 (C-N), 140,81 (C-CH<sub>3</sub>), 133,45 (C-6), 131,06 (C-2), 130,00, 124,04, 122,38, 120,46 (4 CH, Ar), 112,50 (C-5), 95,52 (C1'), 69,68, 68,97, 68,73, 65,91 (C2'-C5'), 62,06 (C6'), 21,31, 20,84, 20,68, 20,63 (4 CH<sub>3</sub>, Ac), 20,63 (CH<sub>3</sub>).

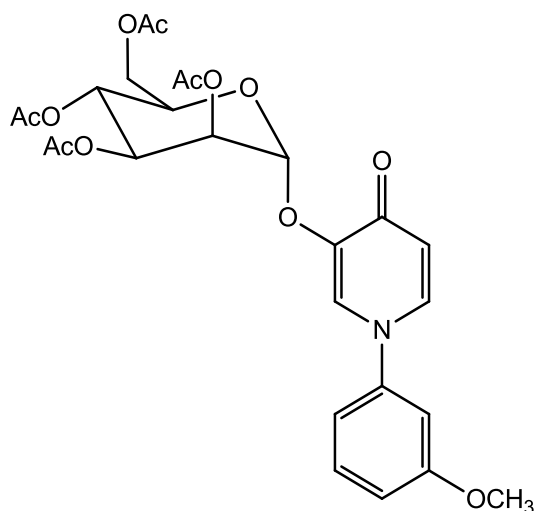
**ESI-MS:**  $m/z$  532,1 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.4.3. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (**9**)

Spoj **4** (315 mg, 1,45 mmol) otopi se u smjesi bezvodnih otapala, diklormetan (4 mL) i dioksan (4 mL). Otopini se doda kolidin (226,8  $\mu$ L, 1,71 mmol) i AgOTf (439,7 mg, 1,71 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa uz hlađenje u suhom ledu. Nakon što se 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza otopi u bezvodnom diklormetanu (2 mL), potreban alikvot dobivene otopine (2333  $\mu$ L, 1193 mg, 2,9 mmol) se dokapa u ohlađenu reakcijsku smjesu i ostavi miješati 7 h bez prisutnosti svjetla



(omotati aluminijskom folijom). Tada se doda još AgOTf (219,8 mg, 0,86 mmol). Reakcijska smjesa se ostavi miješati još 17 h bez prisutnosti svjetla. Reakcijska smjesa se obradi prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2. Uparavanjem otapala dobije se čisti spoj **9** u obliku smečkastožute krutine (126,9 mg, 16 %);  $R_f = 0,60$  (sustav otapala C) (slika 36).



Slika 36. Strukturna formula spoja **9**

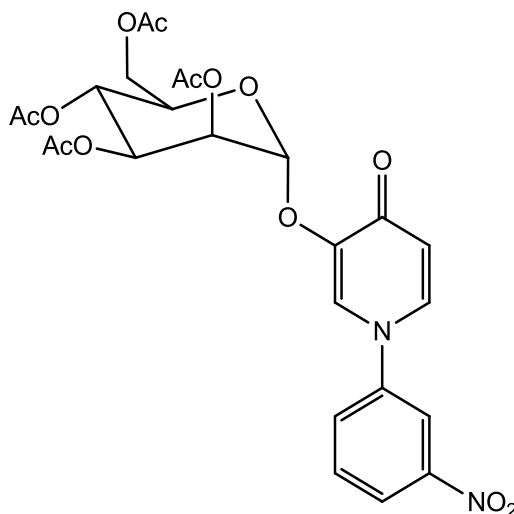
**$^1\text{H NMR}$**  spoj **9** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 7,70 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,29$  Hz, H-2), 7,46 (t, 1H,  $J = 8,19$  Hz, H-Ar), 7,24 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,31$  Hz,  $J_{5,6} = 6,34$  Hz, H-6), 7,12 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,37$  Hz, H-5), 7,09 (dd, 1H,  $J = 1,99$  Hz,  $J = 8,36$  Hz, H-Ar), 7,04 (dd, 1H,  $J = 1,41$  Hz,  $J = 7,90$  Hz, H-Ar), 6,98 (t, 1H,  $J = 2,17$  Hz, H-Ar), 6,30 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 1,34$  Hz, H-1'), 5,70 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,55$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,92$  Hz, H-3'), 5,65 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,80$  Hz,  $J_{2',3'} = 3,52$  Hz, H-2'), 5,39 (app t, 1H,  $J = 9,95$ , H-4'), 4,30-4,21 (m, 2H, H-5', H6'a), 4,10 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,18$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,04$  Hz, H-6'b), 3,88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2,20, 2,06, 2,02 (3 s, 12 H, 4  $\text{CH}_3$ , Ac).

**$^{13}\text{C NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 170,51, 169,77, 169,74, 169,68 (4 C=O, Ac), 160,95 (C=O), 160,73 (C- $\text{OCH}_3$ ), 159,21 (C-3), 144,53 (C-N), 133,70 (C-6), 131,05 (C-2), 122,42, 115,38, 112,41, 109,44 (4 CH, Ar), 115,98 (C-5), 95,54 (C1'), 69,73, 68,97, 68,73, 65,89 (C2'-C5'), 62,05 (C6'), 55,77 ( $\text{OCH}_3$ ), 20,84, 20,67, 20,64 (4  $\text{CH}_3$ , Ac), 20,63 ( $\text{CH}_3$ ).

**ESI-MS:**  $m/z$  548  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3.4.4. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (**10**)

Spoj **5** (181,2 mg, 0,78 mmol) otopi se u smjesi bezvodnih otapala, diklormetan (4 mL) i dioksan (4 mL). Otopini se doda kolidin (122,0  $\mu$ L, 0,92 mmol) i AgOTf (236,6 mg, 0,92 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa uz hlađenje u suhom ledu. Nakon što se 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza otopi u bezvodnom diklormetanu (2 mL), potreban alikvot dobivene otopine (459,3  $\mu$ L, 1,56 mmol) se dokapa u ohlađenu reakcijsku smjesu i ostavi miješati 7 h bez prisutnosti svjetla (omotati aluminijskom folijom). Tada se doda još AgOTf (118,3 mg, 0,46 mmol). Reakcijska smjesa se ostavi miješati još 17 h bez prisutnosti svjetla. Reakcijska smjesa se obradi prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2. Nakon sušenja organske faze na bezvodnom natrijevom sulfatu te uparavanja, dobivena smjesa se pročisti kolonskom kromatografijom (sustav otapala C) pri čemu se izolira spoj **10** u obliku žutog ulja (79 mg, 18 %);  $R_f = 0,10$  (sustav otapala C) (slika 37).



Slika 37. Strukturna formula spoja **10**

$^1\text{H NMR}$  spoj **10** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 8,47 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 1,26$  Hz,  $J_{5,6} = 8,08$  Hz, H-6), 8,43 (s, 1H, H-2), 7,93 (d, 1H,  $J = 7,70$  Hz, H-Ar), 7,85 (t, 1H,  $J = 7,99$  Hz, H-Ar), 7,69 (s, 1H, H-Ar), 7,30 (d, 1H,  $J = 5,13$  Hz, H-Ar), 7,19 (d, 1H,  $J = 6,01$  Hz, H-Ar), 6,32 (br s, 1H, H-1'), 5,65 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,54$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,92$  Hz, H-3'), 5,61 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,67$  Hz,  $J_{2',3'} = 3,49$  Hz, H-2'), 5,42 (app t, 1H,  $J = 10,00$ , H-4'), 4,29 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 4,29$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,28$  Hz,

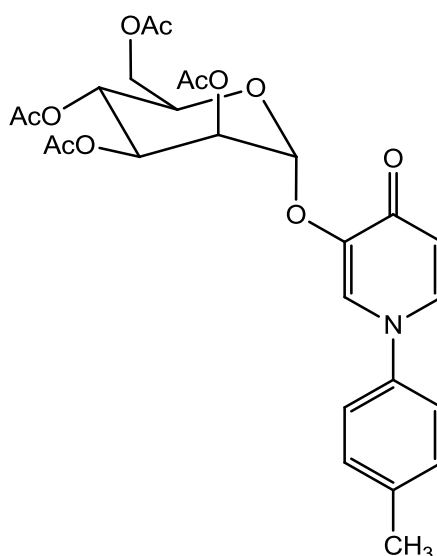
H-6'a), 4,23-4,19 (m, 1H, H-5'), 4.10 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,42$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,27$  Hz, H-6'b), 2,21, 2,07, 2,06, 2,02 (4 s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub>, Ac).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  /ppm: 170,48, 169,79, 169,70, 169,68 (4 C=O, Ac), 161,09 (C=O), 160,17 (C-NO<sub>2</sub>), 148,87 (C-3), 143,98 (C-N), 133,05 (C-6), 131,64 (C-2), 129,58, 125,17, 122,34, 112,64 (4 CH, Ar), 119,14 (C-5), 95,65 (C1'), 69,86, 68,84, 68,65, 65,76 (C2'-C5'), 61,98 (C6'), 20,82, 20,69, 20,67, 20,63 (4 CH<sub>3</sub>, Ac).

ESI-MS:  $m/z$  563,0 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.4.5. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-ona (11)

Spoj **6** (220 mg, 1,09 mmol) otopi se u smjesi bezvodnih otapala, diklormetan (3 mL) i dioksan (3 mL). Otopini se doda kolidin (171  $\mu$ L, 1,29 mmol) i AgOTf (331,4 mg, 1,29 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa uz hlađenje u suhom ledu. Nakon što se 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza otopi u bezvodnom diklormetanu (2 mL), potreban alikvot dobivene otopine (1291  $\mu$ L, 2,18 mmol) se dokapa u ohlađenu reakcijsku smjesu i ostavi miješati 7 h bez prisutnosti svjetla (omotati aluminijskom folijom). Tada se doda još AgOTf (165,7 mg, 0,65 mmol). Reakcijska smjesa se ostavi miješati još 17 h bez prisutnosti svjetla te se obradi prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2. Uparavanjem otapala dobije se čisti spoj **11** u obliku blijedo žute krutine (294,4 mg, 51 %);  $R_f = 0,17$  (sustav otapala C) (slika 38).



Slika 38. Strukturna formula spoja **11**

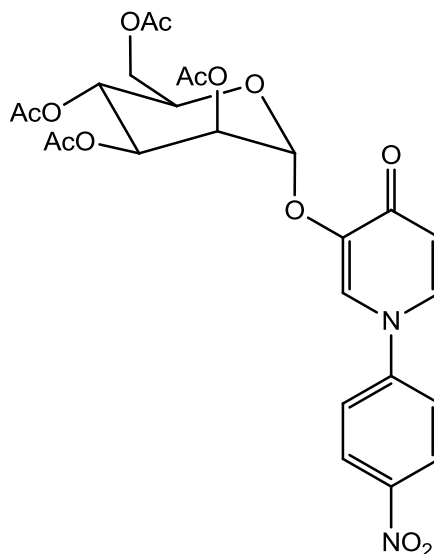
<sup>1</sup>H NMR spoj **11** (CDCl<sub>3</sub>) δ / ppm: 7,64 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,08$  Hz, H-2), 7,33 (br s, 4H, H-Ar), 7,21 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,04$  Hz,  $J_{5,6} = 6,23$  Hz, H-6), 7,10 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,30$  Hz, H-5), 6,19 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 0,92$  Hz, H-1'), 5,71 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,54$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,98$  Hz, H-3'), 5,62 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,71$  Hz,  $J_{2',3'} = 3,46$  Hz, H-2'), 5,39 (app t, 1H,  $J = 9,96$ , H-4'), 4,29-4,20 (m, 2H, H-5', H6'a), 4,08 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 1,98$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 11,98$  Hz, H-6'b), 2,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,18, 2,04, 2,00 (3 s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub>, Ac).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ /ppm: 170,50, 169,77, 169,66 (4 C=O, Ac), 160,75 (C=O), 159,03 (C-3), 141,17 (*p*-CH<sub>3</sub>), 140,81 (C-N), 133,67 (C-6), 130,70 (2 CH, Ar), 123,16 (2 CH, Ar), 122,85 (C-2), 112,06 (C-5), 95,53 (C-1'), 69,72, 68,99, 68,71, 65,84 (C2'-C5'), 62,02 (C6'), 21,08, 20,81, 20,66, 20,61 (4 CH<sub>3</sub>, Ac), 20,66 (CH<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  532,2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 3.4.6. Priprava 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona (**12**)

Spoj **7** (247 mg, 1,06 mmol) otopi se u smjesi bezvodnih otapala, diklormetan (4 mL) i dioksan (4 mL). Otopini se doda kolidin (166,4  $\mu$ L, 1,26 mmol) i AgOTf (322,5 mg, 1,26 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa uz hlađenje u suhom ledu. Nakon što se 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza otopi u bezvodnom diklormetanu (2 mL), potreban alikvot dobivene otopine (685,9  $\mu$ L, 2,13 mmol) se dokapa u ohlađenu reakcijsku smjesu i ostavi miješati 7 h bez prisutnosti svjetla (omotati aluminijskom folijom). Tada se doda još AgOTf (161,3 mg, 0,628 mmol). Reakcijska smjesa se ostavi miješati još 17 h bez prisutnosti svjetla. Tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala C) nije primijećen nastanak produkta **12** (slika 39) pa nije provedena obrada reakcijske smjese.

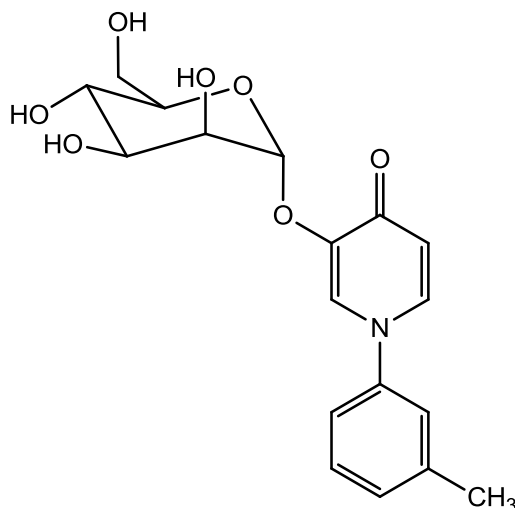


Slika 39. Strukturna formula spoja 12

### 3.5. Priprava manoznih derivata 13-16 Zemlénovim postupkom iz spojeva 8-11

#### 3.5.1. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (13)

Spoj 8 (40,4 mg, 0,076 mmol) otopi se u bezvodnom metanolu (2,5 mL) te se doda 25 % otopina natrijevog metoksida u metanolu (0,25 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj mješalici u atmosferi argona 30 minuta. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala E) uz detekciju UV svjetlom i prskanjem 10 % sumpornom kiselinom uz zagrijavanje. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se filtrira preko sinter lijevka napunjenog silikagelom. Produkt se ispere sa silikagela pomoću metanola te dodatno pročisti kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala E). Dobije se spoj 13 (slika 40) u obliku blijedo žute krutine (16,1 mg, 58 %);  $R_f = 0,22$  (sustav otapala E).

Slika 40. Strukturna formula spoja **13**

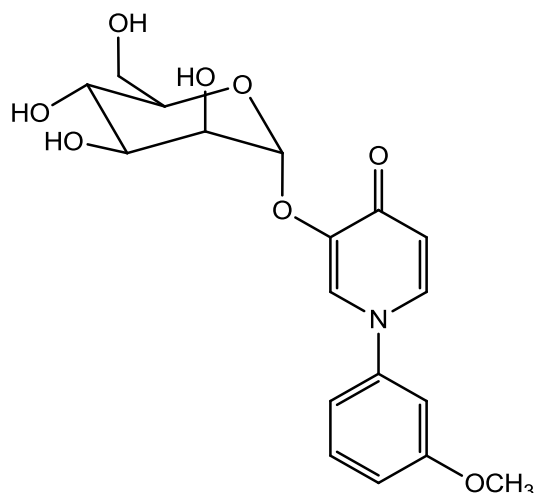
**<sup>1</sup>H NMR** spoj **13** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,87 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,15$  Hz,  $J_{5,6} = 6,62$  Hz, H-6), 7,78 (br s, 1H, H-2), 7,56 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,67$  Hz, H-5), 7,51 (t, 1H,  $J = 7,70$  Hz, H-Ar), 7,49-7,41 (m, 3H, H-Ar), 5,78 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 1,28$  Hz, H-1'), 4,19 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,83$ ,  $J_{2',3'} = 3,21$  Hz, H-2'), 4,14 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,15$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,34$  Hz, H-3'), 3,81 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,18$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,01$  Hz, H-6'b), 3,75-3,69 (m, 2H, H-4', H-6'a), 3,57-3,53 (m, 1H, H-5'), 2,47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  /ppm: 162,21 (C=O), 159,49 (C-3), 145,02 (C-N), 142,21 (C-CH<sub>3</sub>), 132,54 (C-6), 132,17 (C-2), 131,19, 130,25, 125,42, 121,96 (4 CH, Ar), 112,02 (C-5), 100,64 (C1'), 76,63, 71,94, 71,38, 68,30 (C2'-C5'), 62,77 (C6'), 21,30 (CH<sub>3</sub>).

**ESI-MS:**  $m/z$  364 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.5.2. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (**14**)

Spoj **9** (41 mg, 0,075 mmol) otopi se u bezvodnom metanolu (2,5 mL) te se doda 25 % otopina natrijevog metoksida u metanolu (0,25 ekv.). Reakcijska smjesa se postavi, prati i obradi prema uvjetima opisanima u postupku 3.5.1. Dobije se spoj **14** (slika 41) u obliku bijele krutine (21,1 mg, 74 %);  $R_f = 0,19$  (sustav otapala E).

Slika 41. Strukturna formula spoja **14**

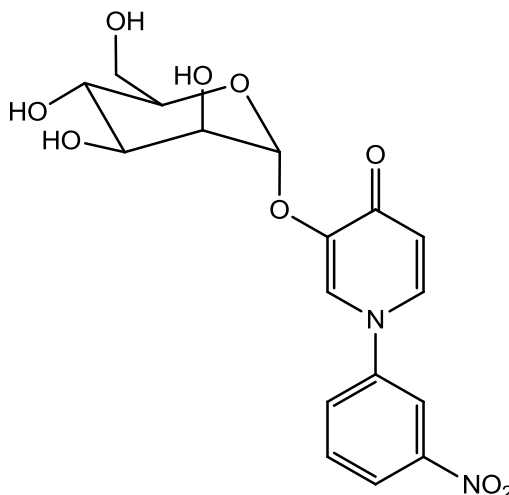
**<sup>1</sup>H NMR** spoj **14** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,88 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,14$  Hz,  $J_{5,6} = 6,62$  Hz, H-6), 7,78 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,13$  Hz, H-2), 7,55 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,54$  Hz, H-5), 7,52 (d, 1H,  $J = 8,09$  Hz, H-Ar), 7,21-7,17 (m, 3H, H-Ar), 5,78 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 1,99$  Hz, H-1'), 4,19-4,18 (m, 1H, H-2'), 4,13 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,41$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,41$  Hz, H-3'), 3,89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,82 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,10$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,02$  Hz, H-6'b), 3,75-3,69 (m, 2H, H-4', H-6'a), 3,56-3,52 (m, 1H, H-5'), 2,47.

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  /ppm: 162,40 (C=O), 159,64 (C-OCH<sub>3</sub>, C-3), 146,04 (C-N), 132,64 (C-6), 132,25 (C-2), 130,12, 116,83, 111,94, 110,83 (4 CH, Ar), 117,19 (C-5), 100,60 (C1'), 76,62, 71,94, 71,39, 68,29 (C2'-C5'), 62,77 (C6'), 55,41 (OCH<sub>3</sub>).

**ESI-MS:**  $m/z$  380 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3.5.3. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (**15**)

Spoj **10** (60,2 mg, 0,107 mmol) otopi se u bezvodnom metanolu (2,5 mL) te se doda 25 % otopina natrijevog metoksida u metanolu (0,25 ekv.). Reakcijska smjesa se postavi, prati i obradi prema uvjetima opisanim u postupku 3.5.1. Dobije se spoj **15** (slika 42) u obliku žute krutine (27,8 mg, 66 %);  $R_f = 0,18$  (sustav otapala E).

Slika 42. Strukturna formula spoja **15**

$^1\text{H NMR}$  spoj **15** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 8,59 (t, 1H,  $J = 2,09$  Hz, H-Ar), 8,49 (dd, 1H,  $J = 1,32$  Hz,  $J = 8,28$  Hz, H-Ar), 8,10 (dd, 1H,  $J = 1,38$  Hz,  $J = 8,05$  Hz, H-Ar), 7,98 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,23$  Hz,  $J_{5,6} = 6,63$  Hz, H-6), 7,91 (t, 1H,  $J = 8,18$  Hz, H-Ar), 7,84 (d, 1H,  $J = 2,26$  Hz, H-2), 7,61 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,67$  Hz, H-5), 5,81 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 1,53$  Hz, H-1'), 4,20 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,83$ ,  $J_{2',3'} = 3,38$  Hz, H-2'), 4,13 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,45$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,42$  Hz, H-3'), 3,82 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,29$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,03$  Hz, H-6'b), 3,75-3,69 (m, 2H, H-4', H-6'a), 3,56-3,52 (m, 1H, H-5').

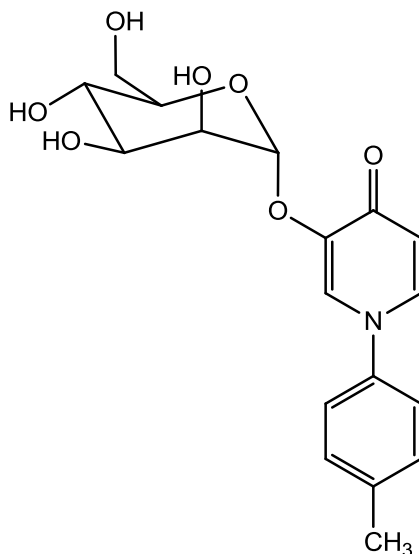
$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  /ppm: 163,01 (C=O), 159,87 (C- $\text{NO}_2$ ), 150,34 (C-3), 145,36 (C-N), 132,72 (C-6), 132,29 (C-2), 131,41, 130,35, 126,11, 112,08 (4 CH, Ar), 120,83 (C-5), 100,69 (C1'), 76,70, 71,94, 71,36, 68,27 (C2'-C5'), 62,76 (C6').

ESI-MS:  $m/z$  395  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 3.5.4. Priprava 3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-ona (**16**)

Spoj **11** (110,7 mg, 0,21 mmol) otopi se u bezvodnom metanolu (2,5 mL) te se doda 25 % otopina natrijevog metoksida u metanolu (0,25 ekv.). Reakcijska smjesa se postavi, prati i obradi prema uvjetima opisanima u postupku 3.5.1. Dobije se spoj **16** (slika 43) u obliku blijedo smeđe krutine (62,7 mg, 57 %);  $R_f = 0,20$  (sustav otapala E).



Slika 43. Strukturna formula spoja **16**

**<sup>1</sup>H NMR** spoj **16** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,85 (dd, 1H,  $J_{2,6} = 2,26$  Hz,  $J_{5,6} = 6,64$  Hz, H-6), 7,74 (d, 1H,  $J_{2,6} = 2,25$  Hz, H-2), 7,55 (d, 1H,  $J_{5,6} = 6,69$  Hz, H-5), 7,52-7,43 (m, 4H, H-Ar), 5,76 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 1,74$  Hz, H-1'), 4,18 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1,90$ ,  $J_{2',3'} = 3,42$  Hz, H-2'), 4,12 (dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3,47$  Hz,  $J_{3',4'} = 9,40$  Hz, H-3'), 3,81 (dd, 1H,  $J_{5',6'b} = 2,33$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 12,03$  Hz, H-6'b), 3,74-3,69 (m, 2H, H-4', H-6'a), 3,57-3,52 (m, 1H, H-5'), 2,48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  /ppm: 162,12 (C=O), 159,65 (C-3), 142,69 (*p*-CH<sub>3</sub>), 142,18 (C-N), 132,49 (C-6), 131,83 (2 CH, Ar), 130,08 (C-2), 124,67 (2 CH, Ar), 111,99 (C-5), 100,56 (C-1'), 76,58, 71,93, 71,37, 68,28 (C2'-C5'), 62,73 (C6'), 21,18 (CH<sub>3</sub>).

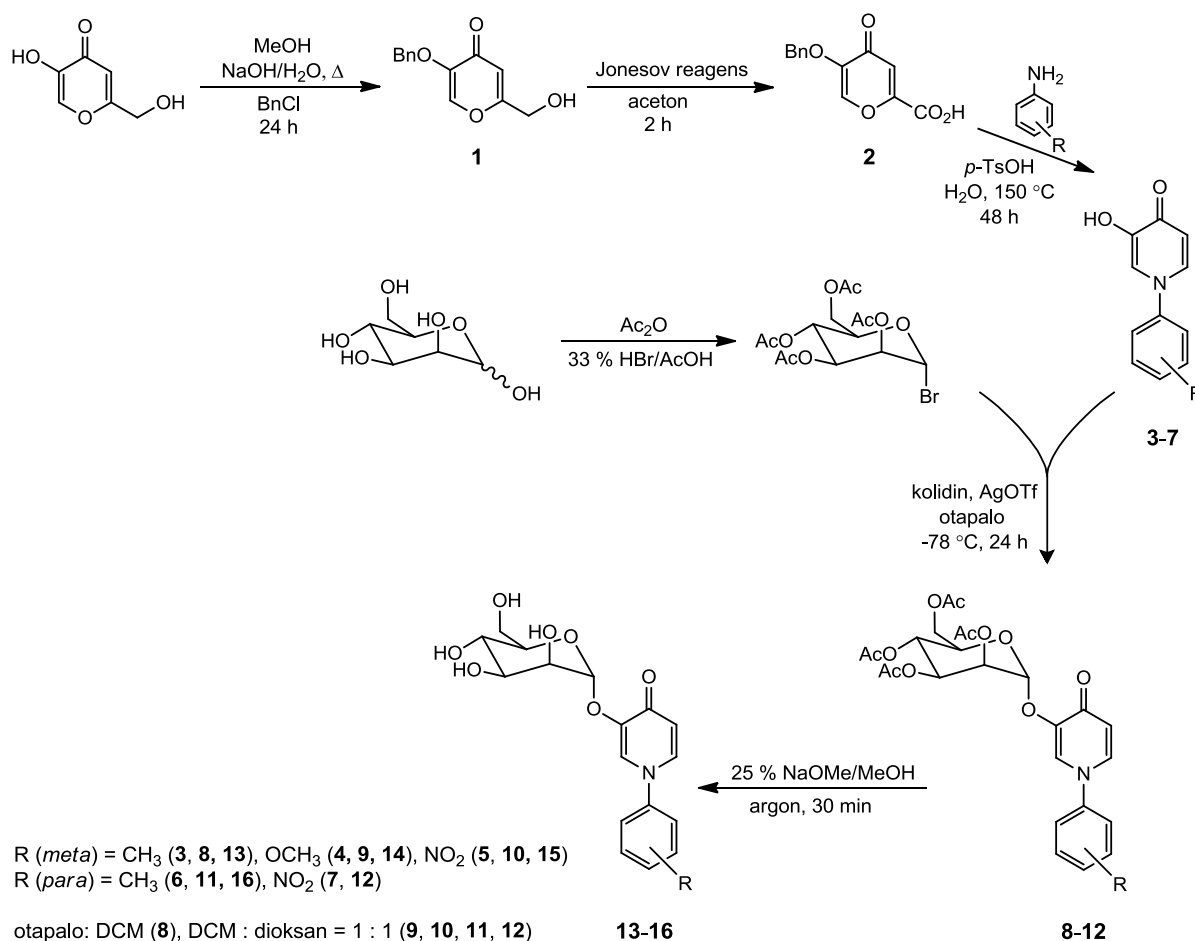
**ESI-MS:**  $m/z$  386,1 [M+Na]<sup>+</sup>.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Derivati heterocikličkih 3,4-HP svestrani su biološki agensi. Jedna od brojnih bioloških aktivnosti je antiadhezijska, koju pokazuju njihovi manozni derivati.<sup>10</sup>  $\alpha$ -manozidi s *N*-aril-supstituiranim 3,4-HP kao aglikonom posjeduju sve strukturne karakteristike potencijalnog inhibitora manozno-specifičnog FimH proteina pomoću kojeg se *E. coli* veže na površinu endotelne stanice urinarnog trakta i uzrokuje infekciju. Prethodno sintetizirani 3-hidroksi-2-metilpiridin-4-onski  $\alpha$ -manozidi pokazali su znatan antiadhezijski učinak (slika 2). Međutim, studije molekuskog modeliranja sugeriraju da bi se ta aktivnost mogla poboljšati uklanjanjem metilne skupine na položaju 2 te je cilj ovog diplomskog rada bio pripremiti upravo takve 3,4-HP manozide (slika 3).<sup>6,8,9</sup> Prije samog vezanja manoze trebalo je osmisliti sintezu derivata 3,4-HP koji neće na položaju 2 imati metilnu skupinu, odnosno zamijeniti maltol korišten u prethodnim sintezama odgovarajućim piranonskim derivatom koji nema metil u navedenom položaju. Takav piranonski sustav nije komercijalno dostupan, no pregledom literature utvrđeno je da se do njega može doći u nekoliko sintetskih koraka ako se kao polazni 3-hidroksipiran-4-on upotrijebi kojična kiselina.

Sintetski put pripreme odabranih *meta* i *para* supstituiranih *N*-arilnih 3,4-HP  $\alpha$ -manozida (**13-16**) prikazan je na slici 44. *N*-arilni 3,4-HP **3-7** sintetizirani su iz 5-benzilkomenične kiseline **2**, koja se dobiva iz kojične kiseline, i odgovarajućih primarnih aromatskih amina, *m*- i *p*-metilanilina, *m*- i *p*-nitroanilina te *m*-metoksianilina, modificiranom Harrisovom metodom uz *p*-TsOH kao katalizator. Dobiveni spojevi **3-7** manozilirani su pomoću prethodno pripremljene 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze uz AgOTf kao promotor i kolidin kao sredstvo za neutralizaciju kiseline koja nastaje tijekom reakcije (Koenigs-Knorrova metoda glikozidacije). Zadnji korak uključuje uklanjanje acetatnih zaštitnih skupina s hidroksilnih skupina manoze Zemplénovim postupkom transesterifikacije u prisutnosti natrijevog metoksida u metanolu s tetraacetiliranih manozida **8-11**, što rezultira nastankom konačnih spojeva **13-16**.

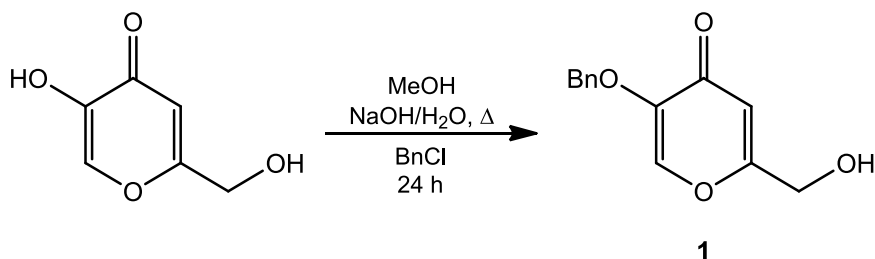
Slika 44. Sintetski put priprave odabranih *meta* i *para* supstituiranih *N*-arilnih 3,4-HP  $\alpha$ -manozida

## 4.2. Priprava prekursora 1 i 2 za sintezu novih *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona

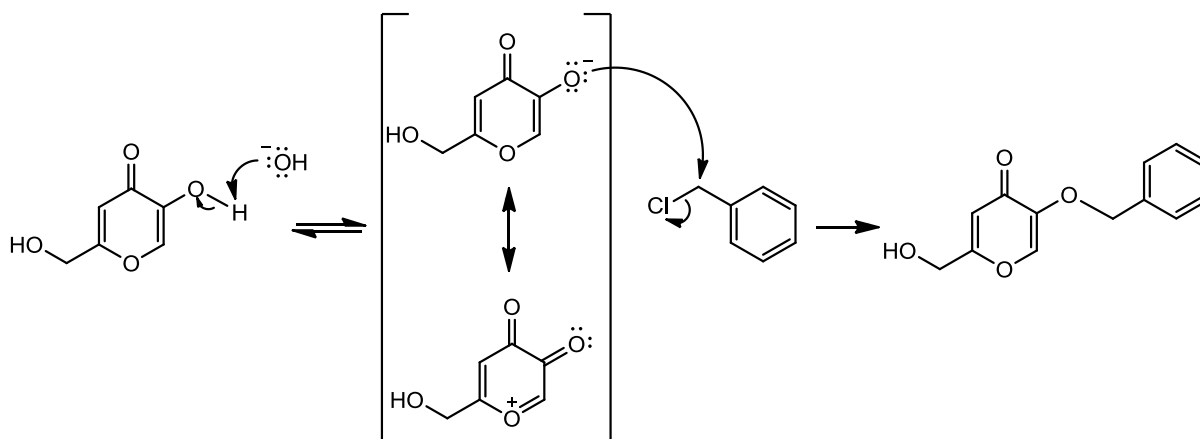
### 4.2.1. Priprava 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona (1)

Nukleofilna supstitucija na zasićenom ugljikovom atomu uz alkohol kao nukleofil rezultira nastankom etera. Iako je nastajanje etera u neutralnim uvjetima često zadovoljavajuće, obično je bolje uzeti reaktivniji nukleofil, alkoksid, koji se priprema reakcijom alkohola i odgovarajuće baze. Izbor baze ovisi o strukturi alkohola koji ulazi u reakciju odnosno o njegovoj kiselosti. Ireverzibilna reakcija priprave etera iz alkoksida i halogenalkana poznata je kao Williamsonova sinteza etera.<sup>54</sup>

Mješoviti eter **1** priprema se u uvjetima Williamsonove sinteze etera. Kojična kiselina u metanolu reagira s ekvimolarnom količinom benzil-klorida u prisutnosti natrijevog hidroksida kao baze. Reakcija se provodila 24 h uz refluks otapala, a prinos reakcije je 84 % (slika 45).

Slika 45. Shematski prikaz pripreve spoja **1**

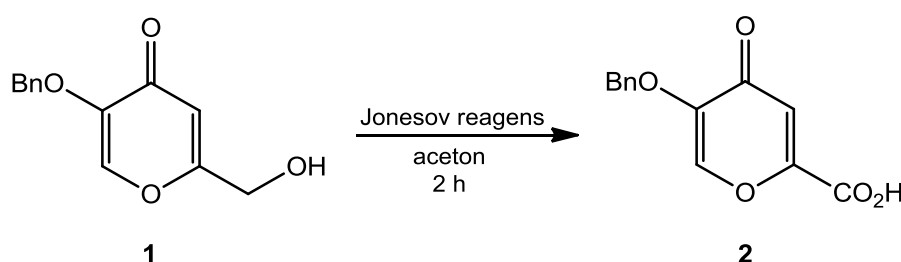
U ovom slučaju dolazi do selektivne alkilacije samo jednog od prisutnih nukleofila kisika. Pošto je u reakcijskoj smjesi prisutna mala koncentracija NaOH, deprotonirat će se samo fenolna hidroksilna skupina na položaju 5 jer je vodikov atom fenolne hidroksilne skupine kiseliji od onog hidroksimetilne skupine na položaju 2. To se može objasniti efektom rezonancije odnosno većom stabilnošću alkoksida koji nastaje deprotoniranjem fenolne skupine zbog stabilizacije rezonancijom u odnosu na alkoxid koji bi nastao iz primarne hidroksilne skupine kod kojeg ta stabilizacija izostaje. Takva kiselost može se objasniti i većim elektron-odvlačećim induktivnim utjecajem karbonilne skupine na položaju 4 i endocikločkog kisikovog atoma na hidroksilnu skupinu na položaju 5, međutim taj utjecaj je puno manji u usporedbi s rezonantnim.<sup>54</sup> Nastali alkoxid reagira s benzil-kloridom S<sub>N</sub>2 mehanizmom pri čemu nastaje spoj **1** (slika 46).

Slika 46. Shematski prikaz mehanizma pripreve spoja **1**

U ovom sintetskom putu benzilna eterska skupina ima ulogu zaštitne skupine. S obzirom na to da je nastali eter stabilan u reakcijskim uvjetima sintetskih koraka koji slijede, ne dolazi neželjenih sporednih reakcije pa su prinosi reakcija veći.

#### 4.2.2. Priprava 5-benziloksipiran-4-on-2-karboksilne kiseline (2)

Oksidacijom 5-benzilkojične kiseline pomoću svježe pripremljenog Jonesova reagensa, otopine kroma(VI) oksida u razrijeđenoj sumpornoj kiselinu, pripremljen je spoj **2** (slika 47), benzilirani derivat kromične kiseline, u prinosu od 67 %. Reakcija je izvedena u acetonu, jednom od rijetkih otapala s kojima krom(VI) oksid ne daje potencijalno eksplozivnu otopinu.<sup>25</sup> S obzirom na to da je reakcija egzotermna, provodila se na ledenoj kupelji u trajanju od 2 h.

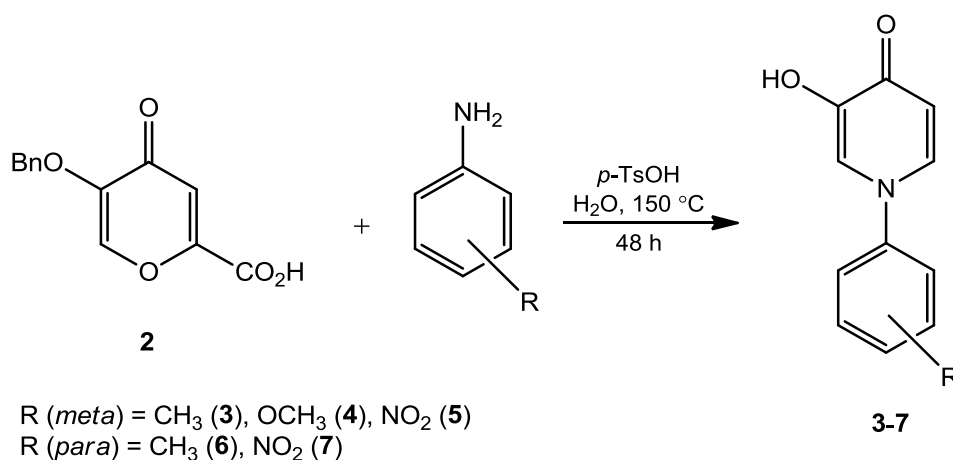


Slika 47. Shematski prikaz priprave spoja **2**

Iako je tijekom reakcije praćen tankoslojnom kromatografijom, potrošnja 5-benzilkojične kiseline (alkohola) u ovom oksidacijsko-redukcijskom procesu mogla se i vizualno pratiti jer se početna tamnocrvena boja otopine, koja potječe od kroma(VI), mijenja nastankom zelenih topljivih, ali i netopljivih vrsta kroma(III). Umjeren prinos reakcije može se objasniti kvalitetom pripremljenog Jonesova reagensa. Oksidacijska moć Jonesova reagensa usko je povezana s količinom dodane sumporne kiseline pri njegovoj pripravi i smanjuje se što je pH otopine veći.<sup>25</sup> Međutim, količina sumporne kiseline mora biti ograničena s obzirom na prisutnost benzilne zaštitne skupine. Iako je ta eterska zaštita stabilna u kiselom, u jako kiselim uvjetima i dugotrajnim provođenjem reakcije u nekoj mjeri će doći do njezinog uklanjanja i prinos reakcije će biti umanjen.

### 4.3. Priprava novih *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona **3-7**

Za pripravu novih *meta* i *para* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona **3-7** u ovome radu korištena je modificirana Harrisova metoda. Ova metoda uključuje reakciju zaštićenog piranona, 5-benzilkomenične kiseline (**2**), i odgovarajućeg *meta* ili *para* supstituiranog anilina uz dodatak *p*-TsOH u omjeru 1:1:0,1. Vodena otopina reaktanata i kiselog katalizatora zagrijavana je 48 h na 150 °C u zatvorenoj teflonskoj posudi (autoklavu) (slika 48).



Slika 48. Shematski prikaz priprave spojeva **3-7** modificiranom Harrisovom metodom

Kao što je već navedeno u poglavlju 2.2.2.1, osim što su dobri nukleofili, amini su i dobre baze pa mogu deprotonirati nezaštićenu hidroksilnu skupinu piranona na položaju 3, pri čemu nastaje alkoksid. Pošto je i alkoksid dobar nukleofil, dolazi do nastajanja neželjenih kondenzacijskih nusprodukata<sup>3,35</sup> što smanjuje ionako već umjeren prinos reakcije (slika 16). Da bi se to izbjeglo, u ovome radu hidroksilna skupina kojične kiseline na položaju 3 zaštitila se benzilnom skupinom (slika 45), a dodan je i kiseli katalizator *p*-TsOH. Kiseli reakcijski uvjeti te zagrijavanje nužni su za dekarboksiliranje i debenziliranje, što omogućuje da se željeni produkti sintetiziraju u jednom koraku.

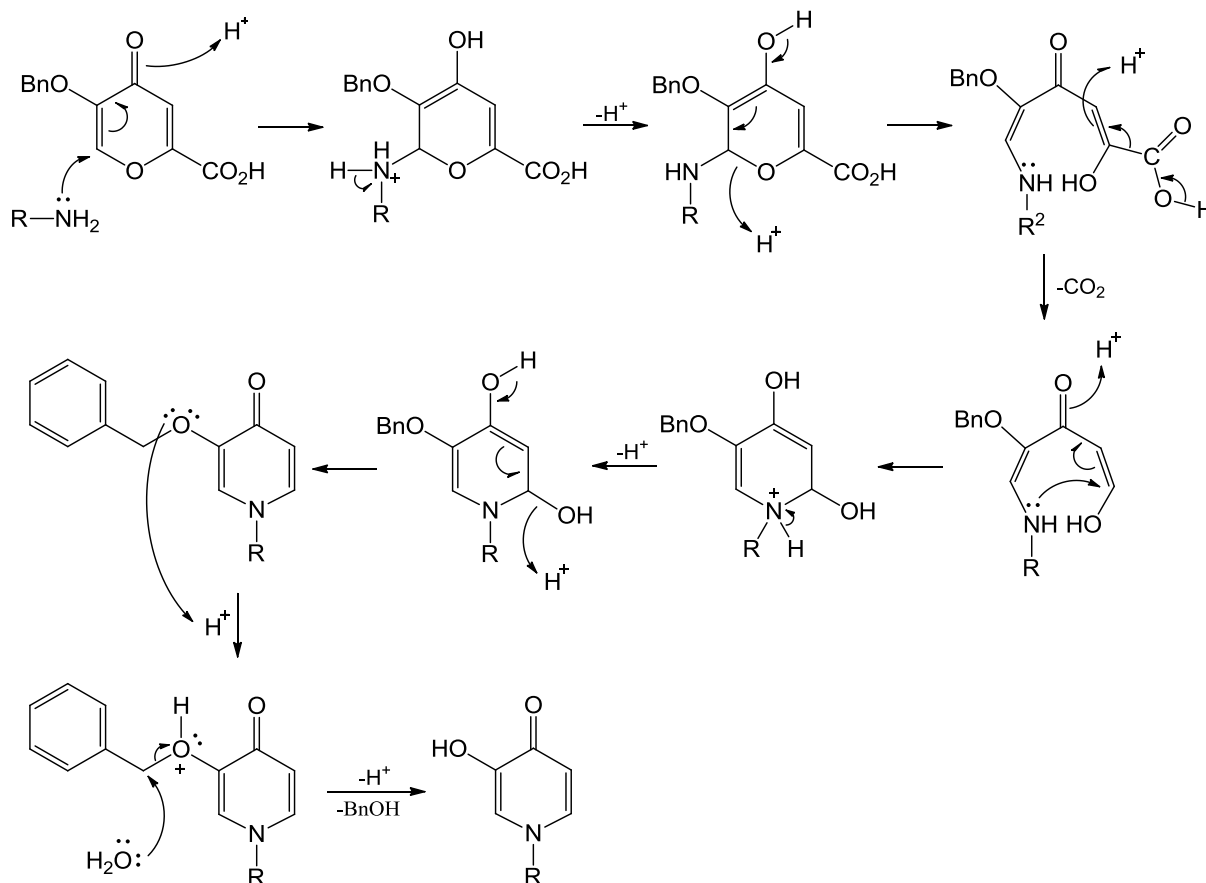
Spojevi **3-7** izolirani su nekim od navedenih postupaka: kristalizacijom nakon hlađenja reakcijske smjese u ledenoj kupelji, nakon obične ili kiselo-bazne ekstrakcije vodene matičnice i zaostalog smeđe-crnog taloga, ispiranjem tog taloga odgovarajućim otapalima ili kombinacijom ovih postupaka ovisno o priređenom spoju (poglavlje 3.2).

Kiselo-baznom ekstrakcijom opisanoj u poglavlju 3.3.1 produkt se odvaja od nečistoća zaostalih u vodenoj matičnici i smeđe-crnom talogu. Baznom ekstrakcijom s vodenom otopinom NaOH 3,4-HP se prevede u natrijevu sol koja zaostaje u vodi, dok onečišćenja veće  $R_f$  vrijednosti prelaze u organski sloj, etil-acetat. Zakiseljavanjem vodene otopine, ponovno nastaje neutralna vrsta 3,4-HP koja se sada ekstrahira u etil-acetat i uparavanjem otapala izolira u čistom obliku. pH vrijednosti korištene u kiselo-baznoj ekstrakciji odabrane su prema istraživanju izvedenom na srodnom spoju.<sup>11,55</sup>

Derivati 3,4-HP, koji su pripremljeni iz 5-benzilkomenične kiseline **2** i odgovarajućih anilina (*m*- i *p*-metilanilinom, *m*- i *p*-nitroanilinom te *m*-metoksianilinom) u opisanim reakcijskim uvjetima, su redom: 3-hidroksi-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on (**3**) (55 %), 3-hidroksi-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on (**4**) (52 %), 3-hidroksi-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on (**5**) (41 %), 3-hidroksi-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-on (**6**) (55 %) i 3-hidroksi-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on (**7**) (27 %). Svi spojevi su izolirani u čvrstom stanju osim spoja **3** koji je nakon uparavanja uljast, međutim i on kristalizira nakon nekoliko dana stajanjem na zraku.

Reakcija pripreve 3-hidroksi-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on (**7**) rezultirala je mnogo manjim prinosom u odnosu na ostale. Takav ishod reakcije može se objasniti strukturnim razlikama u korištenim anilinima. Naime, za razliku od preostalih korištenih anilina, *p*-nitroanilin posjeduje elektron-odvlačeću nitro-skupinu u *para* položaju u odnosu na amino-skupinu, koja rezonancijom odvlači elektrone s dušikovog atoma i smanjuje njegovu bazičnost, ali i nukleofilnost. Smanjenje bazičnosti povoljno djeluje u smislu nastanka manje količine kondenzacijskih nusprodukata. Međutim, kako je nukleofilnost povezana s brzinom reakcije,<sup>54</sup> smanjena nukleofilnost anilina utječe na sporiji nastanak željenog produkta **7**, i ostavlja dovoljno vremena da dođe do debenziliranja 5-benzilkomenične kiseline **2**. Kao rezultat toga nastala je komenična kiselina (slika 32) kao nusprodukt, koja je izolirana u visokom prinosu od 35 %.

Na temelju dobivenih rezultata, predložen je mehanizam pripreve 3,4-HP iz 5-benzilkomenične kiseline **2** i odgovarajućih anilina, koji uključuje dvostruku Michaelovu adiciju na C-2 i C-6 atome piranona, dekarboksiliranje te debenziliranje (slika 49).



R = *m*-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**3**), *m*-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**4**), *m*-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**5**), *p*-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**6**), *p*-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**7**)

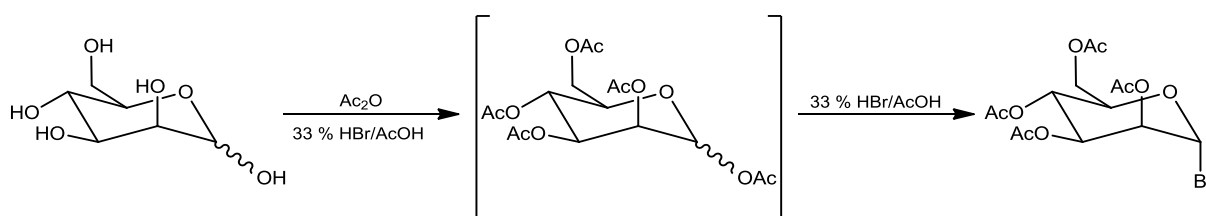
Slika 49. Shematski prikaz mehanizma pripreve 3,4-HP **3-7** iz 5-benzilkomenične kiseline **2** i odabranih anilinskih derivata

#### 4.4. Priprava acetilmanoznih derivata **8-12** Koenigs-Knorrovom metodom glikozidacije iz spojeva **3-7**

Koenigs-Knorrova metoda glikozilacije uključuje reakciju *O*-acetiliranog halogenida kao glikozilnog donora i alkohola kao glikozilnog akceptora u prisutnosti soli teških metala i baze za neutralizaciju nastale kiseline. Otkako je razvijena, ova metoda se koristila u sintezi različitih spojeva, od metilnih glikozida do polisaharida, zahvaljujući činjenici da u ovoj metodi ne postoje zahtjevi za određenim strukturnim karakteristikama alkohola koji se glikoziliraju.<sup>43</sup> Kako su se među spojevima uspješno sintetiziranim ovom metodom našli i manozni derivati 3,4-HP, koristila se i u ovom radu za pripremu spojeva **8-12**. Uz već pripremljene odabrane derivate 3,4-HP **3-7**, koji se ponašaju kao glikozilni akceptori, bilo je potrebno pripremiti i glikozilni donor, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranozu.

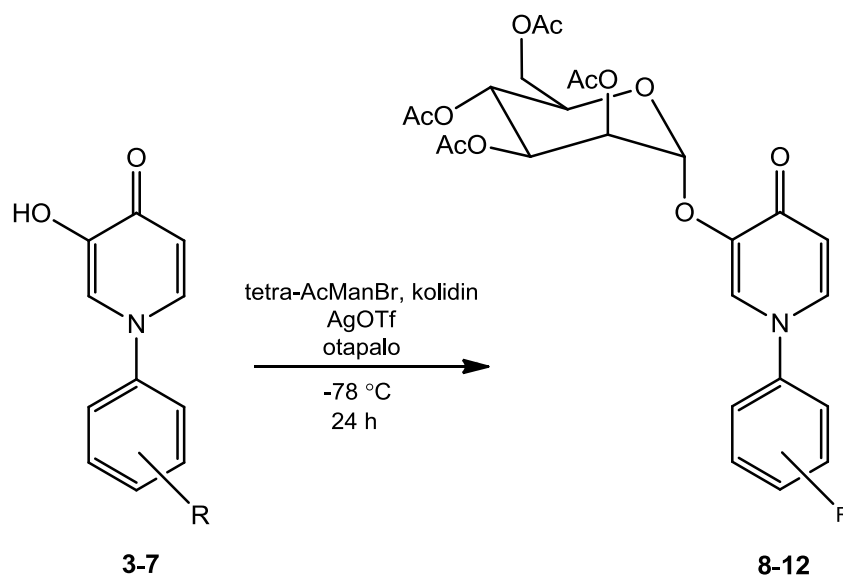


2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza je, kao i ostali glikozil-halogenidi, jako reaktivna i nestabilna te se lako hidrolizira u prisutnosti vlage,<sup>43</sup> stoga je pripremljena neposredno prije reakcije prema literaturno poznatom postupku iz D-manoze (slika 50). Dodatkom prvog alikvota 33 % otopine HBr/AcOH dolazi do acetiliranja D-manoze, koje nakon 5 minuta rezultira otopinom smjese peracetiliranih anomera. Nakon dodatka drugog alikvota 33 % otopine HBr/AcOH, kao posljedica anomernog efekta, nastaje željeni produkt  $\alpha$ -konfiguracije. S obzirom na to da su Kartha i Jennings<sup>53</sup> dokazali da je čistoća ovako pripremljenih spojeva izvrsna te da su prinosi reakcija skoro kvantitativni, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza nije izolirana u obliku kristala, nego je korištena sirova nakon uparavanja reakcijske smjese uz koodestilaciju s toluenom, čime je uklonjena većina otapala i bromovodik zaostao u reakcijskoj smjesi.



Slika 50. Shematski prikaz pripreme 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze

Reakcijom svježe pripravljene 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze (tetra-AcMan) i piridinonskih alkohola **3-7** uz srebrov triflat (AgOTf) kao promotor i organsku bazu kolidin za neutralizaciju nastale kiseline (HBr) pripremljeni su spojevi **8-11** (slika 51). Reakcijska smjesa sadržavala je reaktante u omjeru:  $n(\mathbf{3-7}) : n(\text{tetra-AcManBr}) : n(\text{AgOTf}) : n(\text{kolidin}) = 1 : 2 : 1,17 : 1,17$ . Kao otapalo obično se koristi diklormetan<sup>42</sup>, no zbog slabe topljivosti spojeva **4-7** u ovome otapalu bilo je potrebno dodati odgovarajući volumen dioksana. Reakcija se provodila 24 h na suhom ledu. Nakon kromatografskog pročišćavanja izolirane su relativno male količine produkata uz niske prinose reakcija (**8** (11 %), **9** (16 %), **10** (18 %)). Izuzeci su spoj **11** koji je izoliran u umjerenom prinosu od 51 % te spoj **12** čiji nastanak uopće nije zamijećen tankoslojnom kromatografijom. Općenito, niski prinosi reakcije mogu se objasniti slabijom topljivošću spojeva **3-7** u navedenim otapalima, koja se dodatno smanjuje zbog provođenja reakcije na izrazito niskoj temperaturi (-78 °C). Uporaba polarnijih protonskih otapala, poput metanola, u kojima su ovi spojevi **3-7** topljiviji, nije moguća zbog potencijalne reakcije s glikozilnim donatorom. Iako su prinosi reakcija niski, njihove vrijednosti ne odstupaju od prethodno dobivenih na srodnim spojevima.<sup>9,11</sup>



R (*meta*) = CH<sub>3</sub> (**3**, **8**), OCH<sub>3</sub> (**4**, **9**), NO<sub>2</sub> (**5**, **10**)  
 R (*para*) = CH<sub>3</sub> (**6**, **11**), NO<sub>2</sub> (**7**, **12**)

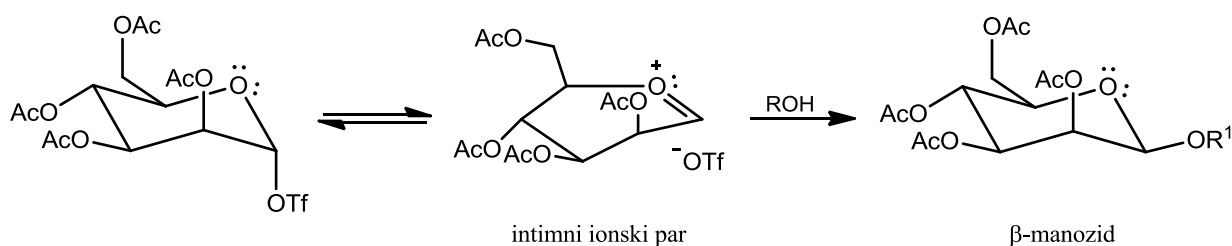
otapalo: DCM (**8**), DCM : dioksan = 1 : 1 (**9**, **10**, **11**, **12**)

Slika 51. Shematski prikaz priprave spojeva **8-12** Koenigs-Knorrovom metodom

Znatna odstupanja u reaktivnosti *para* supstituiranih piridinona **6** i **7**, jednog u odnosu na drugi te u odnosu na *meta* supstituirane piridinone **3-5**, a time i prinosi reakcija, mogu se objasniti induktivnim efektom supstituenata smještenih u *para* položaju. Nitro-skupina, koja odvlači elektrone, znatno smanjuje reaktivnost spoja, što u kombinaciji sa slabom topljivošću spoja **7** rezultira neuspješnom glikozidacijom odnosno pripravom spoja **12**. Suprotan efekt uočen je s elektron-donorskom metilnom skupinom, gdje se *para*-metilni derivat pokazao iznenađujuće reaktivnim, što je rezultiralo neočekivano visokim prinosom reakcije priprave spoja **11**. S obzirom na rezultate, može se reći da induktivni efekt ima važnu ulogu u pripravi manoznih derivata ovih spojeva.

Prethodnim istraživanjima na srodnim spojevima uočen je stereospecifični nastanak 1,2-*trans*-glikozida, odnosno  $\alpha$ -manozida,<sup>9</sup> što je i za očekivati zbog anomernog efekta i participirajuće acetatne skupine na položaju C-2 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze (poglavlje 2.3.1.1), no prilikom sinteze spojeva **8-11** tankoslojnom kromatografijom primijećeno je nastajanje nusprodukata. Sumnja da se radi o  $\beta$ -anomerima treba se još dodatno potvrditi. Njihov nastanak mogao bi se objasniti prisutnošću triflata u reakcijskoj smjesi. Naime, triflat, iako je slab nukleofil, dolazi u interakciju s oksokarbenijevim ionom nastalim disocijacijom bromida, pri čemu se smješta u očekivani  $\alpha$ -

položaj. Time je zaklonjen pristup alkohola oksokarbenijevom ionu s  $\alpha$ -strane, što rezultira nastankom  $\beta$ -manozida (slika 53).<sup>56</sup> Da bi se spriječila ili umanjila ova sporedna reakcija, potrebno je razmotriti druge promotore koji bi se mogli upotrijebiti u sintezi spojeva **8-12**, te, također u svrhu poboljšanja prinosa, istražiti i druge reakcijske uvjete i eventualno druge načine glikozidacije ovih spojeva.



Slika 53. Shematski prikaz mogućeg mehanizma nastanka nusprodukta  $\beta$ -manozida

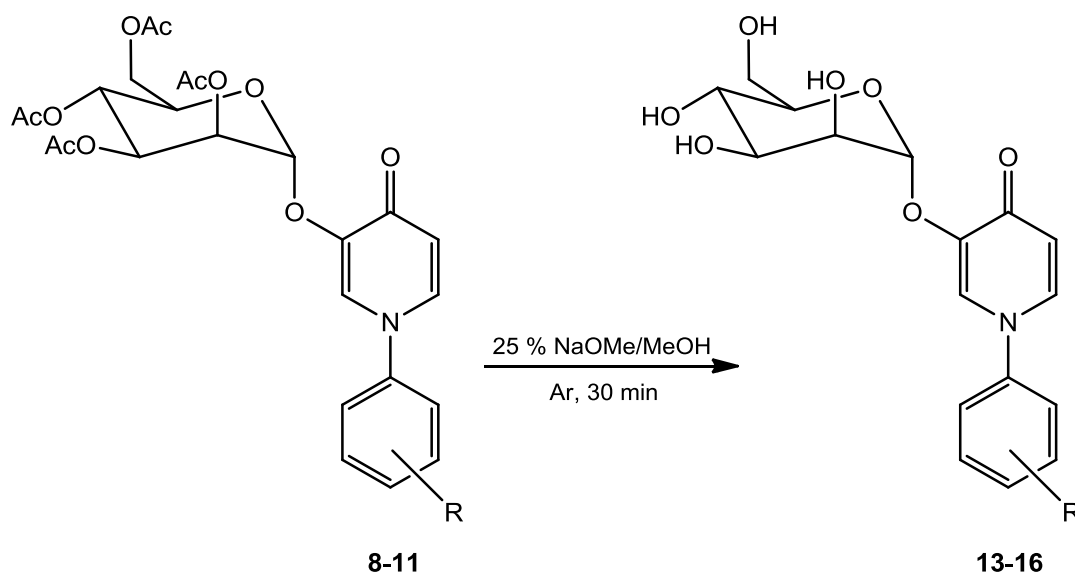
#### 4.5. Priprava manoznih derivata 13-16 Zemlénovim postupkom iz spojeva 8-11

Posljednji korak ovog sintetskog puta uključuje uklanjanje acetatnih zaštitnih skupina s manoznih podjedinica pripremljenih manokonjugata **8-11**, čime se povećava topljivost ovih spojeva u puferiranim otopinama u kojima se provode biološka testiranja. Deacetiliranje se provelo Zemlénovim postupkom, jednim od najčešće korištenih postupaka kojima se uklanjaju acilne zaštitne skupine s hidroksilnih skupina ugljikohidrata u blagim uvjetima, u bezvodnom metanolu s katalitičkom količinom natrijeva metoksida na sobnoj temperaturi. Ovaj postupak obično rezultira visokim prinosima.<sup>57</sup>

Za deacetiliranje spojeva **8-11** u jednom koraku korištena je 25 % otopina natrijevog metoksida u metanolu. Otopina reaktanata u omjeru  $n(\mathbf{8-11}) : n(\text{NaOMe}) = 1 : 0,5$  miješala se u atmosferi argona 30 minuta, a produkti **13-16** su, nakon filtriranja i kromatografskog pročišćavanja na silikagelu, izolirani u umjerenim prinosima (**13** (58 %), **14** (74 %), **15** (66 %), **16** (57 %)) (slika 54).

U ovoj reakciji iznimno je važno paziti na količinu dodane 25 % otopine NaOMe/MeOH te vrijeme trajanja reakcije jer, zbog nukleofilnosti metoksidnih iona, uz uklanjanje acetatnih zaštita ireverzibilnom reakcijom transesterifikacije (slika 55) može doći do napada metoksidnih iona na anomerni ugljikov atom i razaranja glikozidne veze, što rezultira smanjenim prinosom reakcije. Kako bi se povećali prinosi reakcija, potrebno je optimirati

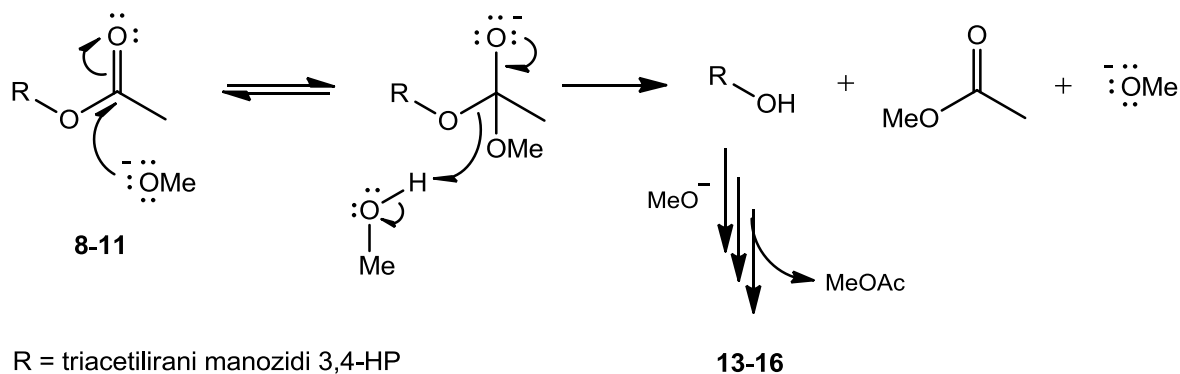
reakcijske uvjete za priprevu odabranih spojeva **13-16**, što se može postići smanjenjem vremena trajanja reakcije ili dodatkom manje količine otopine NaOMe/MeOH.



R (*meta*) = CH<sub>3</sub> (**8**, **13**), OCH<sub>3</sub> (**9**, **14**), NO<sub>2</sub> (**10**, **15**)

R (*para*) = CH<sub>3</sub> (**11**, **16**)

Slika 54. Shematski prikaz priprave spojeva **13-16** Zemlénovim postupkom

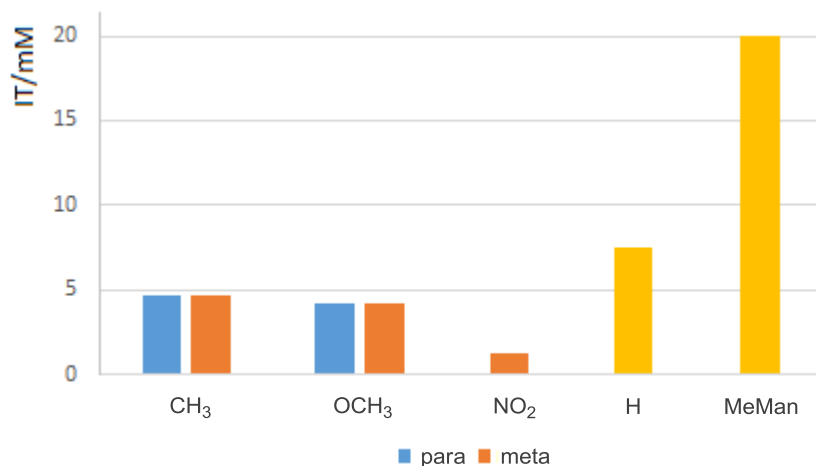


Slika 55. Mehanizam ireverzibilne transesterifikacije u Zemlénovim uvjetima<sup>44</sup>

#### 4.6. Ispitivanje antiadhezijskog učinka piridinonskih manozida

Pripravljenim spojevima **13-16** te ranije pripravljenim piridinonskim manozidima s fenilom i *p*-metoksifenilnom skupinom na dušikovom atomu (slika 2b) ispitan je antiadhezijski učinak testom inhibicije hemaglutinacije. Rezultati prikazani na slici 56 izraženi su kao minimalne množinske koncentracije ispitanog spoja potrebne za inhibiciju hemaglutinacije (IT

vrijednosti, IT = inhibitorni titar). Kao referentni inhibitor u testu korišten je metil- $\alpha$ -D-manopiranozid (MeMan) množinske koncentracije  $c(\text{MeMan}) = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ .



Slika 56. Usporedba vrijednosti inhibitornog titra (IT) *para* i *meta* supstituiranih piridinonskih manozida

Svi ispitani spojevi pokazali su bolji inhibitorni učinak u odnosu na MeMan. Najbolji učinak pokazao je spoj **15** s nitro-skupinom u *meta* položaju *N*-fenila koji je 17 puta bolji inhibitor u odnosu na referentnu MeMan. Osim toga, spojevi sa supstituentom na fenilu, bilo u *para*, bilo u *meta* položaju, pokazuju bolji inhibitorni učinak u usporedbi sa piridinonskim manozidom koji ima samo fenil vezan na dušikov atom.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Williamsonovom sintezom etera iz kojične kiseline (5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-ona) i benzil-klorida uz NaOH kao bazu pripremljen je spoj **1**, 5-benziloksi-2-hidroksimetilpiran-4-on u visokom prinosu.
- Spoj **1** uspješno je oksidiran pomoću Jonesova reagensa u 5-benziloksipiran-4-on-2-karboksilnu kiselinu (**2**).
- Modificiranom Harrisovom metodom u jednom koraku, iz 5-benziloksipiran-4-on-2-karboksilne kiseline (**2**) i odgovarajućih anilina (*m*- i *p*-metilanilina, *m*- i *p*-nitroanilina te *m*-metoksianilina) uz kiseli katalizator *p*-TsOH, pripremljeni su spojevi:
  - 3-hidroksi-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on (**3**)
  - 3-hidroksi-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on (**4**)
  - 3-hidroksi-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on (**5**)
  - 3-hidroksi-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-on (**6**)
  - 3-hidroksi-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-on (**7**).
- 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza pripremljena je iz D-manoze u prisutnosti acetanhidrida i 33 % otopine HBr/AcOH te je bez dodatnog pročišćavanja korištena za pripravu spojeva **8-11**.
- Koenigs-Knorrovom metodom glikozilacije, iz *meta* i *para* supstituiranih *N*-arilnih 3-hidroksipiridin-4-ona (**3-6**) kao glikozilnih akceptora i 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze kao glikozilnog donora uz AgOTf kao promotor i kolidin, pripremljeni su spojevi:
  - 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on (**8**)
  - 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on (**9**)
  - 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-on (**10**)

3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-on  
(**11**).

Prinosi reakcija pripreve spojeva **8-10** bili su niski (11-18 %), prinos spoja **11** bio je umjeren (51 %), a nastanak spoja **12**, 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*p*-nitrofenil)piridin-4-ona, iz spoja **7** nije zamijećen. S obzirom na ovakve rezultate, potrebno je istražiti druge postupke glikozidacije za pripremu ovih spojeva.

- Uklanjanjem acetatnih zaštitnih skupina sa spojeva **8-11** pomoću 25 % otopine NaOMe/MeOH (Zemplénov postupak) pripremljeni su spojevi:

3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (**13**)

3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (**14**)

3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*m*-nitrofenil)piridin-4-ona (**15**)

3-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)-1-(*p*-metilfenil)piridin-4-ona (**16**).

Prinosi ovih reakcija bili su umjereni (57-74 %).

- Strukture svih pripremljenih spojeva, osim 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoze, potvrđene su spektroskopijom NMR ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) te spektrometrijom masa (ESI-MS).
- Pripremljenim spojevima **13-16** ispitan je antiadhezijski učinak testom inhibicije hemaglutinacije. Spojevi su pokazali 3-17 puta bolji antiadhezijski učinak u odnosu na korišteni referentni inhibitor.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

1,2-HP	1-hidroksipiridin-2-on
3,2-HP	3-hidroksipiridin-2-on
3,4-HP	3-hidroksipiridin-4-on
A. flavus	<i>Aspergillus flavus</i>
Ac	acetil
Ac <sub>2</sub> O	acetanhidrid
AcOH	octena kiselina (etanska kiselina)
AgOTf	srebrov(I) triflat (srebrov(I) trifluorometansulfonat)
app t	prividni triplet (engl. <i>apparent triplet</i> )
Ar	aril
B	baza
Bn	benzil
BnCl	benzil-bromid
BF <sub>3</sub> ×Et <sub>2</sub> O	borov trifluorid dietil-eterat
br s	široki singlet (engl. <i>broad singlet</i> )
BGYF	svijetlo zeleno-žuta fluorescencija (engl. <i>bright greenish-yellow fluorescence</i> )
CDCl <sub>3</sub>	deuterirani kloroform
CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub>	deuterirani metanol
d	dublet
dd	dublet dubleta
DCM	diklormetan
DMSO -d <sub>6</sub>	deuterirani dimetilsulfoksid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (eng. <i>electrospray ionization</i> )
HP	hidroksipiridinon
Ile	izoleucin
IT	inhibitorski titar (engl. <i>inhibition titer</i> )
m	multiplet



---

MeMan	metil- $\alpha$ -D-manopiranozid
MeOH	metanol
MeUmbMan	5-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-manozid
MS	spektrometrija masa
NaOMe/MeOH	natrijev metoksid u metanolu
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
Nu	nukleofil
PCC	piridinijev klorokromat
PDC	piridinijev dikromat
pNPMan	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-manozid
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -toluensulfonska kiselina
ppm	dijelovi na milijun (engl. <i>parts per million</i> )
$R_f$	faktor zaostajanja
ROS	reaktivne kisikove vrste
s	singlet
t	triplet
<i>t.t.</i>	temperatura taljenja
tetra-AcMan	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza
tetra-AcManBr	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-brom- $\alpha$ -D-manopiranoza
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin layer chromatography</i> )
TMS	tetrametilsilan
TMSOTf	trimetilsilil-triflat
Tyr	tirozin (engl. <i>tyrosine</i> )
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i> )

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. V. Petrović Peroković, B. Prugovečki, Ž. Car, *Croat. Chem. Acta.* **86**(3) (2013) 317–323.
2. M. A. Santos, S. Chaves, *Future Med. Chem.* **7** (2015) 383–410.
3. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016) 595–604.
4. M. A. Santos, S. M. Marques, S. Chaves, *Coord. Chem. Rev.* **256** (2012) 240–259.
5. M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* (2011) 3583–3609
6. N. Sharon, I. Ofek, *Glycoconj. J.* **17** (2000) 659–664.
7. M. D. Díaz, M. del Carmen Fernández-Alonso, G. Cuevas, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Pure Appl. Chem.* **80**(8) (2008) 1827–1835
8. Ž. Car, T. Hrenar, V. Petrović Peroković, R. Ribić, M. Seničar, S. Tomić, *Chem. Biol. Drug. Des.* **84** (2014) 393–401.
9. V. Petrović Peroković, R. Ribić, Ž. Car, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* 2016, **89**(2), 237–242
10. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **66**(1-2) (2017) 17–28
11. K. Meglič, *Priprava adamantilnih i manoznih derivata novih N-aril supstituiranih 3-hidroksipiran-4-ona dobivenih iz kojične kiseline*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
12. D. T. Wicklow, C. E. McAlpin and S. W. Petersen, *Mycoscience* **43** (2002) 289–297
13. C. Krishna, *Crit. Rev. Biotechnol.* **25** (2005) 1–30.
14. G. A. Burdock, M. G. Soni, I. G. Carabin, *Regul. Toxicol. Pharm.* **33** (2001) 80–101.
15. K. Saito, *Bot. Mag.* **21** (1907) 7–11.
16. M. Zirak, B. Eftekhani-sis, *Turk. J. Chem.* **39** (2015) 439–496.
17. T. Yabuta, *J. Chem. Soc.* **37** (1916) 1185–1269.
18. R. Bentley, *Nat. Prod. Rep.* **23** (2006) 1046–1062.
19. W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, *J. Organomet. Chem.* **696** (2011) 999–1010.
20. A. Beélik, *Adv. Carbohydr. Chem.* **11** (1956) 145–183.
21. H. R. V. Arnstein, R. Bentley, *Biochem. J.* **64** (1953) 493–508
22. Z. D. Liu, H. H. Khodr, D. Y. Liu, S. L. Lu, R. C. Hider, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 4814–4823.
23. M. D. Aytemir, B. Özçelik, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 4089–4095.

24. [https://www.researchgate.net/publication/236891484\\_Kojic\\_acid\\_A\\_superior\\_source\\_for\\_preparation\\_of\\_biologically\\_active\\_compounds\\_Current\\_Experience](https://www.researchgate.net/publication/236891484_Kojic_acid_A_superior_source_for_preparation_of_biologically_active_compounds_Current_Experience) (21. rujna 2017.)
25. G. Tojo, M. I. Fernandez, *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones: A Guide to Current Common Practice*, Springer Science&Business Media, Inc., New York, 2006, str. 1-17
26. M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry*, John Wiley&Sons, Inc., New Jersey, 2007.
27. K. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones, B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc.* **0** (1946) 39–45
28. Y. Mishima, S. Hatta, Y. Ohyama, M. Inazu, *Pigment. Cell Res.* **1** (1988) 367–374
29. <https://pdfs.semanticscholar.org/a5b4/ca9bd2001e9ee9c974067928cf8d2f7038e5.pdf> (11. listopada 2017.)
30. L. Burnett, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, Jr., R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen, *International Journal of Toxicology* **29** (Supplement 4) (2010) 244S–273S
31. [https://www.researchgate.net/publication/41576935\\_ChemInform\\_Abstract\\_Synthesis\\_and\\_Anticonvulsant\\_Activity\\_of\\_New\\_Kojic\\_Acid\\_Derivatives](https://www.researchgate.net/publication/41576935_ChemInform_Abstract_Synthesis_and_Anticonvulsant_Activity_of_New_Kojic_Acid_Derivatives) (11. listopada 2017.)
32. A. Rimac, *Priprava para supstituiranih N-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-onskih  $\alpha$ -manozida s esterskom vezom na piridinonu*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
33. R. I. N. Harris, *Aust. J. Chem.* **29** (1976) 1329–1334
34. L. S. Dehkordi, Z. D. Liu, R. C. Hider, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008) 1035–1047.
35. L. Saghaie, M. Mirmohammad-Sadeghi, A. Nikazma, *Res. Pharm. Sci.* **1** (2006) 40–48
36. V. Petrović Peroković, A. Gojmerac Ivšić, Ž. Car, S. Tomić, *Croat. Chem. Acta* **87**(2) (2014) 103–109
37. [http://goldbook.iupac.org/src/src\\_PAC1995671307.html](http://goldbook.iupac.org/src/src_PAC1995671307.html) (26. studeni 2017.)
38. <https://www.slideshare.net/1234568060848/glycosides-52940662> (26. studeni 2017.)
39. L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *Org. Biomol. Chem.* **8** (2010) 497-510.
40. A. Michael, *Am. Chem. J.* **1** (1879) 305–312.
41. K. Igarashi, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **34** (1977) 243-283
42. M. Brito-Arias, *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Springer Science&Business Media, LLC, New York, 2007, str. 68-88

43. F. Bochkov, G. E. Zaikov, *Chemistry of the O-Glycosidic Bond: Formation and Cleavage*, Pergamon Press, Ltd. Oxford, 1979, str. 16-35
44. Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ. 2010, str. 1650-1651; 3123-3128
45. S. C. Ranade and A. V. Demchenko, *J. Carb. Chem.* **32** (2013) 1-43
46. P. Aprikian, V. Tchesnokova, B. Kidd, O. Yakovenko, V. Yarov-Yarovoy, E. Trinchina, V. Vogel, W. Thomas, E. Sokurenko, *J. Biol. Chem.* **282**(32) (2007) 23437–23446
47. E. V. Sokurenko, M. A. Schembri, E. Trintchina, K. Kjærgaard, D. L. Hasty, P. Klemm, *Molecular Microbiology* **41**(3) (2001) 675–686
48. C. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. Gale Auguste, Robert Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Molecular Microbiology* (2002) **44**(4), 903–915
49. J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. De Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. De Greve, *Molecular Microbiology* (2005) **55**(2), 441–455
50. I. Vogel, A. R. Tatchell, B. S. Furnis, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, *Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, Longman, London 1989.
51. J. Lachowicz, V. Nurchi, G. Crisponi, M. Jaraquemada-Pelaez, M. Arca, A. Pintus, M. Santos, C. Quintanova, L. Gano, Z. Szewczuk, *Dalton Trans.* **45** (2016) 6517–6528
52. L. E. Hare, M. C. Lu, C. B. Sullivan, P. T. Sullivan, R. E. Counsell, P. A. Weinhold, *J. Med. Chem.* **17** (1974) 1–5
53. K. P. Ravindranathan Kartha, H. J. Jennings, *J. Carb. Chem.* **9**(5) (1990) 777-781
54. S. H. Pine, J. B. Hendrickson, D. J. Cram, G. S. Hammond, *Organska kemija*, 2. promijenjeno izdanje, prevela Irena Ranogajec, Školska knjiga, Zagreb, 1984., str. 207-222; 405-410
55. A. Gojmerac Ivšić, V. Tomišić, Ž. Car, B. Prugovečki, S. Tomić, *J. Mol. Struct.* **990** (2011) 237–243
56. T. G. Frihed, M. Bols, and C. M. Pedersen, *Chem. Rev.* **115**(11) (2015) 4963-5013
57. K. Ágoston, A. Dobó, J. Rákó, J. Kerékgyártó, Z. Szurmai, *Carbohydr. Res.* **330** (2001) 183–190

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Mateja Matišić

Datum rođenja: 31. svibnja 1992.

Mjesto rođenja: Virovitica

### Obrazovanje

- |             |   |
|-------------|---|
| 1999.–2007. | Osnovna škola Josipa Kozarca, Slatina   |
| 2007.–2011. | Srednja škola Marka Marulića, opća gimnazija, Slatina   |
| 2011.–2015. | Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu  |
| 2015.-2018. | Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu |

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- |       |   |
|-------|---|
| 2015. | Sudjelovanje na Otvorenom danu kemijskog odsjeka  |
| 2017. | Sudjelovanje na Otvorenom danu kemijskog odsjeka  |
| 2017. | Volonterski rad na BASF projektu u sklopu "Znanstvenih čarolija" u organizaciji Studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva  |
| 2017. | Sudjelovanje na 4. Simpoziju studenata kemičara u organizaciji Studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva (postersko priopćenje, M. Matišić, Ž. Car, V. Petrović Peroković, <i>Priprava novih meta supstituiranih N-aril-3-hidroksipiridin-4-onskih <math>\alpha</math>-D-manozida – potencijalnih FimH antagonista</i> (projekt Hrvatske zaklade za znanost, PEPTGLYCOSAR, IP-2014-09-7899)) |

### Ostalo

- |                 |   |
|-----------------|---|
| svibanj 2017.   | Stručna praksa u HEP proizvodnji d.o.o., Pogon TE-TO Zagreb, Služba za proizvodnju, Odjel za kemijsku tehnologiju |
| listopad 2017.- | Studentski rad u kompaniji PLIVA Hrvatska d.o.o., Manufacturing Science and Technology (MS&T), Savski Marof       |