

# Sinteza konjugata fenilborne i cimetne kiseline

---

**Kemura, Miran**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:909795>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-17**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**SINTEZA KONJUGATA FENILBORNE I CIMETNE KISELINE**

**DIPLOMSKI RAD**

**MIRAN KEMURA**

**Matični broj: 170**

**Split, lipanj 2024.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET  
DIPLOMSKI STUDIJI KEMIJE  
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**SINTEZA KONJUGATA FENILBORNE I CIMETNE KISELINE**

**DIPLOMSKI RAD**

**MIRAN KEMURA**

**Matični broj: 170**

**Split, lipanj 2024.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**ORIENTATION: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**SYNTHESIS OF THE PHENYLBORONIC AND  
CINNAMIC ACID CONJUGATE**

**DIPLOMA THESIS**

**MIRAN KEMURA**  
**Parent number: 170**

**Split, June 2024**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet  
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija  
Mentor: doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić

### Sinteza konjugata fenilborne i cimetine kiseline Miran Kemura, 170

#### Sažetak:

Fenilborna kiselina je spoj s izraženim terapijskim potencijalom, posebno u kontekstu borbe protiv raka. Analizirana literatura ističe njezine pozitivne karakteristike te naglašava njezinu moguću primjenu kao farmaceutskog agensa u terapiji raka. Jedan od ključnih izazova u terapiji raka jest minimiziranje njenih štetnih utjecaja na zdrave stanice i organe.

U tom kontekstu, u fokusu ovog rada je istraživanje sinteze konjugata fenilborne i cimetine kiseline, biološki aktivne prirodne organske kiseline. Sinteza je provedena korištenjem protokola uobičajenog za dobivanje amidne veze, koji koristi aktivaciju karboksilne kiseline *N,N*-dialkilkarbodiimidom uz nekoliko modifikacija reakcijskih uvjeta (sastav reakcijskog medija, korišteni karbodiimid, temperature, itd), u potrazi za najefikasnijim sintetskim postupkom za dobivanje derivata aminofenil borne kiseline. Iako nakon provedenih sinteza nije bilo moguće izolirati čisti željeni konjugat, u ovom je radu dan iscrpan pregled korištenih metoda sinteze i pročišćavanja sirovih produkata.

Naposljetku, pokazano je da već i smjesa anhidrida cimetine kiseline i njezinogkonjugata s aminofenilbornom kiselinom pokazuje izrazitu citotoksičnost, a time i izniman potencijal za daljnji razvoj ovog tipa antitumorskih lijekova. Stoga će ovaj rad zasigurno predstavljati temelj za razvoj novih sintetskih pristupa dobivanju konjugata fenilborne i prirodnih biološki aktivnih organskih kiselina.

**Ključne riječi:** amidna veza, karbodiimid, kromatografija, anhidrid, citotoksičnost

**Rad sadrži:** 44stranica, 44 slika, 1 tablica, 0-priloga, 32 literaturnih reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Mila Radan	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Sanja Perinović Jozić	član
3. doc dr.sc. Marina Tranfić Bakić	mentor

#### Datum obrane:

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Graduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences  
Scientific field: Chemistry  
Supervisor PhD prof. Marina Tranfić Bakić

### SYNTHESIS OF THE PHENYLBORONIC AND CINNAMIC ACID CONJUGATE

Miran Kemura, 170

#### Abstract:

Phenylboronic acid is a compound with significant therapeutic potential, particularly in the context of cancer treatment. The analyzed literature highlights its positive characteristics and potential application as a pharmaceutical agent in cancer therapy. One of the key challenges in cancer therapy is minimizing its harmful effects on healthy cells and organs.

In this context, the focus of this work is the investigation of the synthesis of conjugates of phenylboronic and cinnamic acid, a biologically active natural organic acid. The synthesis was conducted using a protocol common for the formation of amide bonds, which involves the activation of a carboxylic acid with *N,N*-dialkylcarbodiimide, with several modifications to the reaction conditions (reaction medium composition, carbodiimide used, temperature, etc.) in search of the most efficient synthetic procedure for obtaining derivatives of aminophenylboronic acid. Although it was not possible to isolate the pure desired conjugate after the syntheses, this paper provides a comprehensive review of the synthesis methods and purification of the raw products used.

Ultimately, it was shown that even a mixture of cinnamic acid anhydride and its conjugate with aminophenylboronic acid exhibits significant cytotoxicity, and thus exceptional potential for further development of this type of antitumor drugs. Therefore, this work will undoubtedly serve as a foundation for the development of new synthetic approaches to obtaining conjugates of phenylboronic acid and naturally biologically active organic acids.

**Keywords:** Amide bond, Carbodiimide, Chromatography, Anhydride, Cytotoxicity

**Thesis contains:** 44 pages, 44 figures, 1 tables, 0 supplements, 32 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

1., PhD, Mila Radan - associate prof.	chair person
2., PhD, Sanja Perinović Jozić - associate prof	member
3., PhD, Marina Tranfić Bakić - prof.	supervisor

#### Defence date:)

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvo prof.dr.sc. Marina Tranfić Bakić tijekom srpnja 2024. godine.*

### *ZAHVALA (izborna)*

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Tranfić Bakić i ostalim članovima komisije izv. prof. dr. sc. Mili Radan i izv. prof. dr. sc. Sanji Perinović Jozić na pristupačnosti i zavidnom strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.*

*Posebne zahvale idu bivšem mentoru prof. dr. sc. Mladenu Milošu koji je imao povjerenje u mene od prvoga dana kada smo se upoznali .*

*Također zahvale idu fakultetu koji mi je podario najbolje ljude na svijetu, moje prijatelje, bez kojih ništa ne bih bilo moguće, koji su stali uz mene kada je najteže bilo... Neizmjerne vam hvala. I za kraj, ali ne na kraju... moja obitelj koja je najviše pomagala na ovom prekrasnom putu i koja je imala puno strpljenja što nije bilo lako.*

*Ekipo koja više niste tu, evo odradili smo i ovaj dio puta... "Stariii, nije bilo lakoo, ali je bilo lipo".*

*Job Finished !*



## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je sintetizirati, izolirati i strukturno okarakterizirati dobiveni konjugat fenilborne i cimetine kiseline. Za sintezu će biti korišten protokol za sintezu amidne veze uz aktivaciju karboksilne kiseline *N,N*-dialkilkarbodiimidom. Korištenjem uobičajenih metoda razdvajanja reakcijske smjese izolirat će se čisti konjugat, nakon čega će mu se struktura potvrditi spektroskopijom NMR. Kako bi se evaluiralo potencijal ovakvih konjugata za razvoj antitumorskih lijekova, konjugatu će se procijeniti citotoksični učinak na stanice raka.

## SAŽETAK

Fenilborna kiselina je spoj s izraženim terapijskim potencijalom, posebno u kontekstu borbe protiv raka. Analizirana literatura ističe njezine pozitivne karakteristike te je istaknuta njezina moguća primjena kao farmaceutskog agensa u terapiji raka. Jedan od ključnih izazova u terapiji raka jest minimiziranje njenih štetnih utjecaja na zdrave stanice i organe.

U tom kontekstu, u fokusu ovog rada je istraživanje sinteze konjugata fenilborne i cimetine kiseline, biološki aktivne prirodne organske kiseline. Sinteza je provedena korištenjem protokola uobičajenog za dobivanje amidne veze koji koristi aktivaciju karboksilne kiseline *N,N*-dialkylkarbodiimidom uz nekoliko modifikacija reakcijskih uvjeta (sastav reakcijskog medija, korišteni karbodiimid, temperature, ...) u potrazi za najefikasnijim sintetskim postupkom za dobivanje derivata aminofenil borne kiseline. Iako nakon provedenih sinteza nije bilo moguće izolirati čisti željeni konjugat, u ovom je radu dan iscrpan pregled korištenih metoda sinteze i pročišćavanja sirovih produkata.

Naposlijetku, pokazano je da već i smjesa anhidrida cimetine kiseline i njenog konjugata s aminofenilbornom kiselinom pokazuje izrazitu citotoksičnost, a time i izniman potencijal za daljnji razvoj ovog tipa antitumorskih lijekova. Stoga će ovaj rad zasigurno predstavljati temelj za razvoj novih sintetskih pristupa dobivanju konjugata fenilborne i prirodnih biološki aktivnih organskih kiselina.

**Ključne riječi:** amidna veza, karbodiimid, kromatografija, anhidrid, citotoksičnost

## **ABSTRACT**

Phenylboronic acid is a compound with significant therapeutic potential, particularly in the context of cancer treatment. The analyzed literature highlights its positive characteristics and potential application as a pharmaceutical agent in cancer therapy. One of the key challenges in cancer therapy is minimizing its harmful effects on healthy cells and organs.

In this context, the focus of this work is the investigation of the synthesis of conjugates of phenylboronic and cinnamic acid, a biologically active natural organic acid. The synthesis was conducted using a protocol common for the formation of amide bonds, which involves the activation of a carboxylic acid with *N,N*-dialkylcarbodiimide, with several modifications to the reaction conditions (reaction medium composition, carbodiimide used, temperature, etc.) in search of the most efficient synthetic procedure for obtaining derivatives of aminophenylboronic acid. Although it was not possible to isolate the pure desired conjugate after the syntheses, this paper provides a comprehensive review of the synthesis methods and purification of the raw products used.

Ultimately, it was shown that even a mixture of cinnamic acid anhydride and its conjugate with aminophenylboronic acid exhibits significant cytotoxicity, and thus exceptional potential for further development of this type of antitumor drugs. Therefore, this work will undoubtedly serve as a foundation for the development of new synthetic approaches to obtaining conjugates of phenylboronic acid and naturally biologically active organic acids.

**Keywords:** amide bond, carbodiimide chromatography, anhydride, Cytotoxicity

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	OPĆI DIO .....	3
2.1.	Struktura fenilborne kiseline i cimetine kiseline.....	3
2.2.	Fizikalna i kemijska svojstva fenilborne kiseline i cimetine kiseline .....	4
2.3.	Sinteza fenilborne kiseline .....	5
2.4.	Interakcije fenilbornih kiselina s diolima .....	6
2.5.	Primjeri primjene fenilborne kiseline.....	8
2.6.	Metode formiranja amidnih i peptidnih veza.....	12
2.7.	Konjugati fenilborne kiseline i bioaktivnih organskih spojeva .....	17
2.8.	Korištene metode detekcije i izolacije produkata sinteze .....	17
2.8.1.	Tankoslojna kromatografija i kromatografija na stupcu.....	17
2.8.2.	2.8.2. Nuklearna magnetska rezonanca .....	20
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	24
3.1.	Sinteza konjugata pomoću dicikloheksilkarbodiimida .....	24
3.2.	Sinteza konjugata u dietil-eteru uz HOBt .....	25
3.3.	Sinteza konjugata pomoću diizopropilkarbodiimida .....	26
3.4.	Sinteza konjugata u smjesi dietil-eter : voda .....	28
3.5.	Sinteza konjugata uz DMAP .....	29
4.	Rezultati i rasprava.....	31
5.	ZAKLJUČAK.....	39
6.	POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	40
7.	LITERATURA .....	41

## 1. UVOD

Iako je engleski znanstvenik Edward Frankland prvi put izolirao bornu kiselinu još 1960. godine, do 80-ih godina prošlog stoljeća bilo je vrlo malo istraživanja koja su se bavila biološkim aktivnostima ovog spoja i njegovih derivata. Međutim, početkom 1980-ih godina dogodio se značajan preokret kada su istraživači ispitali biološku aktivnost mnogih novootkrivenih derivata borne kiseline.

Borna kiselina i njezini esteri široko su rasprostranjeni i koriste se kao reagensi u suvremenoj organskoj sintezi te su visoko cijenjeni. Borna kiselina sadrži trovaletni atom bora iprema Lewisovoj teoriji je blago kisela tvar. Nalazi se u krutom agregacijskom stanju te ne reagira s kisikom i stabilna je na zraku. Pojavljuje se kao smjesa anhidrida slobodne kiseline i oligomernih kiselina, posebno cikličkih šesteročlanih boroksina, koji nastaju kao rezultat dehidracije borne kiseline tijekom pripreve. Supstitucija hidroksilnih skupina drugim ligandima i disproporcija između odgovarajućeg trialkilborana i borne kiseline termodinamički su nepovoljni procesi, što pridonosi njihovoj stabilnosti i njihovih estera.

Kroz godine, fenilborna kiselina (engl. *Phenylboronic Acid*, PBA) i njezini derivati, zahvaljujući svojim specifičnim strukturnim i kemijskim karakteristikama, pronašli su različite primjene. Tako primjerice PBA, zahvaljujući elektrofilnom atomu bora u svojoj strukturi, može stvarati i stabilizirati hidroksiboratne anione. Osim toga, prvi otkriveni inhibitor proteasoma korišten u medicinske svrhe je derivat borne kiseline poznat kao VELCADE (Bortezomib). Izuzetno je učinkovit u liječenju mnogih malignih bolesti poput raka prostate, gušterače, debelog crijeva itd. Borna kiselina, zajedno sa svojim esterskim derivatima, može se koristiti kao blaga i stabilna Lewisova kiselina, što omogućuje razvoj katalizatora za određene kemijske reakcije, uključujući asimetrične transformacije različitih spojeva. Također, borna kiselina može reverzibilno stvarati kovalentne spojeve s diolima, što se može iskoristiti za razvoj receptora za različite ugljikohidratne jedinice na staničnim membranama. Osim toga, poznato je i da borna kiselina i njezini derivati imaju antibakterijska,

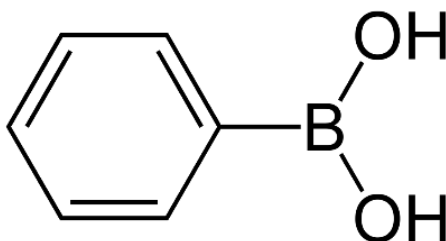
antikancerogena, antivirusna i antifungalna svojstva. Unatoč tome, još uvijek se malo zna o antiproliferativnim učincima fenilborne kiseline i benzoksaborola.

## 2. OPĆI DIO

Funkcija i djelovanje biološki aktivnih spojeva često proizlaze iz njihove specifične strukture koja rezultira određenim fizikalnim svojstvima i karakterističnom kemijskom reaktivnošću. Stoga će u ovom poglavlju biti detaljno opisana struktura, svojstva i ponašanje fenilborne i cimetine kiseline.

### 2.1. Struktura fenilborne kiseline i cimetine kiseline

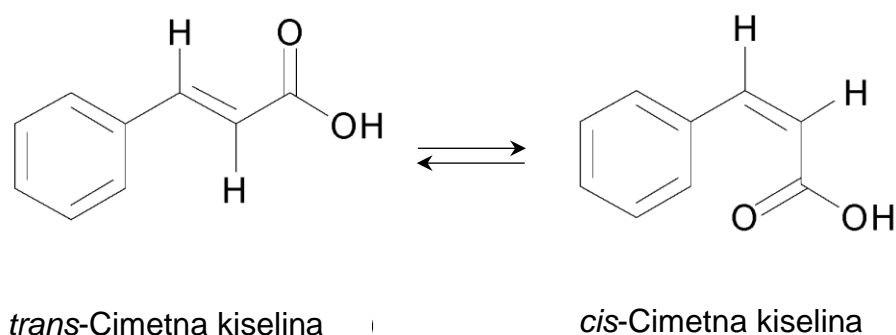
PBA pripada skupini derivata borne kiseline. Kako je prikazano na Slici 1<sup>1</sup>, ona se sastoji od fenilnog supstituenta na jednom hidroksilnom položaju i dviju slobodnih hidroksilnih skupina izvorne borne kiseline  $B(OH)_3$ . Prvi su o kristalnoj strukturi PBA izvijestili Rettig i Trotter koji su otkrili da su njeni kristali ortorompski.<sup>1</sup> Na dvije slobodne hidroksilne skupine mogu se vezati različite molekule, pri čemu veza postaje koplanarna s benzenskim prstenom. Wuest i njegovi kolege, proučavajući strukturu fenilborne kiseline primjetili su da ona ima tendenciju formiranja dimera stvaranjem vodikovih veza između slobodnih hidroksilnih skupina.<sup>2</sup> Kod fenilborne kiseline, B–O udaljenost je prilično kratka i kreće se u rasponu od 1,35 do 1,38 Å.



**Slika 1.** Struktura fenilborne kiseline.

Cimetna kiselina, prirodna aromatska karboksilna kiselina, je kemijski spoj koji se nalazi u biljkama kao što su *Cinnamomum cassia* (kineski cimet) i *Panax ginseng*,

te u raznim plodovima, cjelovitim žitaricama, povrću i medu.<sup>3</sup> S obzirom na prisustvo akrilne kiseline vezane na fenilnom prstenu (Slika 2)<sup>3</sup>, cimetna kiselina može imat *cis* ili *trans* konfiguraciju, pri čemu je ravnoteža znatno pomaknuta prema termodinamički stabilnijem *trans*-izomeru.<sup>4,5</sup> Istraživanja su pokazala da cimetna kiselina posjeduje niz korisnih svojstava, uključujući antioksidacijska, antimikrobna,<sup>6</sup> antikancerogena,<sup>7</sup> neuroprotektivna, protuupalna i antidijabetička svojstva.<sup>8</sup>



**Slika 2.** *Trans* i *cis* konfiguracija cimetne kiseline.

## 2.2. Fizikalna i kemijska svojstva fenilborne kiseline i cimetne kiseline

U Tablici 1 uspoređena su fizikalna i kemijska svojstva fenilborne kiseline i cimetne kiseline. S obzirom da sadrže nepolarni aromatski prsten i imaju mali dipolni moment, obje kiseline slabo su topljive u vodi, ali dobro topljive u određenim organskim otapalima kao što su metanol, etanol i acetonitril. Za razliku od fenilborne kiseline, cimetna kiselina se ipak otapa u vrućoj vodi. Točka tališta fenilborne nešto je viša u odnosu na cimetnu kiselinu, što je rezultat većeg broja vodikovih veza kod PBA.

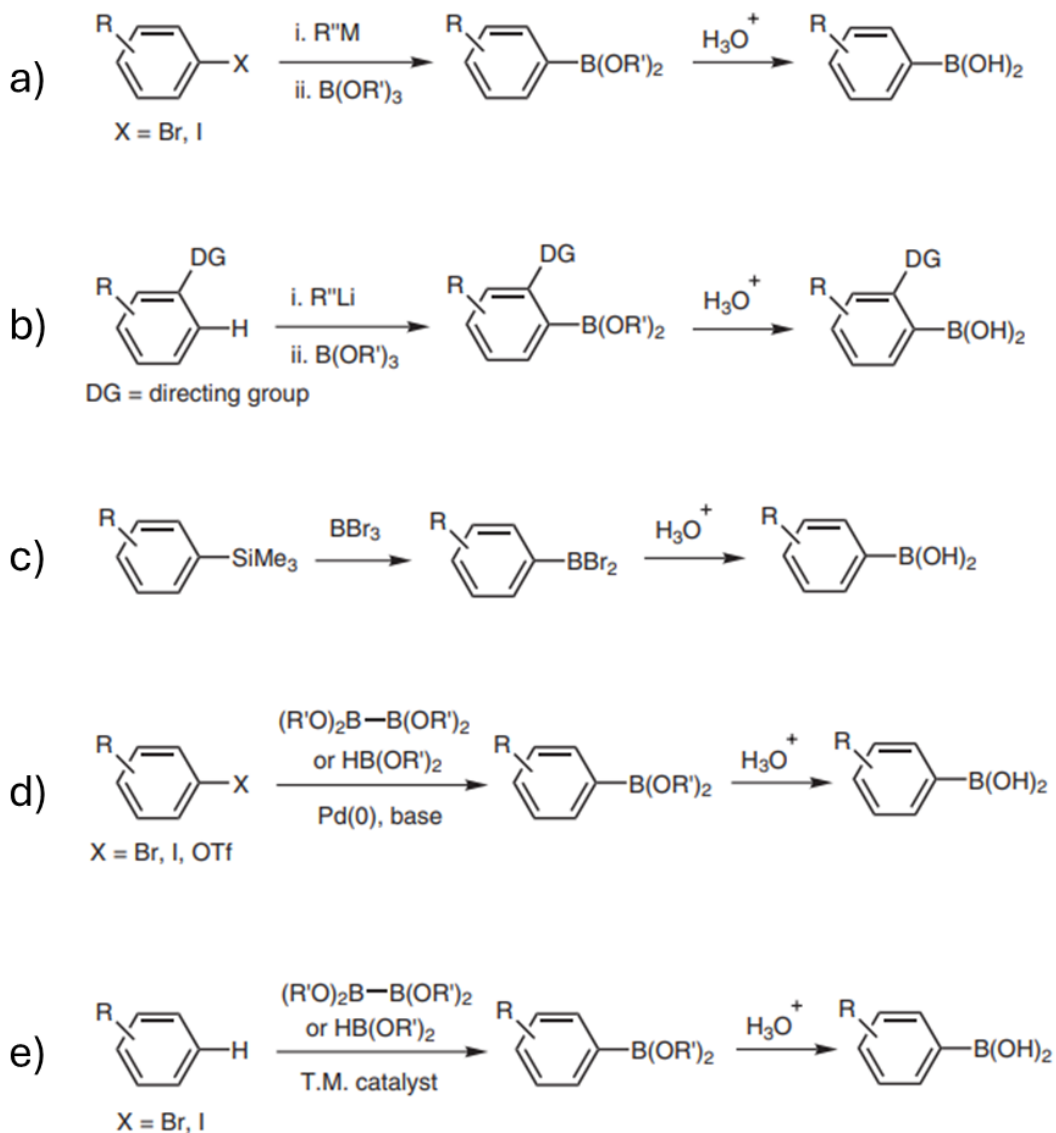


**Tablica 1.** Fizikalna i kemijska svojstva fenilborne i cimetine kiseline.

KISELINA	FENILBORNA KISELINA	CIMETNA KISELINA
TOPLJIVOST	sabo topljiva u vodi; vrlo dobro se otapa u metanolu, etanolu i acetonitrilu	slabo se otapa u hladnoj vodi, ali bolje u vrućoj vodi; dobro se otapa u etanolu, metanolu i acetonitrilu
TOČKA TALIŠTA	219 °C	132 °C do 134 °C
BOJA	bijela ili svijetložuta	bijela ili svijetložuta
pH	blago kisele	blago kisele
TOKSIČNOST	umjereno toksična	niska toksičnost kemijski povezana s brojnim toksičnim spojevima

### 2.3. Sinteza fenilborne kiseline

Nekoliko je pristupa sintezi derivata fenilborne kiseline, a svima im je zajedničko da se provode u dva stupnja od kojih je prvi dobivanje boratnog estera, a drugi kiselina hidroliza tog estera kako bi se dobio derivat slobodne borne kiseline. Predloženo je nekoliko metoda pripreme boratnog estera (Slika 3)<sup>9</sup> kojima se nastoji izbjeći stvaranje neželjenih borana i borinske kiseline, a temelje se na reakciji elektrofilnih borata s fenilmetalnim međuproduktima dobivenim iz fenilhalogenida. Problem pri tom predstavljaju mali prinosi ovih reakcija. Osim toga, izolacija slobodnih bornih kiselina obradom u vodenoj fazi može dovesti do dodatno nižih prinosa, posebno za male polarne derivate koji su skloniji otapanju u vodi čak i pri niskom pH. Stoga je jedan od prvih i, vjerojatno, još uvijek najjeftiniji i najčešći način sinteze arilbornih kiselina elektrofilna reakcija tvrdog organometalnog intermedijera (npr. litijevog ili magnezijevog) s boratnim esterom pri niskoj temperaturi popraćena kiselim hidrolizom dobivenog produkta čime se dobiva arilborne kiseline (Slika 3A).<sup>9,10</sup>

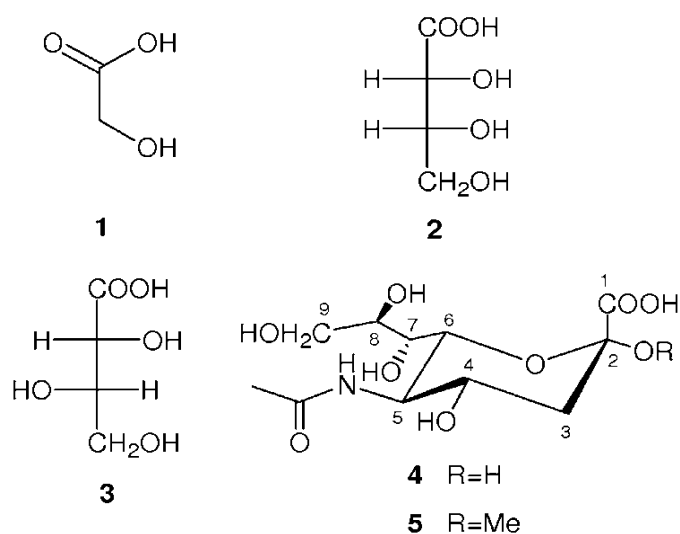


**Slika 3.** Različite metode sinteze fenilborne kiseline.

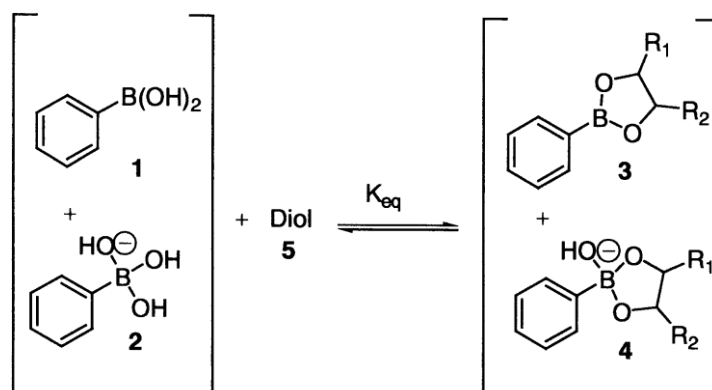
#### 2.4. Interakcije fenilbornih kiselina s diolima

Borne kiseline poznate su po tome da se s visokim afinitetom vežu sa spojevima koji sadrže diolne skupine putem reverzibilne esterske veze (Slike 4 i 5)<sup>11,12</sup>. Stabilnost

bornog estera ovisi o pH vrijednosti medija i otapalu, ali faktori koji upravljaju tim procesima nisu u potpunosti dobro shvaćeni. Budući da su najčešći dioli u biološkim sustavima šećeri, PBA se jako veže na monosaharide poput glukoze i fruktoze, što omogućava da se borne kiseline koriste kao elementi prepoznavanja u izradi senzora za saharide kao što su nukleotidi, ugljikohidrati i glikoproteini. Također, PBA ima visoku selektivnost i afinitet i za vezanje glikana na površini stanice, posebice sa sijalinskom kiselinom (engl. *Sialic Acid*, SA) pri čemu reverzibilno nastaju esteri borne kiseline.<sup>12</sup>



**Slika 4.** Struktura nekih od biološki važnih diola na koje se veže PBA.



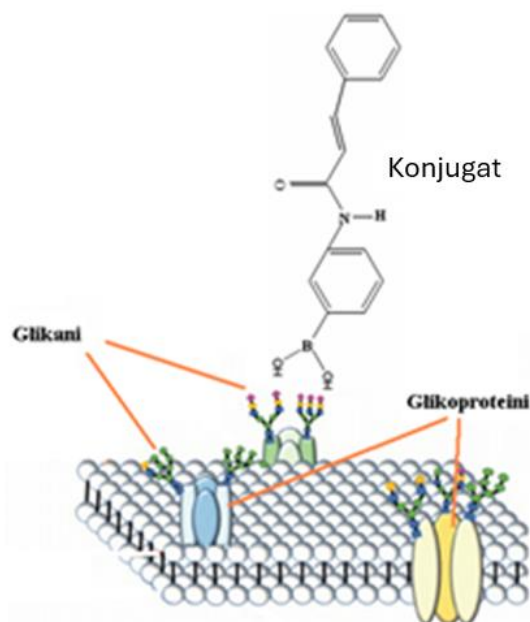
**Slika 5.** Vezanje borne kiseline na spojeve koji sadrže diolne skupine.

Upravo na ovim interakcijama temelje se antibakterijska, antivirusna, citotoksična i antitumorska svojstva derivata fenilborne kiseline čija se istraživanja posljednjih godina sve više intenziviraju.<sup>11</sup>

## 2.5. Primjeri primjene fenilborne kiseline

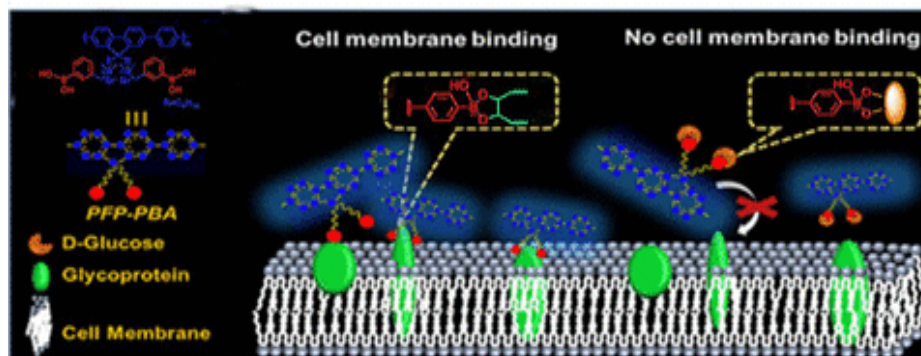
Rak je jedna od bolesti koja ugrožava ljudsko zdravlje, međutim, s obzirom na nedostatke trenutno korištenih dijagnostičkih i terapijskih metoda, za efikasno liječenje nužan je daljnji razvoj dijagnostičkih metoda vizualizacije raka u organizmu. U tom smislu, ciljano oslikavanje i ciljana terapija tumora od izuzetne su važnosti za dijagnozu i liječenje raka.

Kao jedna od glavnih komponenti staničnih membrana, glikoproteini imaju važnu ulogu u prijenosu signala (Slika 6).<sup>13</sup> Osim toga, glikoproteini na površini stanica usko su povezani s nastankom i razvojem tumora, a za zloćudne metastaze tumora karakteristično je da su njihovi membranski glikoproteini prekomjerno izraženi. PBA može interagirati s glikoproteinima na površini kancerogenih stanica u fiziološkim uvjetima, pa novija istraživanja vezana uz razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih metoda često uključuju upravo interakcije derivata PBA i membranskih glikana.



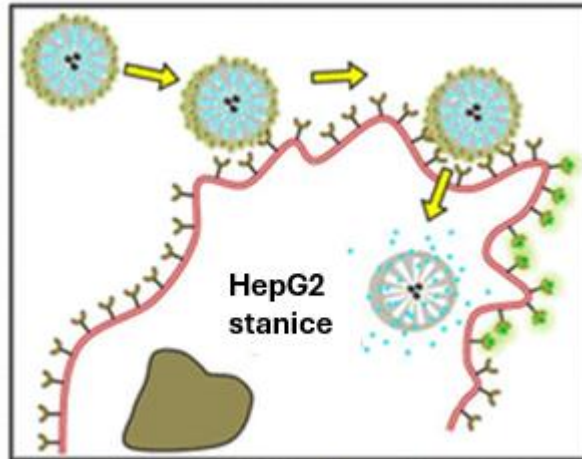
**Slika 6.** Vežanje PBA na glikane.

Među različitim tehnikama oslikavanja najčešće se koriste magnetska rezonancija, računalna tomografija, pozitronska emisijska tomografija, ultrazvuk, fotoakustično oslikavanje i fluorescencijsko oslikavanje (engl. *Fluorescence Lifetime Imaging*, FLI), itd. Među navedenim metodama, moderna FLI se ističe svojom sposobnošću korištenja specifičnih fluorescentnih probi koje se vežu na receptore s prekomjernom ekspresijom na površini tumora, omogućujući precizno oslikavanje tumora s visokom osjetljivošću i specifičnošću. Jedan od recentnih primjera sustava za FLI temelji se upravo na PBA i njoj sposobnosti specifičnog vezanja na glikane kao što je prikazano na Slici 7.<sup>13</sup> Ovaj ciljani pristup omogućuje specifično oslikavanje tumora u dijagnostičke svrhe. Obično se FLI provodi poticanjem fluorescentnih sonda kako bi se generirali fluorescentni signali za biološko oslikavanje, a FLI se može koristiti za oslikavanje stanica *in vitro* i *in vivo* oslikavanje.



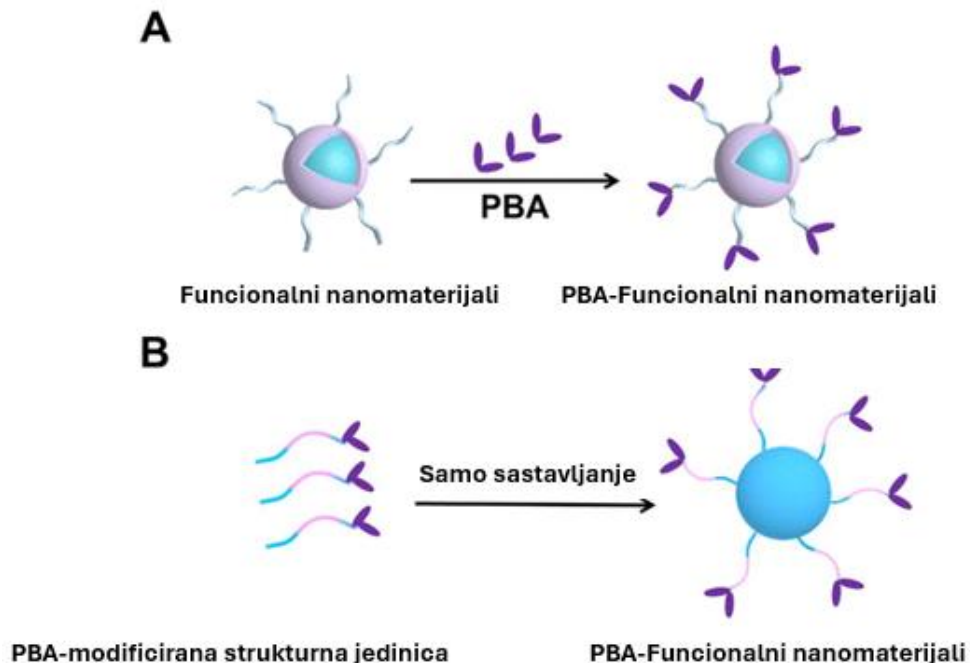
**Slika 7.** Kontrolirano oslikavanje stanične membrane s derivatom PBA.

PBA ključan je receptorski ligand s osobinama poput niske cijene, stabilnosti, malih dimenzija, niskog imunološkog odgovora i jednostavne kemijske modifikacije. Materijali funkcionalizirani s PBA nalaze raznolike primjene u biologiji i medicini. Temeljem reakcije PBA i šećera, dizajnirani su i nanomaterijali bazirani na PBA koji djeluju kao nosači lijekova kako bi se postigla precizna dostava do kancerogenih stanica (Slika 8).<sup>13</sup>



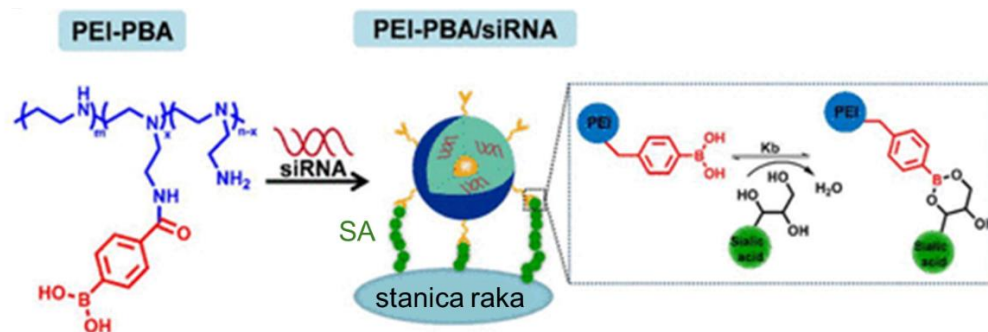
**Slika 8.** PBA-bazirani nanomaterijali kao nosači lijekova.

Dva su uobičajena pristupa dobivanju nanomaterijala modificiranih s PBA. Jedan način uključuje formiranje nanomaterijala (Slika 9A),<sup>14</sup> nakon čega slijedi pričvršćivanje PBA na njih putem kemijskih veza. Drugi način uključuje prvo oblikovanje strukturne jedinice modificirane PBA-om, a zatim samo-organizaciju u nanomaterijale modificirane s PBA (Slika 9B).<sup>14</sup>



**Slika 9.** A) Formiranje nanomaterijala i pričvršćivanje na PBA, B) Oblikovanje strukturne jedinice modificirane PBA-om, a zatim samosastavljanje u PBA-modificirane nanomaterijale.

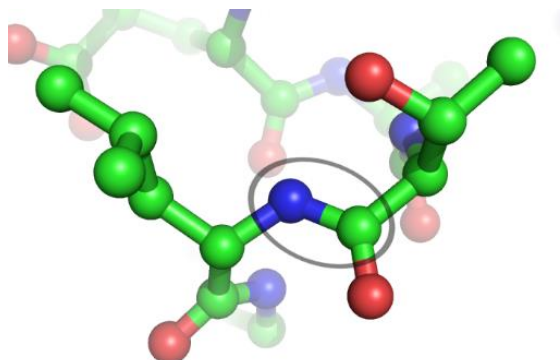
Razvoj funkcionalnih materijala temeljenih na PBA koji daju odgovor na tumorsku mikrookolinu možda će moći riješiti problem neselektivnog djelovanja uobičajenih kemoterapeutika i s tim povezanih nuspojava i manje efikasnosti liječenja, izbjegavajući vezanje skupine PBA za ciljanje na biomolekule prije doseg tumora. Trenutačno se većina funkcionalnih materijala temeljenih na PBA koji se koriste za liječenje raka sastoje od nanomaterijala. Mali molekularni lijekovi imaju jednostavnu metabolizaciju i nisku toksičnost, što je dodatni razlog zašto se takvi spojevi temeljeni na PBA kao ligandu sve više koriste za razvoj antikancerogenih lijekova (Slika 10)<sup>15</sup>, kao i funkcionalni materijali temeljeni na PBA.



**Slika 10.** Grafički prikaz aktivnog ciljanja u genskoj terapiji korištenjem funkcionalnih materijala temeljenih na PBA.

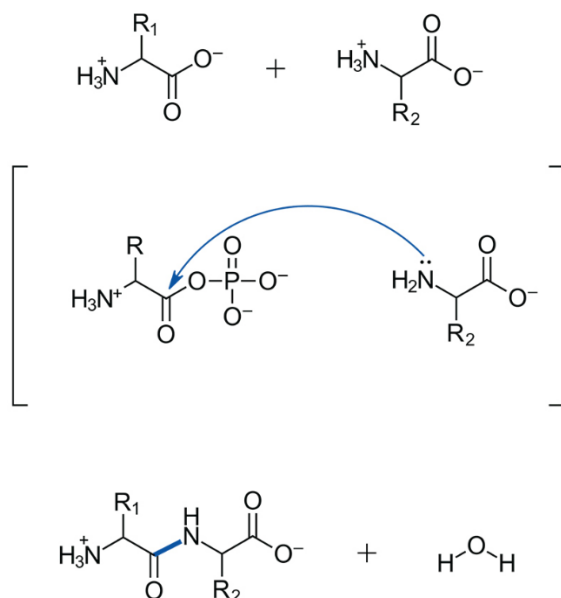
## 2.6. Metode formiranja amidnih i peptidnih veza

Peptidna veza je tip amidne kovalentne kemijske veze gdje karboksilna skupina reagira s amino skupinom (Slike 11 i 12)<sup>16</sup> uslijed čega dolazi do otpuštanja molekule vode. Na ovaj se način aminokiseline povezuju u peptide. Funkcionalna skupina peptidne veze je  $-C(=O)NH-$ .<sup>16</sup>



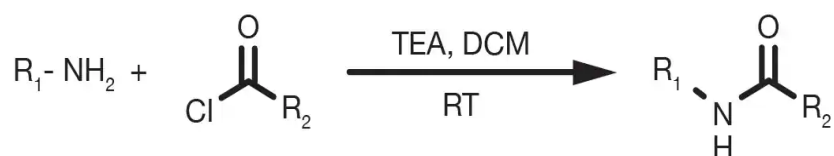
**Slika 11.** Primjer peptidne veze.





**Slika 12.** Mehanizam stvaranja peptidne veze između dvije aminokiseline.

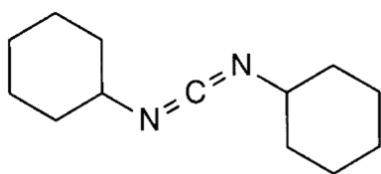
U sintetskoj kemiji, direktna reakcija između karboksilne kiseline i amina često nije idealna zbog problema s razmjenom protona između kiseline i baze. Stoga se često koristi strategija aktivacije karboksilne kiseline kako bi se dobila elektrofilnija forma poput acil-kloridi ili anhidridi. Ovi aktivirani spojevi lako reagiraju s primarnim ili sekundarnim aminima kako bi stvorili amide kako je prikazano na Slici 13.<sup>17</sup>



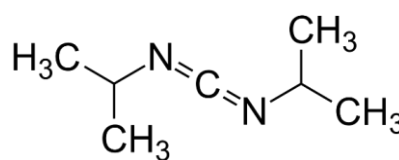
**Slika 13.** Formiranje amidne veze.<sup>[17]</sup>

Ovakva acilacija amina pomoću acil-klorida poznata je kao Schotten-Baumannova reakcija, imenovana po svojim otkrivačima. Opisana reakcija obično brzo napreduje pri sobnoj temperaturi u aprotičnim otapalima uz dodatak odgovarajuće baze poput tercijarnih amina ili piridina.

Proteklih tri desetljeća postignut je značajan napredak u sintezi amidnih veza, zahvaljujući istraživanjima u području sinteze peptida. Pokazano je da se karboksilna skupina jedne molekule i amino skupina druge molekule mogu direktno i brzo reagirati s visokim prinosima pri tretmanu karbodiimidima na sobnoj temperaturi.<sup>16</sup> Dva najčešća reagensa iz ove skupine su dicikloheksilkarbodiimid (DCC, Slika 14) i diizopropilkarbodiimid (DIC, Slika 15) te 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC).



**Slika 14.** Strukturna formula DCC.



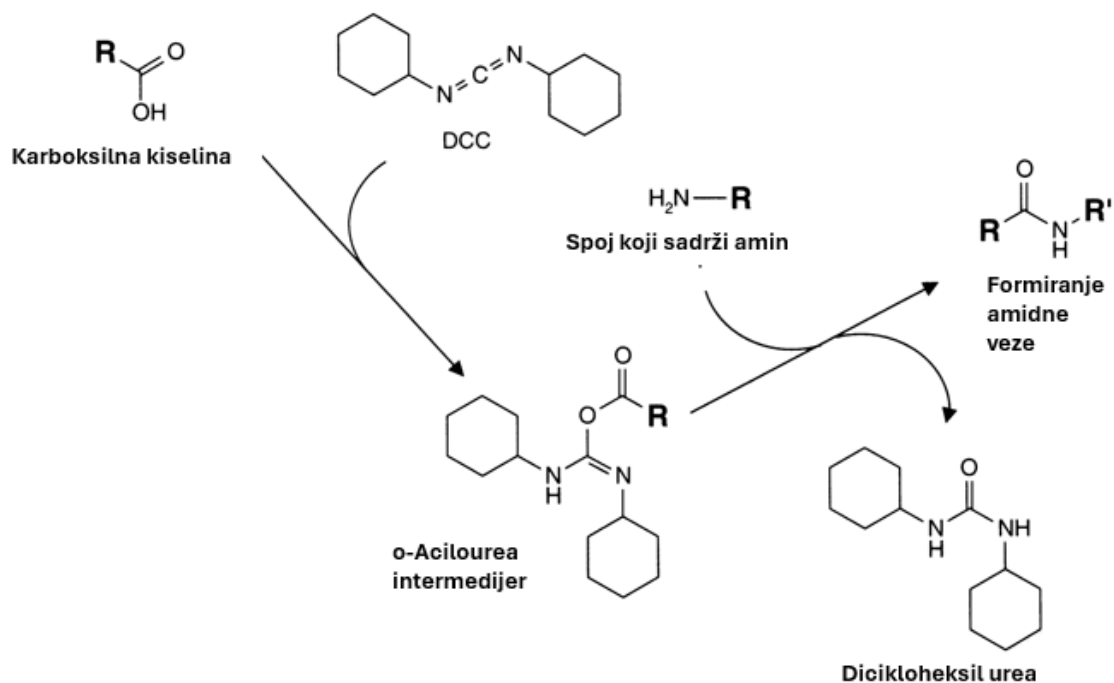
**Slika 15.** Strukturna formula DIC.

Navedeni reagensi s karboksilnim kiselinama daju visoko reaktivnu *O*-acilureu koja se može prevesti u amid reakcijom s aminom, uz visoke prinose i kratka vremena reakcije. *O*-aciluree su među najreaktivnijim međuproduktima za sprežanje amidima, međutim, one se mogu spontano racemizirati što treba uzeti u obzir u sintetskoj strategiji.<sup>15</sup>

Temeljni kemijski princip koji dijele mnogi komercijalno dostupni reagensi za sprežanje peptida je sinteza visoko aktiviranog estera. Iako su mnogi od ovih reagenasa prvotno razvijeni za sintezu peptida, iste se sintetičke strategije u načelu mogu primijeniti na sintezu bilo kojeg amida.

DCC je jedan od najčešće korištenih spojeva za spajanje u sintezama amidnih veza i koristi se za sinteze peptida od 1955. godine, a i dalje ostaje popularan izbor. DCC je čvrsta voskasta tvar, netopiv je u vodi ali je u nepolarnim organskim otapalima, a njegove pare su izuzetno opasne za inhalaciju i za oči. Osim formiranja amidnih veza, DCC se koristi i za pripremu aktivnih estera spojeva koji sadrže karboksilate.<sup>17</sup> Mehanizam DCC-om potpomognute sinteze amidnih veza prikazan je na Slici 16.<sup>17</sup> U prvom koraku DCC reagira s karboksilnom skupinom kiseline dajući *O*-acilizoureu

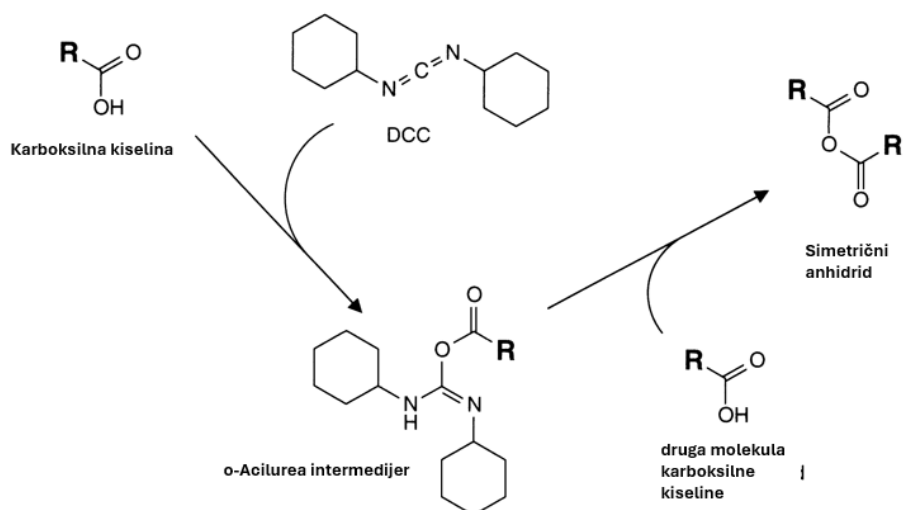
kao aktivirani međuprodukt koji zatim u reakciji s aminom daje stvarajući amidnu vezu dok se nusprodukt *N,N'*-dicikloheksil urea, koja je netopljiva u vodi i u većini organskih otapala, može lako ukloniti taloženjem.



**Slika 16.** Mehanizam stvaranja amidnih veza uz DCC.

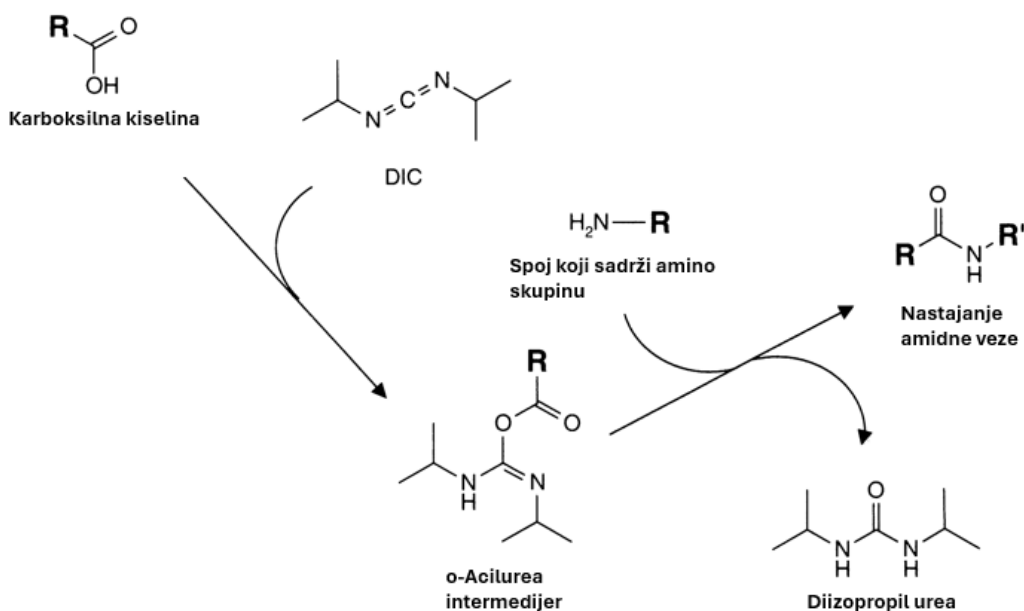
Zanimljivo, reakcija DCC-a i dipeptidnog derivata u kojem je optički aktivna aminokiselina pružila slobodnu karboksilnu funkciju (karbobenzilglicil-L-fenilalanin), nije otkrivena nikakva racemizacija. Ovo je važno zapažanje u sintezi većih peptida spajanjem jedinica koje sadrže dvije, tri ili više aminokiselina.<sup>16</sup>

Ako se DCC doda u suvišku molekulama koje sadrže karboksilnu skupinu bez prisutnosti amina, tada aktivirani karboksilat odnosno O-acilni međuprodukt može reagirati s drugom karboksilnom kiselinom i formirati simetrični anhidrid (Slika 17). Ova sporedna reakcija može predstavljati značajan problem u sintezi amida.



**Slika 17.** Formiranje simetričnog anhidrida.

Osim DCC-a, za formiranje amidnih veza često se koristi i diizopropil karbodiimid, DIC. Ovaj simetrični karbodiimid je također netopljiv u vodi, ali i ima neke prednosti u odnosu na DCC. Na sobnoj temperaturi je u tekućem stanju, što olakšava njegovo doziranje u odnosu na DCC. Nadalje, nusproizvodi kod njegovog korištenja za sintezu amidnih veza, diizopropilurea i diizopropil-*N*-acilurea, topljiviji su u organskim otapalima od nusprodukata odgovarajućih reakcija s DCC-om. DIC reagira slično kao DCC, formirajući aktivni *O*-acilizourea međuprodukt s karboksilnom kiselinom. Ova aktivna vrsta zatim može reagirati s nukleofilom poput amina kako bi formirala amidnu vezu. Pretpostavlja se da su sve moguće sporedne reakcije kojima DCC može podlijeći također moguće s DIC-om, iako to nije u potpunosti istraženo. DIC reagira s karboksilnim skupinama formirajući aktivne esterske međuprodukte koji reakcijom s aminima formiraju amidne veze kao što je prikazano na Slici 18<sup>16</sup>. Za razliku od drugih reakcija za aktiviranje karboksila koje uključuju formiranje mješovitih anhidrida, reakcija nije osjetljiva na vlagu. Izvanredna selektivnost reagensa potvrđena je uspješnom uporabom karbobenzoilserina kao acetilacijske jedinice bez zaštite hidroksilne grupe.<sup>16</sup>



**Slika 18.** Formiranje amidne veze reakcijom karboksilata i DIC.

## 2.7. Konjugati fenilborne kiseline i bioaktivnih organskih spojeva

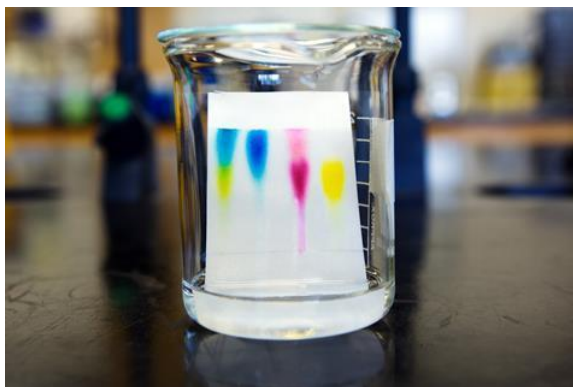
Istraživanje biološke aktivnosti konjugata biološki aktivnih organskih kiselina s PBA predstavlja novu dimenziju istraživanja te otvara nove mogućnosti liječenja i prevencije raznih bolesti. S obzirom na opisane mogućnosti PBA u selektivnoj i ciljanoj terapiji, zanimljivo je njeno povezivanje s prirodnim organskim spojevima za koje je pokazano da imaju znatnu biološku aktivnost. Jedan od takvih spojeva je i cimetna kiselina, a dobivanje njenog konjugata s PBA upravo je glavni cilj ovog rada.

## 2.8. Korištene metode detekcije i izolacije produkata sinteze

### 2.8.1. Tankoslojna kromatografija i kromatografija na stupcu

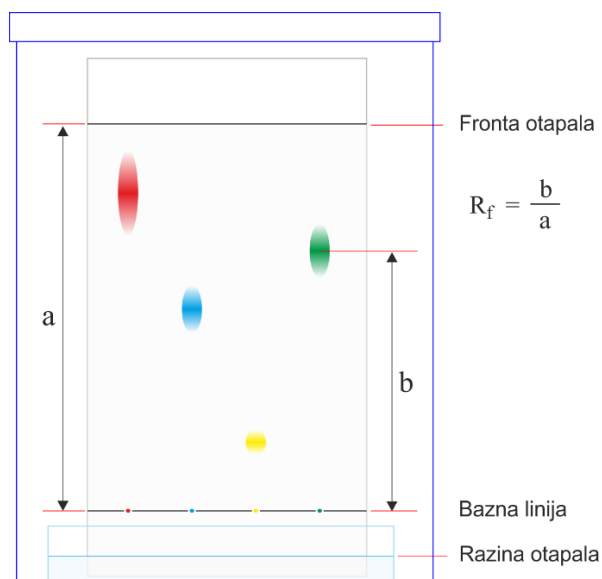
Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) je kromatografska tehnika razdvajanja smjesa koju je 1906. godine uveo M. Tsvett<sup>19</sup>

TLC se provodi na staklenoj ploči ili aluminijskoj foliji premazanoj tankim slojem adsorbirajućeg materijala poput silicijevog oksida, aluminijevog oksida ili celuloze što predstavlja stacionarnu fazu. Nakon nanošenja uzorka na ploču, ona se dijelom uranja u otapalo ili smjesu otapala što predstavlja mobilnu fazu, te se ostavlja u zatvorenoj posudi da se razvije (Slika 21)<sup>20</sup>. Pri tome se mobilna faza kreće po ploči uslijed djelovanja kapilarnih sila. Različiti analiti kreću se na TLC ploči nošeni mobilnom fazom različitim brzinama, što omogućuje njihovo razdvajanje. TLC se može koristiti za praćenje reakcija, identifikaciju spojeva i određivanje čistoće tvari. Razdvajanje spojeva temelji se na njihovoj različitoj raspodijeli između mobilne i stacionarne fazi, uslijed čega se određeni spojevi zadržavaju bliže startnoj liniji, dok drugi putuju dalje s frontom otapala.<sup>19</sup>



**Slika 21.** Razvijanje tankoslojne kromatografije<sup>[20]</sup>.

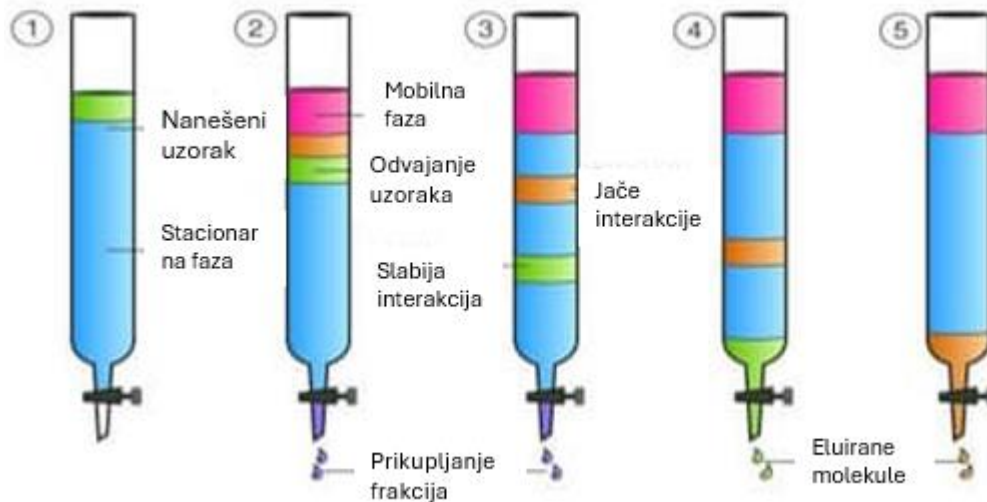
Faktor zaostajanja ili retencijski faktor,  $R_f$  (eng. *Retardation Factor*)<sup>21</sup> je mjera koja se koristi u tankoslojnoj kromatografiji. Označava omjer između udaljenosti koju je prešla središnja točka mrlje određene tvari i udaljenosti fronte otapala od točke nanošenja uzorka (Slika 22).  $R_f$  ovisi o: prirodi adsorbenta, pokretnoj fazi, temperaturi, debljini sloja, masi uzorka i kromatografskoj tehnici.



**Slika 22.** Prikaz izračunavanja faktora zaostajanja.<sup>[22]</sup>

Analitička kromatografija se obično provodi s manjim količinama materijala i služi za utvrđivanje prisutnosti ili mjerenje relativnih proporcija analita u smjesi. Nasuprot tome, preparativna kromatografija je jedna od najčešćih i najvažnijih tehnika pročišćavanja u organskoj kemiji i koristi se u laboratorijima diljem svijeta. Svrha preparativne kromatografije je odvojiti komponente smjese za kasniju uporabu, te je stoga oblik pročišćavanja.<sup>23</sup>

Osim tankoslojne kromatografije, jako često se kao metoda odjeljivanja primjenjuje i kromatografija na stupcu (Slika 23)<sup>24</sup>. Kromatografija na stupcu ne posjeduje brzinu i jednostavnost tankoslojne kromatografije, ali ima prednost da može obrađivati veće količine uzorka. Pri tom, silikagel je stacionarna faza koja se nalazi u kromatografskom stupcu, dok je otapalo, donosno smjesa otapala, mobilna faza. Za razliku od TLC-a, mobilna faza kreće se niz stacionarnu djelovanjem gravitacijske sile, noseći pri tom analit čije se komponente razdvajaju zbog različitih raspodjela između dviju faza. Frakcije mobilne faze s pojedinom komponentom se sakupljaju te se ekstrakcijom otapala izoliraju čiste komponente početne smjese.



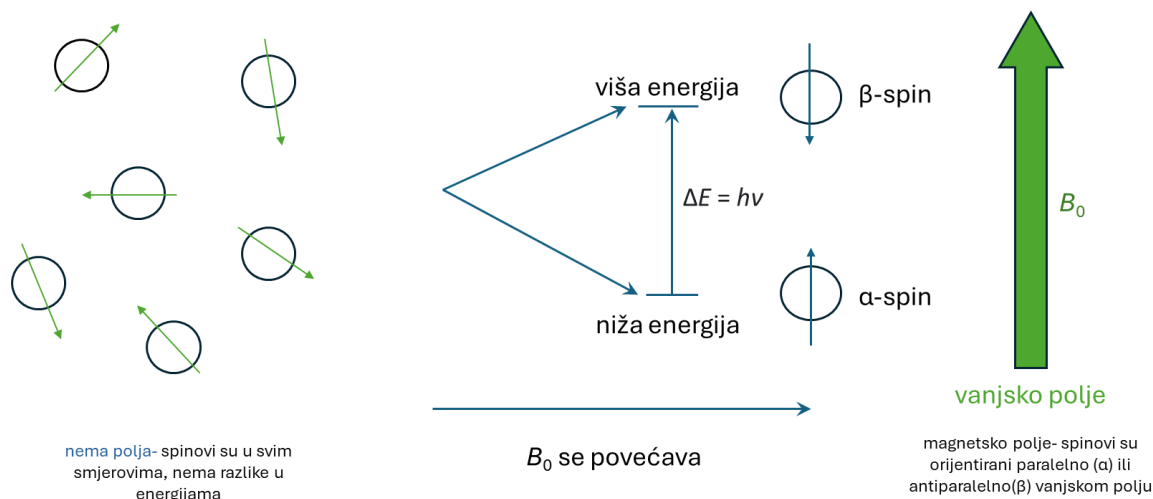
**Slika 23.** Kromatografija na stupcu.

### 2.8.2. 2.8.2. Nuklearna magnetska rezonanca

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) najmoćnija je spektroskopska metoda određivanja strukture organskih spojeva. Najkorisniji su protonski i ugljikov NMR jer su vodik i ugljik glavne komponente organskih spojeva.<sup>25</sup>

NMR spektroskopija se razlikuje u nekoliko važnih aspekata od drugih oblika spektroskopije. Prvo, generiranje osnovnih i pobuđenih NMR stanja zahtijeva postojanje vanjskog magnetskog polja,  $B_0$  (Slika 24)<sup>26</sup>. U odsutnosti vanjskog magnetskog polja, magnetski momenti jezgri imaju slučajnu orijentaciju. Kada se primijeni vanjsko magnetsko polje, svaka jezgra u uzorku zauzima  $\alpha$ -spinsko stanje ili  $\beta$ -spinsko stanje. Kako je  $\alpha$ -spinsko stanje niže energije, više je  $\alpha$ -spinova nego  $\beta$ -spinova, a razlika u energiji između ova dva stanja proporcionalna je karakterističnoj frekvenciji prijelaza.





**Slika 24.** Orijehtacija nuklearnog spina u vanjskom magnetskom polju.

Drugo, pobuđeno stanje u NMR spektroskopiji ima životni vijek koji je otprilike  $10^9$  puta duži od životnog vijeka pobuđenih elektronskih stanja.

Za sve oblike spektroskopije potrebno je imati dva ili više različitih stanja sustava koja se razlikuju po energiji. U sustavu s dvije razine energije, ona s nižom razinom energije često se naziva osnovnim stanjem, dok se viša razina energije naziva pobuđenim stanjem. U slučaju spektroskopije NMR, energije ovih stanja proizlaze iz interakcije nuklearnog magnetskog dipolnog momenta s jakim vanjskim magnetskim poljem.

Nuklearni magnetski dipolni moment proizlazi iz kutnog momenta spina jezgre. Sve jezgre s neparnim masenim brojem (npr.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) imaju kutni moment spina jer imaju neparan broj protona. Sve jezgre s parnim masenim brojem i neparnim nabojem (npr.  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ) također imaju kutni moment spina.

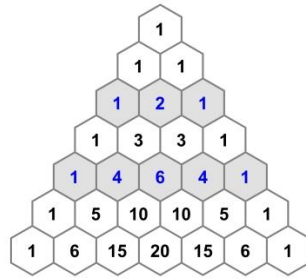
$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri najčešće se snimaju u aprotičnim otapalima ili u otapalima gdje je vodik u obliku koji se ne detektira. Za  $^{13}\text{C}$  NMR potreban je drugačiji pristup detekciji jer je koncentracija koja je dovoljna za  $^1\text{H}$  NMR premala za  $^{13}\text{C}$  NMR. Važno je napomenuti da se tijekom snimanja NMR spektara uzorak ne troši, već se samo otapa.<sup>27</sup>

Kemijski pomak označava položaj u spektru NMR signala koji odgovara određenoj vrsti jezgre koja se promatra, a njegova mjerna jedinica je ppm. Atomi vodika daju signal u području od 0-10 ppm, dok atomi ugljika daju signal u rasponu od 0-200 ppm. Za iste molekule, razmaci između signala su znatno veći za  $^{13}\text{C}$  nego za  $^1\text{H}$  jezgru.<sup>26</sup>

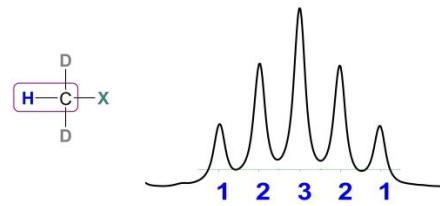
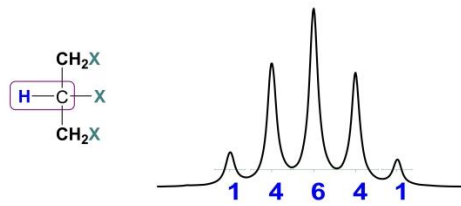
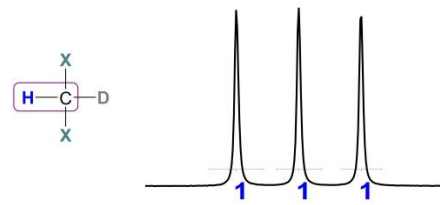
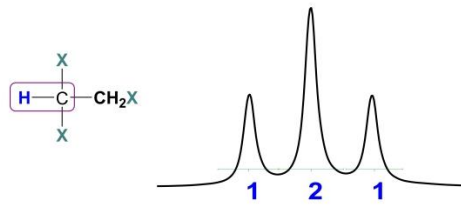
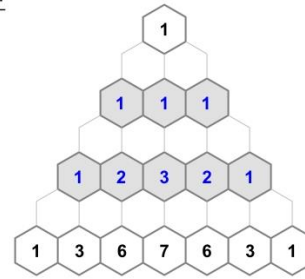
Kemijski pomak jezgre odražava kemijsku i elektronsku okolinu te ovisi o gustoći elektrona oko jezgre. Ovaj pomak nastaje jer na jezgru ne djeluje samo magnetsko polje  $B_0$  primijenjeno u eksperimentu, već i individualno magnetsko polje  $B_i$ , koje je rezultat superpozicije polja  $B_0$  i lokalnog magnetskog polja  $B_{\text{ind}}$  induciranog kretanjem elektrona oko jezgre u suprotnom smjeru od  $B_0$ . Zbog toga je kemijski pomak osjetljiv na konfiguracijske i konformacijske karakteristike molekule. U molekuli elektronski oblak smanjuje utjecaj magnetskog polja na jezgru pa se kaže da je takva jezgra zasjenjena. Efektivno magnetsko polje oko zasjenjenog vodikovog atoma uvijek je slabije od vanjskog polja, pa se vanjsko polje mora povećati da bi došlo do rezonancije pri danoj frekvenciji. Međutim nisu sve jezgre jednako zasjenjene. Prisutnost elektronegativnog atoma u molekuli privlači elektronski oblak sebi pa će susjedne jezgre biti odsjenjene odnosno nalazit će se u slabijem magnetskom polju kojem odgovaraju više frekvencije prijelaza te će u NMR pokazivati viši kemijski pomak. Kemijski pomak ne ovisi o jačini primijenjenog vanjskog magnetskog polja.<sup>26</sup>

Površina integrala signala u protonskoj spektroskopiji NMR proporcionalna je broju vodikovih atoma u molekuli. Osim toga, NMR signali mogu imati različit broj pikova (engl. *Peak* = vrh) odnosno različit broj linija u pojedinom signalu u spektru. To se naziva cijepanjem signala ili multipletnost.<sup>[25]</sup> Cijepanje signala jedna je od najjedinstvenijih i najvažnijih značajka koja čini NMR spektroskopiju sveobuhvatnim alatom za određivanje strukture. Broj linija NMR signala opisuje pravilo  $N+1$ : ako je promatrana jezgra u sprezi s  $N$  susjednih ekvivalentnih jezgri, njen će signal u NMR spektru biti pocijepan u  $N + 1$  linija. Relativne površine  $N + 1$  multipleta dane su odgovarajućim retkom Pascalova trokuta (Slika 25)<sup>27</sup>.

	$n$	$2^n$	$n+1$
singlet	0	1	1
doublet	1	2	2
triplet	2	4	3
quartet	3	8	4
quintet	4	16	5
sextet	5	32	6
septet	6	64	7



	$n$	$3^n$	$2n+1$
singlet	0	1	1
triplet	1	3	3
quintet	2	9	5
septet	3	27	7



**Slika 25.** Cijepanje signala u NMR spektrima i Pascalov trokut.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

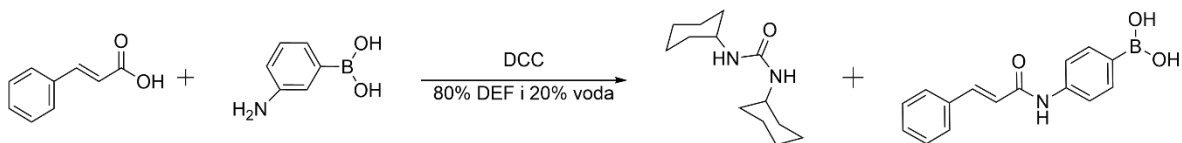
Sve kemikalije korištene u sintezama spojeva u ovom radu bile su p.a. čistoće i korištene su bez dodatnog pročišćavanja, a otapala su pročišćena standardnim postupcima čišćenja i sušenja.

Tankoslojna kromatografija je provođena na folijama silikagela Kiesergel 60 F245, „Merck“. Mrlje su karakterizirane pomoću UV zračenja (254 i 365 nm), vrijednosti  $R_f$  su približne.

Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom ThermoFisher Scientific Ultimate 3000RS / TSQ Quantis korišten je za preliminarnu provjeru čistoće uzoraka.

Spojevi pripremljeni u okviru ovog rada okarakterizirani su  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom pri čemu su spektri snimljeni pri frekvencijama od 300 ili 600 MHz na instrumentu Bruker Avance u deuteriranim otapalima, s tetrametilsilanom (TMS) kao unutarnjim standardom. Kemijski pomaci izraženi su u  $\delta/\text{ppm}$  vrijednostima (prema  $\text{Me}_4\text{Si}$ ). U zagradama je naznačen oblik signala: (s) singlet, (d) dublet, (t) triplet, (q) kvartet i (m) multiplet.

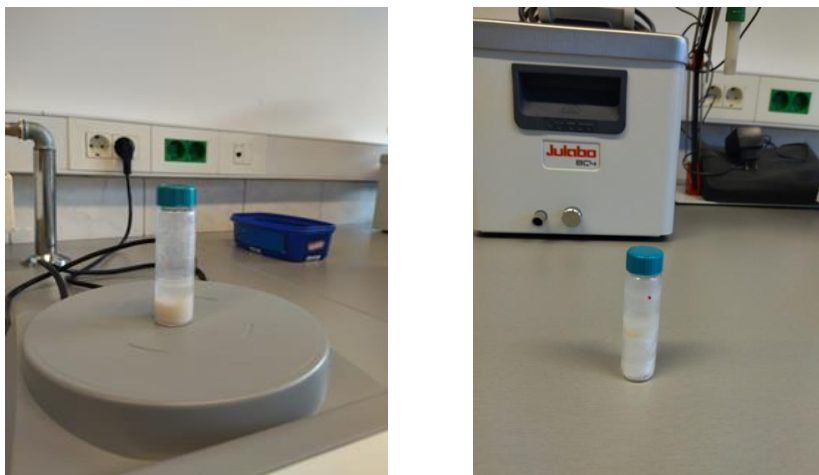
#### 3.1. Sinteza konjugata pomoću dicikloheksilkarbodiimida



**Slika 26.** Sinteza konjugata cimetne i 3-aminofenilborne kiseline uz DCC.

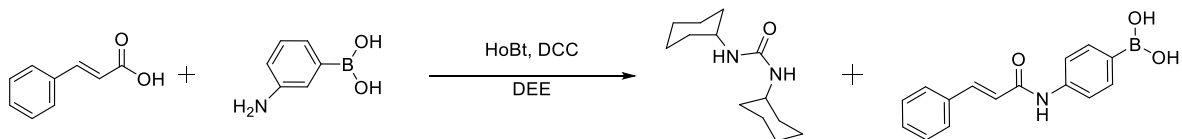
73,9 mg cimetne kiseline (CA) (1 mmol) i 68,6 mg 3-aminofenilborne kiseline (APBA)(0,5 mmol) otopljeno je u minimalnoj količini diklormetana (DCM) te ostavljeno da se smjesa hladi na ledenoj kupelji. U drugoj epruveti je otopljeno je 118,7 mg DCC (1 mmol) u DCM i dobivena otopina se dodaje u prvu epruvetu.

Epruveta u kojoj se nalazi smjesa je ostavljena preko noći da se miješa (Slika 27). Nakon 24 sata došlo je do pojave bijelog taloga koji se vrlo jednostavno odvoji postupkom filtracije. S obzirom da DCM isparava pri sobnoj temperaturi, ostavljanjem reakcijske smjese u otvorenoj tikvici preko noći on je potpuno ispario. Na ovaj način izoliran je bijeli prah, 153,93 mg.



Slika 27. Epruveta s navedenom smjesom.

### 3.2. Sinteza konjugata u dietil-eteru uz HOBt



Slika 28. Sinteza konjugata cimetine i 3-aminofenilborne kiseline uz HOBt.

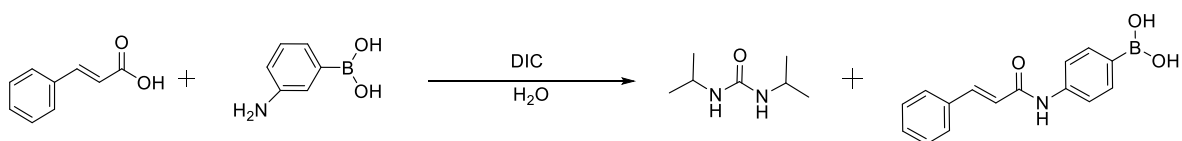
U prvu epruvetu je dodano je 37,04 mg (0,25 mmol) CA, 33,78 mg (0,25 mmol) *N*-hidroksibenzotriazol, (HOBt), 51,58 mg (0,25 mmol) DCC-a te je otopljena u minimalnoj količini dietil-etera (DEE). Prva epruveta stavljena je na magnetsku miješalicu. U drugu epruetu dodano je 34,23 mg (0,25 mmol) APBA koja je također otopljena u minimalnoj količini DEE. Nakon 10 minuta miješanja na magnetskoj miješalici, u prvu epruvetu je dodana otopina iz druge epruvete. Miješanje je

nastavljeno tijekom cijele noći pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, smjesa se ohladi u hladnjaku pri čemu dolazi do pojave bijelog taloga. Talog je odvojen od matičnice postupkom filtracije. Izolirano je 128,3 mg, a produkt ispitan tankoslojnom kromatografijom (Slika 29).



**Slika 29.** TLC pločice nakon detekcije

### 3.3. Sinteza konjugata pomoću diizopropilkarbodiimida



**Slika 30.** Sinteza konjugata cimetne i 3-aminofenilborne kiseline pomoću diizopropilkarbodiimida.

Izvagano je 148 mg (1 mmol) CA i 126 mg (1 mmol) DIC te je pomiješano s destiliranom vodom. Smjesa je stavljena na magnetsku mješalicu gdje je postupak trajao sve dok nije došlo do potpune reakcije. Reakcija je praćena svakih 15 min pomoću TLC uz petroleter : etilacetat (4:1) kao mobilnu fazu. Nakon toga, reakcijska

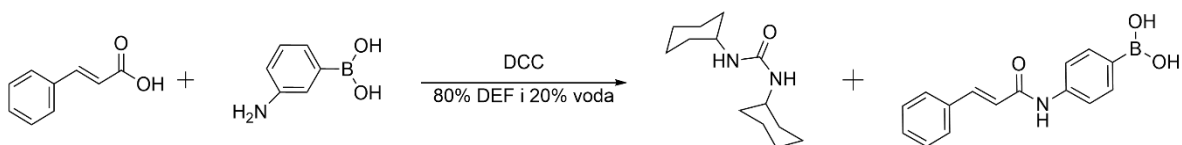
smjesa djelomično je uparena (Slika 31) od otapala kako bi joj se smanjio volumen te je dodan aceton da omjer dviju faza bude 50:50. Nakon toga dodana je APBA kao nukleofil, te nakon sat vremena dolazi do stvaranja minimalne količine produkta (1,75 mg), koji je izoliran filtracijom.

Sinteza je ponovljena uz razliku da je nakon završetka reakcije prekriztalizacija provedena iz etanola, međutim pri tom nije došlo do pojave taloga.



**Slika 31.** Rotacijski uparivač.

### 3.4. Sinteza konjugata u smjesi dietil-eter : voda



**Slika 32.** Sinteza konjugata cimetne i 3-aminofenilborne kiseline u smjesi DEE i vode.

Izvagano je 74 mg (0,5 mol) CA i 103 mg (0,5 mol) DCC suspendirano je u 80% DEE i 20% vode. Nakon 10 min miješanja dodano je 60,965 grama (0,5 mol) APBA i smijesa je ostavljena da se miješa tijekom noći. Nakon toga, reakcijska smjesa ostavljena je 24 sata na sobnoj temperaturi da ispari DEE. Kada je prošlo 24 sata reakcijska smjesa je filtrirana preko Buchnerovog lijevka (Slika 33) te je napravljen TLC taloga i matičnice uz petroleter : etilacetat u omjeru 4:1 kao mobilnu fazu. Matičnica je uparena do suhoga čime je dobiveno 22,53 mg bijelog praha.



**Slika 33.** Büchnerov lijevak.



### 3.5. Sinteza konjugata uz DMAP



**Slika 34.** Sinteza konjugata cimetne i 3-aminofenilborne kiseline u DCM uz DMAP i DCC.

U tikvicu je dodano 206 mg (1 mmol) DCC, a u drugu tikvicu je dodano 148 mg (1 mmol) CA, 122 mg (1 mmol) APBA i 0,1 mmol dimetoksiopropan (DMAP). Druga tikvica stavljena je u ledenu kupelj te su dodane minimalne količine DCM da dođe do otapanja taloga. Nakon što dođe do otapanja ispitana je CA, APBA, DMAP, mix i reakcijska smjesa uz pomoć TLC-a uz petroleter : etilacetat u omjeru 4:1 (20 ml petroletera naprema 5 ml etilacetata) kao mobilnu fazu te je uočeno stvaranje produkta. Smjesa je ostavljena da se miješa u ledenoj kuplji na magnetskoj miješalici. Nakon što se tikvica 2 ohladila, uklanja se ledena kupelj i dodaje se DCC koji je prije dodavanja otopljen u diklormetanu.

Nakon pola sata, TLC je i dalje pokazivao dvije mrlje (Slika 35). Nakon još sat vremena dolazi do pojavljivanja žutog taloga koji se ostavlja miješati. Nakon tri sata vidljivo je da dolazi do pojavljivanja bijelog taloga. Tikvica se zatvori i ostavili preko noći. Nakon 24 h, reakcijska smjesa je profiltrirana preko Buchnerovog lijevka čime je izolirano 64,84 mg taloga. Matičnica je uparena do suha te je dobivenom suhom ostatku dodan DEE. Dolazi do pojave taloga te se filtrat i talog odvoje filtracijom. Filtrat je uparen do suha, dodan mu je acetonitril i smjesa je ostavljena da kristalizira u hladnjaku kroz nekoliko dana pri čemu je došlo do pojave bijelo-smeđeg taloga koji je nakon toga ofiltriran, a dobiveno je 145,7 mg.

Isti ovaj postupak je ponovljen, a reakcijska smjesa dobivena hlađenjem preko noći dalje je nakon uparavanja otapala pročišćavana kromatografijom na stupcu (Slika 37) uz petroleter : etilacetat u omjeru 4:1 kao mobilnu fazu. Kolona je napravljena tako da je silikagel stavljen u otapalo petroletera i etilacetat, dok je uzorak otopljen u minimalnoj količini acetonitrila s kloroformom te nanesen na stupac. Izolirane su tri frakcije (Slika 35) od 15,9 mg, 27,4 mg i 60,6 mg.



**Slika 35.** Kromatografija na stupcu.

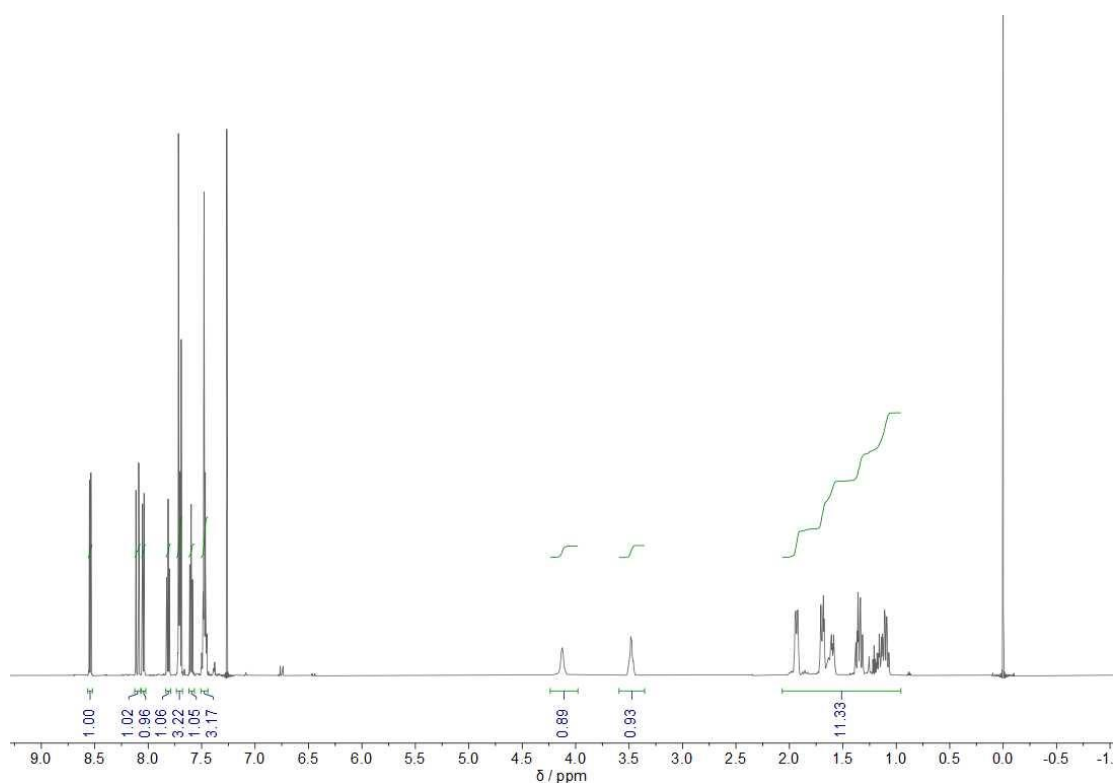
Isti sintetski postupak je ponovljen, a reakcijska smjesa dobivena hlađenjem preko noći dalje je nakon uparavanja otapala pročišćavana preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz petroleter : etilacetat u omjeru 4:1 kao mobilnu fazu. Izolirane su tri frakcije od 8,3 mg, 14,2 mg i 36,53 mg.

Isti sintetski postupak ponovljen je pri nižoj temperaturi bez dodatka DCC, ali pri tom TLC-om nije opažen nastanak produkta.

## 4. Rezultati i rasprava

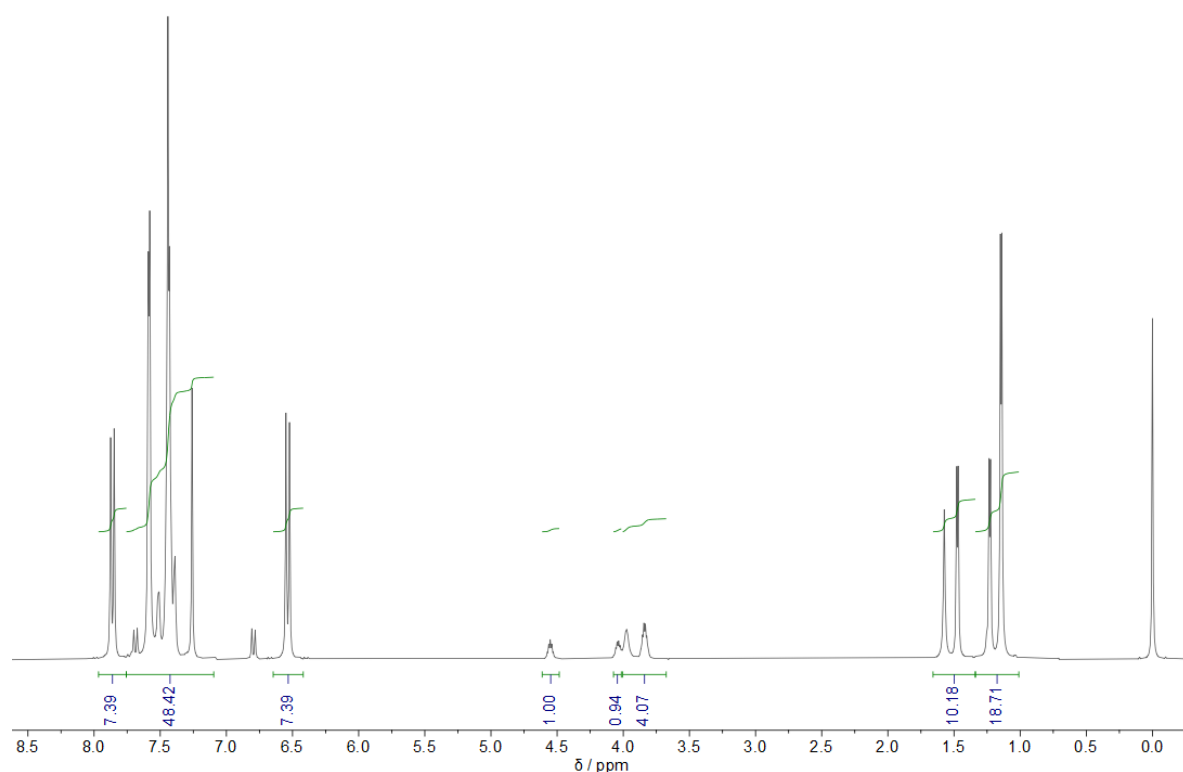
Nakon provedene sinteze konjugata APBA i CA pomoću DCC, čistoća dobivenog produkta je ispitana snimanjem masenog spektra. Utvrđeno je da se produkt sastoji od otprilike 85 % anhidrida cimetne kiseline i 15 % odgovarajućeg amida. Dobivanje anhidrida česta je popratna reakcija kod sinteze amidnih veza pomoću DCC.

Snimljen je i  $^1\text{H}$  NMR spektar produkta u  $\text{CDCl}_3$  (Slika 36). U spektru se uočavaju signali koji odgovaraju protonima aromatskih prstenova iz cimetne i borne kiseline u području između 7,4 i 8,7 ppm, te široki singleti pri 3,47 i 4,12 ppm koji odgovaraju protonima borne kiseline  $\text{B}(\text{OH})_2$ . Osim navedenih signala koji sugeriraju nastanak željenog konjugata, u spektru se javljaju i signali u području između 1 i 2 ppm koji odgovaraju protonima DCC-a. To ukazuje da talog izoliran iz reakcijske smjese nakon sinteze nije u potpunosti čist, već sadrži i nusprodukt dicikloheksil uree.



**Slika 36.**  $^1\text{H}$  NMR spektar taloga izoliranog nakon reakcije CA i APBA, u  $\text{CDCl}_3$ .

S obzirom da prethodnom sintezom nije uspješno izoliran čisti željeni produkt, sinteza je provedena u sličnim reakcijskim uvjetima uz korištenje HOBt. Funkcija ovog reagensa je da spriječi stvaranje anhidrida, odnosno on ga blokira. Uloga HOBt-a je suzbijanje nuspojave epimerizacije i povećanje prinosa reakcije reagiranjem s O-acilureom formirajući aktivirani OBt ester, koji zatim lako reagira s aminom da bi se dobio amidski proizvod. HOBt se može koristiti u sintezi u krutoj i tekućoj fazi te se u ovom slučaju kao aktivator karboksilne kiseline korišten DIC. Iako je na ovaj način izoliran talog, njegov TLC je i nakon višestrukog pročišćavanja metodama filtracije i prekrystalizacije iz različitih otapala uvijek pokazivao više od jedne mrlje, što znači da nije uspješno izoliran čisti konjugat, već smjesa konjugata, nusprodukta i/ili reaktanata.



**Slika 37.** NMR sirovog produkta reakcije pripreve konjugata uz HOBt u CDCl<sub>3</sub>.

Sinteza konjugata cimetine i borne kiseline pokušana je i prema radu Ramazanija i suautora<sup>31</sup> u kojem je opisana metoda dobivanja derivata *N*-aciluree iz karboksilnih

kiselina i *N,N*-dialkil karbodiimida u<sup>31</sup> vodi s kratkim reakcijskim vremenima i visokim prinosima. Pri tom je, prateći opisani sintetski protokol, izoliran talog koji bi trebao sadržavati željeni konjugat, međutim njegova je topljivost bila preslaba u nizu otapala: etil-acetatu, etanolu, DEE, acetonu i kloroformu. Stoga nije bilo moguće pripremiti uzorak za daljnje odjeljivanje na kromatografskom stupcu ili prekristalizaciju, odnosno za pročišćavanje sirovog produkta, te čisti konjugat nije bilo moguće izolirati.

Kako bi se tome doskočilo, sinteza je ponovljena u smjesi otapala dietil-eter : voda u omjeru 80 : 20 uz DCC kao aktivator. Slično kao i kod prethodne sinteze, i ovaj put iz reakcijske smjese nijednom od korištenih metoda separacije nije bilo moguće izolirati čisti konjugat, već je TLC uvijek pokazivao dvije mrlje, kao što je vidljivo na Slici 38.



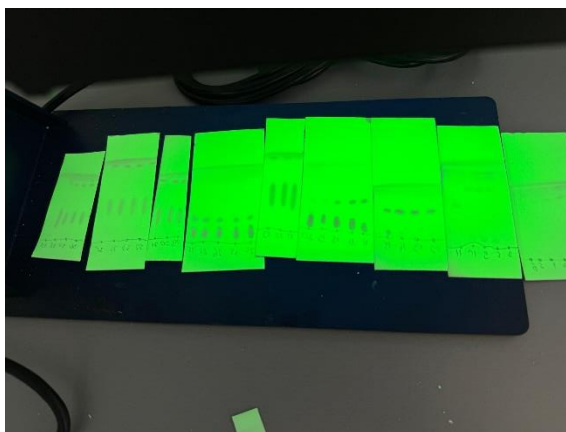
**Slika 38.** TLC pločice nakon ispitivanja.

Naposljetku, ponovljene su sinteze uz DCC isključivo u organskom otapalu, DCM, uz dodatak DMAP-a.<sup>32</sup> Za sintezu estera, potrebno je dodati *N*-(dimetilamino)piridin

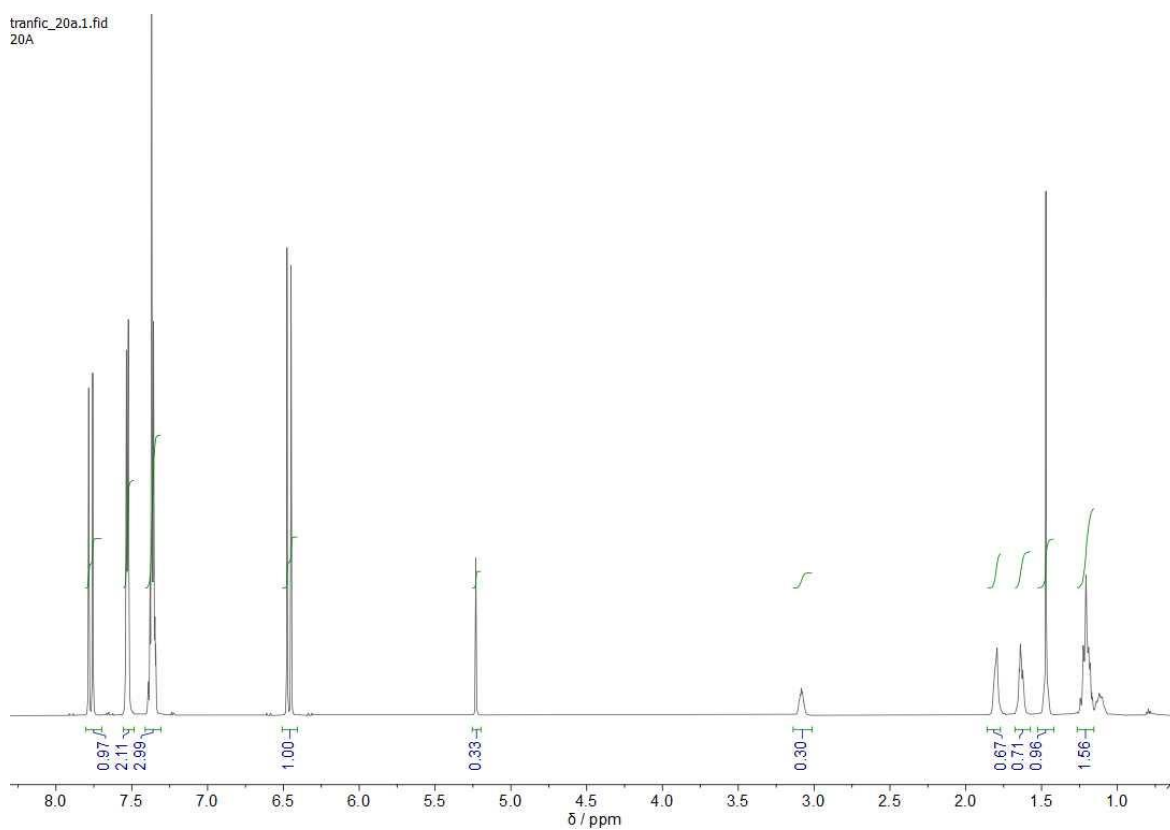
(DMAP) kako bi se smanjilo stvaranje neproduktivnog nusprodukta acilne migracije, koji se natječe s nukleofilnim napadom alkohola na međuprodukt O-acilizosureu. Nakon što je TLC-om potvrđeno dobivanje nove mrlje koja bi trebala odgovarati produktu (Slika 39), kao metoda njegova odjeljivanja iz reakcijske smjese korištene su kromatografija na stupcu i tankoslojna preparativna kromatografija. U oba su slučaja izolirane 3 frakcije čiji su NMR spektri prikazani na Slikama 41,42 i 43. Tijek kromatografije na stupcu i uspješnost odjeljivanja praćena je TLC-om kako je prikazano na Slici 40. Kromatogrami su pokazali da nijedna od sakupljenih frakcija nije bila u potpunosti čista i nije sadržavala samo jednu kemijsku komponentu. Nešto bolje odjeljivanje postignuto je korištenjem tankoslojne preparativne kromatografije. Prva frakcija većim dijelom sadrži cimetnu kiselinu što se vidi po karakterističnom dubletu pri 6,47 ppm, uz određenu količinu nečistoća/nusprodukata. Druga frakcija je smjesa neizreagirane CA i željenog konjugata, dok treća frakcija sadrži uglavnom samo CA uz vrlo male količine nečistoće.



**Slika 39.** TLC pločice nakon ispitivanja.

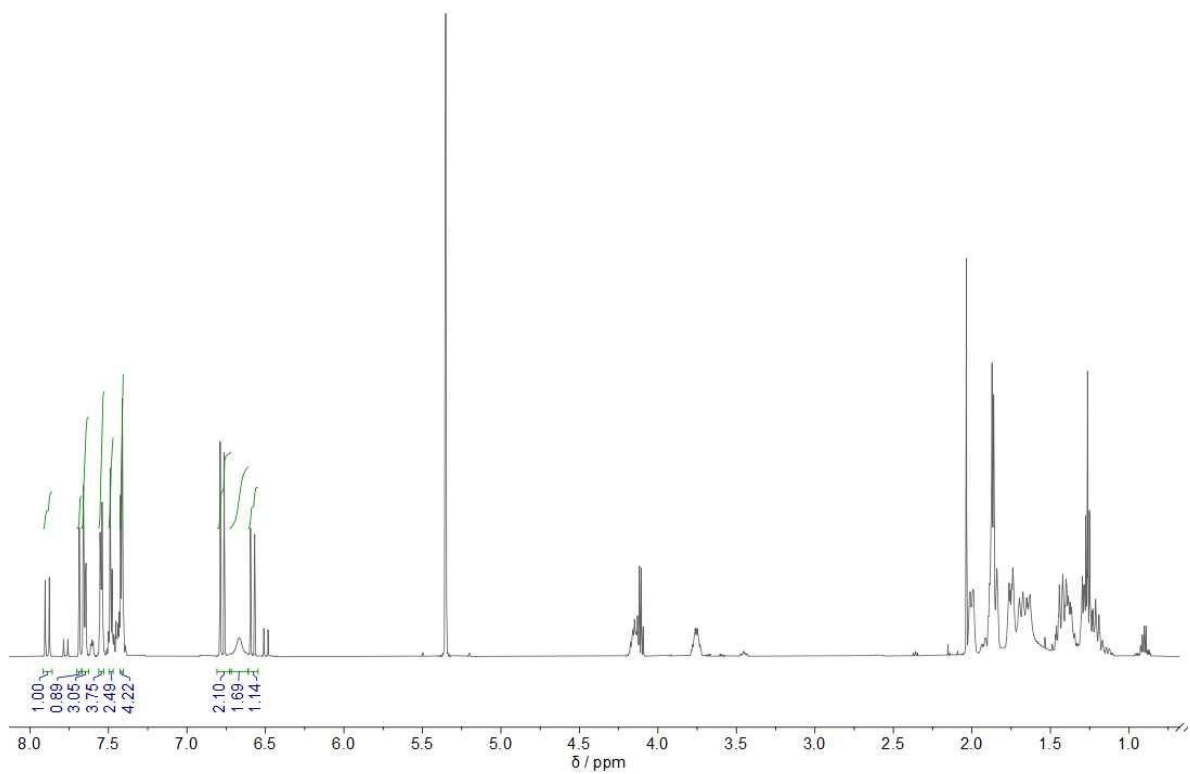


**Slika 40** TLC pločice nakon kromatografije na stupcu.



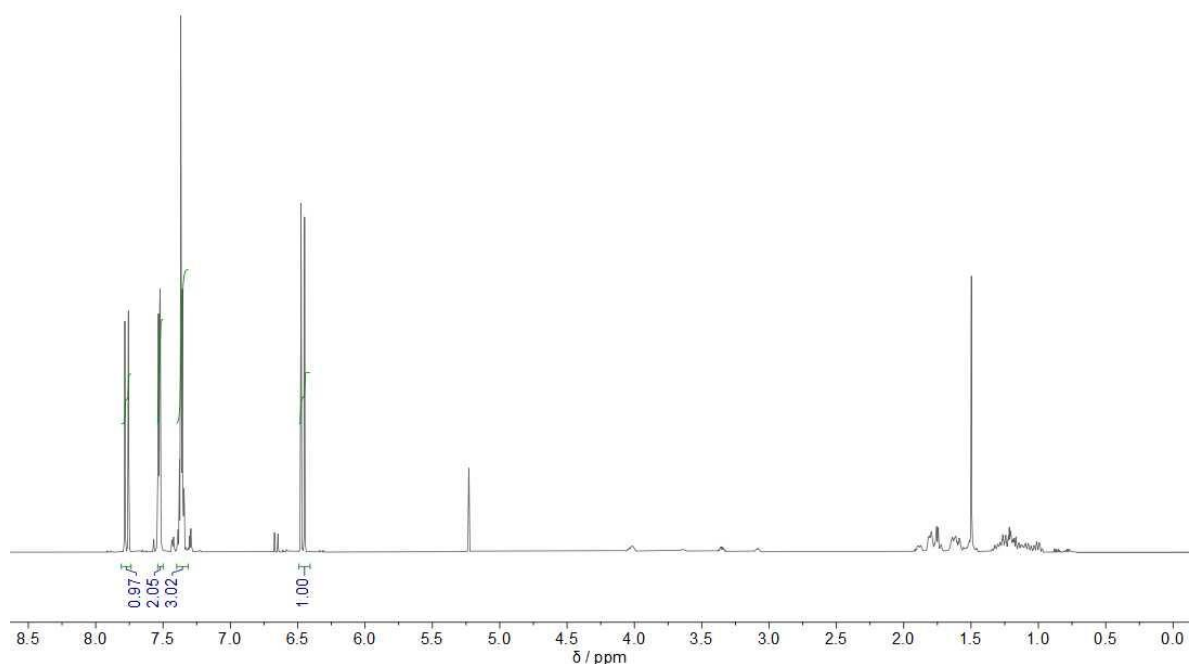
**Slika 41.** <sup>1</sup>H NMR spektar frakcije A nakon reakcije APBA i CA u CDCl<sub>3</sub>.

tranfic\_20a.2.fid  
20B



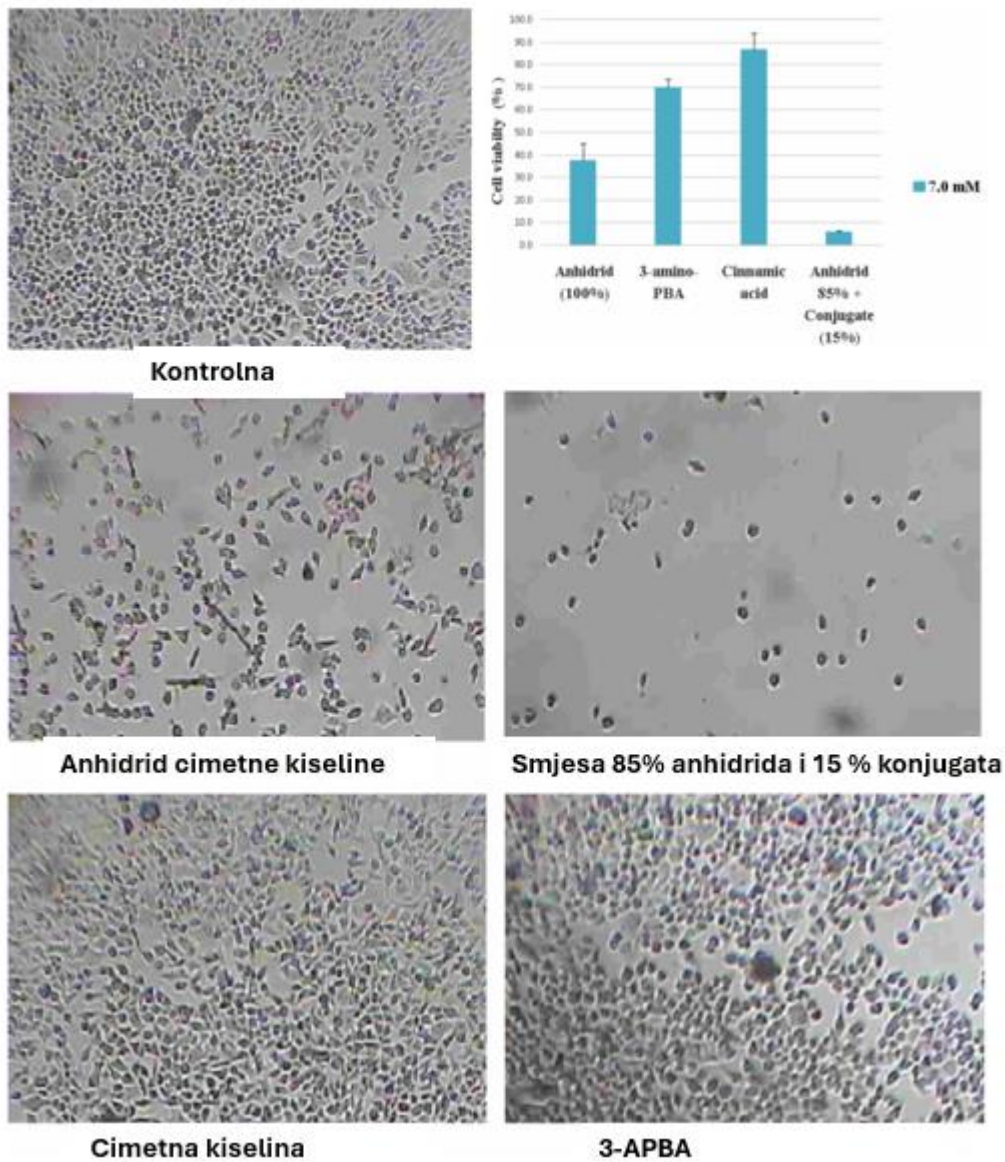
**Slika 42.** <sup>1</sup>H NMR spektar frakcije B nakon reakcije APBA i CA u CDCl<sub>3</sub>.





**Slika 43.**  $^1\text{H}$  NMR spektar frakcije C nakon reakcije APBA i CA u  $\text{CDCl}_3$ .

Budući da nije bilo moguće izolirati čisti konjugat borne i cimetine kiseline, smjesi dvaju produkata koja je dobivena prvom sintezom, anhidrida cimetine i borne kiseline, ispitana je biološka aktivnost. Na Slici 44 prikazani su rezultati analize citotoksičnog učinka 4 uzorka: anhidrida CA, smjese anhidrida i CA u omjeru 85:15, čiste CA te čiste APBA na HeLa stanice karcinoma. Jasno je vidljivo da sama CA i APBA ne pokazuju značajniju citotoksičnost, dok sam anhidrid cimetine snizuje preživljavanje stanica na ispod 40%. Ipak, daleko najveći citotoksični učinak na kancerogene stanice maternice pokazala je smjesa 85% anhidrida cimetine i 15% konjugata čijim je djelovanjem preživljavanje tumorskih stanica sniženo na tek ~ 15 %.



**Slika 44.** Citotoksični učinak različitih spojeva.

## 5. ZAKLJUČAK

Sinteza amidne veze pomoću *N,N*-dialkilkarbodiimida ima brojna pozitivna svojstva kao što su kratka reakcijska vremena, mogućnost provođenja reakcije u jednoj reakcijskoj posudi te upotreba jeftinih i dostupnih reagensa. Međutim također ima nekoliko nedostataka, pri čemu je najveći pojava nusprodukta dicikloheksil-uree. Upravo to je predstavljalo glavni problem u sintezi konjugata cimetne i 3-aminofenilboronske kiseline u sklopu ovog rada, gdje uobičajenim metodama pročišćavanja sirovog produkta nakon sinteze nije bilo moguće izolirati čisti željeni konjugat.

Unatoč tome, ispitivanje biološke aktivnosti konjugata u smjesi s anhidridom cimetne kiseline pokazalo je iznimnu citotoksičnost, a time i potencijal za daljnji razvoj antitumorskih lijekova baziranih na konjugatima PBA i biološki aktivnih organskih kiselina. Stoga, izolacija čistog konjugata predstavlja važan prvi korak i veliki izazov u daljnjim istraživanjima. Svi ovi rezultati daju optimizam da će ovaj tip konjugata značajno pridonijeti u borbi protiv jedne od najsmrtonosnijih bolesti današnjice, poput raka.

## 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

PBA – fenilborna kiselina

SA – sijalinska kiselina

FLI - fluorescencijsko oslikavanje

DCC – dicikloheksilkarbodiimid

DIC – diizopropilkarbodiimid

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

TLC - tankoslojna kromatografija

$R_f$  - faktor zaostajanja ili retencijski faktor

NMR - spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

$B_i$  – individualno magnetsko polje

$B_0$  – vanjsko magnetsko polje

$B_{ind}$  – lokalno magnetsko polje

TMS – tetrametilsilanom

CA – cimetna kiselina

DCM – diklormetan

MS – masena spektroskopija

HOBt – hidroksibenzotriazol

APBA – aminofenilborna kiselina

$CDCl_3$  – kloroform

DMAP - dimetoksiopropan

## 7. LITERATURA

1. Armarego, W. L. F, *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth-Heinemann, (2017)
2. Mirna González-González, Marco Rito-Palomares, Karla Mayolo-Deloisa, *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*, Elsevier. (2020) 105–116, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103019-6.00005-9>
3. Hostettmann K, Marston A, Hostettmann ,M. *Preparative Chromatography Techniques Applications in Natural Product Isolation (Second Ed.)*, Springer Berlin Heidelberg. **50** (1998) doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03631-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03631-0_4)
4. Karoline Gangestad Primdahl, Frederik André Hansen, Eirik Johansson Solum, Jens Mortansson, Marius Aursnes, *Introduction to Preparative Chromatography: Description of a Setup with Continuous Detection*, J. Chem. Educ. **99** (2022) 2372–2377, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00917>
5. Soumili Biswas, *Nuclear Magnetic Resonance*, (2021) doi:10.13140/RG.2.2.21290.54724/1
6. L.D. Hall, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Elsevier. **19** (1964) 51–93 doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60204-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60204-8)
7. Ozlem Cosku, *Separation Techniques: Chromatography*, North. Clin. Istanbul. **3** (2016 ) 156–160 doi: 10.14744/nci.2016.32757
8. C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier science publishing company. (1991)
9. Archana A. Bele, Anubha Khale, *AN OVERVIEW ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY*. Bele. Et. Al. **2** (2011) 256–267
10. Sheehan J.C, Hess G.P, *A New Method of Forming Peptide Bonds*. J. Am. Chem. Soc. **17** (1955) 1067–1068, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01609a099>
11. Yanyun Xu, Yushu Huang, Wei Lu, Shiyuan Liu, Yi Xiao, Jiahui Yu, *4-Carboxyphenylboronic Acid-Decorated, Redox-Sensitive Rod-Shaped Nano-Micelles Fabricated through Co-Assembling Strategy for Active Targeting and Synergistic Co-Delivery of Camptothecin and Gemcitabine*, Eur. J. Pharm. Biopharm. **7** (2019) 193–206, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.019>

12. Peng Mi, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka, Ligand-Installed Nanocarriers toward Precision Therapy, *Adv. Mater.* **32** (2020), doi: 10.1002/adma.201902604
13. Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, (2013) 275–298, doi: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
14. C. Schotten, *C. Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft, Mittheilungen* . **17** (1884) 2544, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.188401702178>
15. John C. Sheehan, D. W. Chapman, The Synthesis of Stereochemically Pure Peptide Derivatives by the Phthaloyl Method, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 3822–3825, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.188401702178>
16. George W. Anderson, Richard W. Young, The Use of Diester Chlorophosphites in Peptide Syntheses. Mixed Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 5307–5309, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01141a023>
17. J. Fried, E. F. Sabo, SYNTHESIS OF 17 $\alpha$ -HYDROXYCORTICOSTERONE AND ITS 9 $\alpha$ -HALO DERIVATIVES FROM 11-EPI-17 $\alpha$ -HYDROXYCORTICOSTERONE, *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 2273–2277, doi: 10.1021/JA01105A527
18. Robert M. Washburn, Ernest Levens, Charles F. Albright, Franklin A. Billig. A Publication of Reliable Methods for the Preparation of Organic Compounds, *Org. Synth.* **75** (1959) 2273
19. Sandra D. Mandolesi, Santiago E. Vaillard, Julio C. Podestá, Roberto A. Rossi, Synthesis of Benzene- and Pyridinediboronic Acids via Organotin Compounds, *Organometallics*. **21**, (2002) 4886–4888, doi: <https://doi.org/10.1021/om020163r>
20. M.J. Sharp, W. Cheng, V. Snieckus, Synthetic Connections to the Aromatic Directed Metalation Reaction. Functionalized Aryl Boronic Acids by Ipso Borodesilylation. General Syntheses of Unsymmetrical Biphenyls and m-Terphenyls, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 5093–5096, doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)95599-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)95599-0)
21. Donald S. Matteson, Boronic Esters in Stereodirected Synthesis, *Tetrahedron*. **45** (1989) 1859–1885, doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80052-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80052-1)
22. Dennis G. Hall, *Boronic Acids: Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*. (2005) 32–33
23. Shewei Guo, Yingwei Zhen, Zhiqiang Zhu, Guosheng Zhou, Xiangyu Zheng, Cinnamic Acid Rescues Behavioral Deficits in a Mouse Model of Traumatic

- Brain Injury by Targeting MiR-455-3p/HDAC2, *Life Sci.* **235** (2019), 1–9, doi: 10.1016/j.lfs.2019.116819.
24. Rui Wang, Wei Yang, Yiqing Fan, Wim Dehaen, Yang Li, Huijing Li, Wei Wang, Qingxuan Zheng, Qiyong Huai, Design and Synthesis of the Novel Oleanolic Acid-Cinnamic Acid Ester Derivatives and Glycyrrhetic Acid-Cinnamic Acid Ester Derivatives with Cytotoxic Properties, *Bioorg. Chem.* **88** (2019) 1–15, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102951>
  25. Ola M Abd El-Raouf, El-Sayed M El-Sayed, Mohamed F Manie, Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde Ameliorate Cisplatin-Induced Splenotoxicity in Rats, *Biochem. Mol. Toxicol.* **29** (2015) 1–6 doi: 10.1002/jbt.21715
  26. Michelle Peixoto Rodrigues, Deborah Campos Tomaz, Luciana Ângelo de Souza, Thiago Souza Onofre, Wemerson Aquiles de Menezes, Juliana Almeida-Silva, Ana Márcia Suarez-Fontes, Márcia Rogéria de Almeida, Adalberto Manoel da Silva, Gustavo Costa Bressan, Marcos André Vannier-Santos, Juliana Lopes Rangel Fietto, Róbson Ricardo Teixeira, Synthesis of Cinnamic Acid Derivatives and Leishmanicidal Activity against *Leishmania Braziliensis*, *Eur. J. Med. Chem.* **183** (2019) 1–14, DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111688
  27. S Yilmaz; M Sova, S Ergün, Antimicrobial Activity of Trans-Cinnamic Acid and Commonly Used Antibiotics against Important Fish Pathogens and Nonpathogenic Isolates, *J. Appl. Microbiol.* **125** (2018) 1714–1727, doi: 10.1111/jam.14097
  28. Sujyoti Chandra, Avik Roy, Malabendu Jana, Kalipada Pahan, Cinnamic Acid Activates PPAR $\alpha$  to Stimulate Lysosomal Biogenesis and Lower Amyloid Plaque Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model, *Neurobiol. Dis.* **124** (2019) 379–395 doi: 10.1016/j.nbd.2018.12.007
  29. Oliver C. Ho, Raman Soundararajan, Jianhui Lu, Donald S. Matteson, Zhenming Wang, Xin Chen, Mingyi Wei, Roger D. Willett, ((Trityloxy)Methyl)Boronic Esters, *Organometallics.* **14** (1995) 2855–2860, doi: <https://doi.org/10.1021/om00006a034>
  30. Steven J. Rettig, James Trotter, Crystal and Molecular Structure of Phenylboronic Acid, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>B(OH)<sub>2</sub>, *Can. J. Chem.* **55** (1977) 3071–3075, doi: <https://doi.org/10.1021/om00006a034>
  31. Fattahi N., Ayubi M., & Ramazani, A., Amidation and esterification of carboxylic acids with amines and phenols by N,N'-diisopropylcarbodiimide: A new approach for amide and ester bond formation in water, *Tetrahedron.* **74**, (2018) 4351–4356, <https://doi.org/10.1016/J.TET.2018.06.064>

32. Lutjen, A. B., Quirk, M. A., Barbera, A. M., & Kolonko, E. M, Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **26** (2018) 5291–5298, doi:<https://doi.org/10.1016/J.BMC.2018.04.007>