Sinteza i analiza organskih spojeva sa sumporom i/ili dušikom: piridopiridazini i glukozinolati

Tomaš, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:802178

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

SINTEZA I ANALIZA ORGANSKIH SPOJEVA SA SUMPOROM I/ILI DUŠIKOM: PIRIDOPIRIDAZINI I GLUKOZINOLATI

DIPLOMSKI RAD

JOSIP TOMAŠ

Matični broj: 79

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

SINTEZA I ANALIZA ORGANSKIH SPOJEVA SA SUMPOROM I/ILI DUŠIKOM: PIRIDOPIRIDAZINI I GLUKOZINOLATI

DIPLOMSKI RAD

JOSIP TOMAŠ

Matični broj: 79

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

SYNTHESIS AND ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS WITH SULFUR AND/OR NITROGEN: PYRIDOPYRIDAZINES AND GLUCOSINOLATES

DIPLOMA THESIS

JOSIP TOMAŠ

Parent number: 79

Split, October 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag.chem.

SINTEZA I ANALIZA ORGANSKIH SPOJEVA SA SUMPOROM I/ILI DUŠIKOM: PIRIDOPIRIDAZINI I GLUKOZINOLATI

Josip Tomaš, 79

Sažetak: Organske molekule s dušikom i/ili sumporom, zbog svoje vrlo široke primjene u medicini, sve su veći predmet istraživanja. Prvi dio diplomskog rada bavi se sintezom piridopiridazina, spojeva s dušikom, koji posjeduju široku biološku aktivnost (antibakterijsko, antihipertenzivno, antikonvulzantno djelovanje, itd.). Drugi dio diplomskog rada bavi se glukozinolatima (*β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) spojevima sa sumporom i dušikom, koji su pronađeni u porodicama reda Capparales. Ovi spojevi karakteristični su za biljke u porodici Brassicaceae. Hidrolizom glukozinolata enzimom mirozinazom nastaje čitav niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata od kojih su najpoznatiji izotiocijanati, poznati po sovjim antikancerogenim i antimikrobnim svojstvima.

U ovom radu uspješno su sintetizirana 4 piridopiridazina, jedan osnovni (5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dion, uz iskorištenje od 50,4%) i 3 njegova derivata. Sintetizirani međuprodukti praćeni su tankoslojnom kromatografijom, a struktura konačnih produkata potvrđena je infracrvenom spektroskopijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom.

Također, istražen je kvalitativni sastav glukozinolata u dvije biljne vrste, širolistnoj grbici (*Lepidium latifolium L.*) i sivkastoj ljubičini (*Matthiola incana* (L.) R.Br.). Analziom sa HPLC-DAD-MS/MS tehnikom utvrđeno je da *L. latifolium* sadrži sinigrin kao glavni glukozinolat, dok je u *M. incana* pronađen glukorafenin. U okviru daljnjeg istraživanja ispitana je stabilnost glukozinolata pri gastrointestinalnim uvjetima, te pH (2,5 i 7,5). Glukozinolati su pokazali stabilnost u kiseloj i želučanoj fazi, a nestabilnost u lužnatoj i crijevnoj fazi, uz "poneka" odstupanja. Kvantitativni sastav glukozinolata određen je HPLC analizom desulfatiziranih glukozinolata.

Ključne riječi: pirido[3,4-*d*]piridazini, glukozinolati, desulfoglukozinolati, sinteza, probava, *Lepidium latifolium* L., *Matthiola incana* (L.) R.Br, IR, NMR, HPLC, HPLC-DAD-MS/MS
Rad sadrži: 96 stranica, 97 slika, 7 tablica, 1 prilog, 8 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek - član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - mentor

Datum obrane: 31. listopada 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 3

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

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

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: Ivica Blažević, PhD, Associate professor
Technical assistance: Azra Đulović, MChem

SYNTHESIS AND ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS WITH SULFUR AND/OR NITROGEN: PYRIDOPYRIDAZINES AND GLUCOSINOLATES

Josip Tomaš, 79

Abstract: There is an increase interest in organic molecules containing nitrogen and/or sulfur in their structure, due to their very broad application in medicine. The first part of the thesis deals with the synthesis of pyridopyridazines, nitrogen compounds, which possess a wide range of biological activities (antibacterial, antihypertensive, anticonvulsant, etc.). The second part of the thesis deals with glucosinols (β-thioglucoside-N-hydroxysulphates) with sulfur and nitrogen compounds found in Capparales family. These compounds are characteristic for plants in the family Brassicaceae. Glucosinolates hydrolyzed by the enzyme myrosinase produce a wide variety of biologically active degradation products, most notably isothiocyanate, known for their anticancerogenic and antimicrobial activity.

In this paper four pyridopyridazines, one "basic" (5-methyl-7-phenyl-2,3-dihydropyrido [3,4-d] pyridazine-1,4-dione, with a yield of 50.4%) and 3 of its derivative were successfully synthetized. The synthesized intermediates were monitored by thin layer chromatography, and the final product structure was confirmed by IR and NMR.

Also, the qualitative composition of glucosinolates was investigated in two plant species, *Lepidium latifolium* L. and *Matthiola incana* (L.) R.Br. By the HPLC-DAD-MS/MS technique, it was found that *L. latifolium* contains as the major glucosinolate sinigrin, while *M. incana* contains glucoraphenine. Within the scope of further research the stability of glucosinolates in gastrointestinal conditions and pH (2.5 and 7.5) was studied. Glucosinolates showed stability in the acid and gastric phase, and instability in the alkaline and intestinal phases, with some deviations. The quantitative composition of glucosinolates was determined by HPLC analysis of desulfated glucosinolates.

Keywords: Pyrido[3,4-*d*]pyridazines, glucosinolates, desulfoglucosinolates, synthesis, digestion, *Lepidium latifolium* L., *Matthiola incana* (L.) R.Br., IR, NMR, HPLC, HPLC-DAD-MS/MS
Thesis contains: 96 pages, 97 figures, 7 tables, 1 supplement, 8 references
Original in: Croatian.

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, Assistant Professor – chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant Professor - member
3. Ivica Blažević, PhD, Associate Professor - supervisor

Defence date: October 31st, 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za Tehnologiju lijekova Farmaceutskog fakulteta na Medicinskom Sveučilištu u Wrocławu u Poljskoj pod vodstvom dr. sc. Anne Wójcicke i na Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim vodstvom Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od veljače 2018. do listopada 2018. godine.

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

Zahvaljujem se dr. sc. Anni Wójcickoj koja mi je omogućila izvođenje eksperimentalnog dijela ovog rada na Odjelu za Tehnologiju lijekova Farmaceutskog fakulteta na Medicinskom Sveučilištu u Wrocławu.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću koji je svojim nesebičnim zalaganjem, razumijevanjem i neprocjenjivim savjetima uvelike utjecao na moj odabir i usmjerio me ka organskoj kemiji.

Hvala Vam na privilegiji izrade diplomskog rada pod Vašim mentorstvom. Boljeg mentora nisam mogao poželjeti!

Zahvaljujem se i asistentici Azri Đulović mag. chem. na uloženom trudu i neizmjernoj pomoći pri izradi ovog rada. Hvala za svo slobodno vrijeme i prijateljski pristup!

Posebno HVALA mojoj mami koja me podržavala i uvijek bila uz mene!

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Zadatak ovog diplomskog rada je sintetizirati 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dion i njegova 3 derivata koji su potencijalno biološki aktivni.
2. Sve sintetizirane spojeve potvrditi infracrvenom spektroskopijom, ^{1}H i ^{13}C nuklearnom magnetskom rezonancijom
3. Izolirati glukozinolate iz vrste *Lepidium latifolium* L. i *Matthiola incana* (L.) R. Br. metodom ekstrakcije uz desulfataciju.
4. Ispitati gastrointestinalnu stabilnost glukozinolata ekstrahiranih iz lišća *L. latifolium* i *M. incana* (L.) R. Br.
5. Izvršiti identifikaciju izoliranih desulfoglukozinolata korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-UV i HPLC-MS/MS).
6. Odrediti kvantitativni sastav glukozinolata *L. latifolium* i *M. incana* (L.) R. Br. prije i nakon ispitivanja gastrointestinalne stabilnosti.

SAŽETAK:

Organske molekule s dušikom i/ili sumporom, zbog svoje vrlo široke primjene u medicini, sve su veći predmet istraživanja. Prvi dio diplomskog rada bavi se sintezom piridopiridazina, spojeva s dušikom, koji posjeduju široku biološku aktivnost (antibakterijsko, antihipertenzivno, antikonvulzantno djelovanje, itd.). Drugi dio diplomskog rada bavi se glukozinolatima (*β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) spojevima sa sumporom i dušikom, koji su pronađeni u porodicama reda Capparales. Ovi spojevi karakteristični su za biljke u porodici Brassicaceae. Hidrolizom glukozinolata enzimom mirozinazom nastaje čitav niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata od kojih su najpoznatiji izotiocijanati, poznati po sovjim antikancerogenim i antimikrobnim svojstvima.

U ovom radu uspješno su sintetizirana 4 piridopiridazina, jedan osnovni (5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dion, uz iskorištenje od 50,4%) i 3 njegova derivata. Sintetizirani međuprodukti praćeni su tankoslojnom kromatografijom, a struktura konačnih produkata potvrđena je infracrvenom spektroskopijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom.

Također, istražen je kvalitativni sastav glukozinolata u dvije biljne vrste, širolistnoj grbici (*Lepidium latifolium L.*) i sivkastoj ljubičini (*Matthiola incana* (L.) R.Br.). Analziom sa HPLC-DAD-MS/MS tehnikom utvrđeno je da *L. latifolium* sadrži sinigrin kao glavni glukozinolat, dok je u *M. incana* pronađen glukorafenin. U okviru daljnjeg istraživanja ispitana je stabilnost glukozinolata pri gastrointestinalnim uvjetima, te pH (2,5 i 7,5). Glukozinolati su pokazali stabilnost u kiseloj i želučanoj fazi, a nestabilnost u lužnatoj i crijevnoj fazi, uz određena odstupanja. Kvantitativni sastav glukozinolata određen je HPLC analizom desulfatiziranih glukozinolata.

Ključne riječi: pirido[3,4-*d*]piridazini, glukozinolati, desulfoglukozinolati, sinteza, probava, *Lepidium latifolium* L., *Matthiola incana* (L.) R.Br, IR, NMR, HPLC, HPLC-DAD-MS/MS

SUMMARY:

There is an increase interest in organic molecules containing nitrogen and/or sulfur in their structure, due to their very broad application in medicine. The first part of the thesis deals with the synthesis of pyridopyridazines, nitrogen compounds, which possess a wide range of biological activities (antibacterial, antihypertensive, anticonvulsant, etc.). The second part of the thesis deals with glucosinols (β-thioglucoside-N-hydroxysulphates) with sulfur and nitrogen compounds found in Capparales family. These compounds are characteristic for plants in the family Brassicaceae. Glucosinolates hydrolyzed by the enzyme myrosinase produce a wide variety of biologically active degradation products, most notably isothiocyanate, known for their anticancerogenic and antimicrobial activity.

In this paper four pyridopyridazines, one "basic" (5-methyl-7-phenyl-2,3-dihydropyrido [3,4-d] pyridazine-1,4-dione, with a yield of 50.4%) and 3 of its derivative were successfully synthetized. The synthesized intermediates were monitored by thin layer chromatography, and the final product structure was confirmed by IR and NMR.

Also, the qualitative composition of glucosinolates was investigated in two plant species, *Lepidium latifolium* L. and *Matthiola incana* (L.) R.Br. By the HPLC-DAD-MS/MS technique, it was found that *L. latifolium* contains as the major glucosinolate sinigrin, while *M. incana* contains glucoraphenine. Within the scope of further research the stability of glucosinolates in gastrointestinal conditions and pH (2.5 and 7.5) was studied. Glucosinolates showed stability in the acid and gastric phase, and instability in the alkaline and intestinal phases, with some deviations. The quantitative composition of glucosinolates was determined by HPLC analysis of desulfated glucosinolates.

Key words: Pyrido[3,4-*d*]pyridazines, glucosinolates, desulfoglucosinolates, synthesis, digestion, *Lepidium latifolium* L., *Matthiola incana* (L.) R.Br, IR, NMR, HPLC, HPLC-DAD-MS/MS

Sadržaj

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1 PIRIDOPIRIDAZINI 2

1.2 SINTEZA PIRIDO[3,4-*d*]PIRIDAZINA I NJIHOVIH DERIVATA 4

1.2.1 REAKCIJE ZATVARANJA PRSTENA 5

1.2.2 REAKCIJE TRANSFORMACIJE PRSTENA 11

1.3 BRASSICACEAE 14

1.3.1 ŠIROLISTNA GRBICA (Lepidium latifolium L.) 14

1.3.2 SIVKASTA LJUBIČINA (*Matthiola incana* (L.) R. Br.) 15

1.4 HLAPLJIVI SUMPOROVI SPOJEVI 16

1.4.1 GLUKOZINOLATI 16

1.5 ODREĐIVANJE STRUKTURE SPEKTROSKOPSKIM TEHNIKAMA 17

1.5.1 ULTRALJUBIČASTA-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS) 17

1.5.2 INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (IR) 17

1.5.3 NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA (NMR) 18

1.6 METODE IDENTIFIKACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA 19

1.6.1 KROMATOGRAFIJA 19

1.6.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA 19

1.6.3 SPEKTROMETRIJA MASA 20

1.6.4 VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA 22

1.6.5 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA 23

1.6.6 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) 24

1.6.7 VEZANI SUSTAV TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA 25

2. EKSPERIMENTALNI DIO 27

2.1 KORIŠTENE METODE 27

2.2 KORIŠTENE KEMIKALIJE 31

2.3 Sinteza 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido-[3,4-d]-piridazin-1,4-diona i njegovih derivata 32

2.3.1 Supstitucija vodika - 1-brompropan 53
2.3.2 Supstitucija vodika - 1-bromheptan 56
2.3.3 Supstitucija vodika - Izopropil-bromid 57
2.3.4 Supstitucija vodika – 1-brompropan - polazni spoj – standard 57
2.4 EKSTRAKCIJA GLUKOZINOLATA 59
2.4.1 BILJNI MATERIJAL 59
3. REZULTATI I RASPRAVA 65
3.1 Sinteza 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona 65
3.1.1 Sinteza derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona 69
3.2 Glukozinolati: analiza i probava 73
3.2.1 HPLC-MS/MS-PDA analiza glukozinolata *Lepidium latifolium* 73
3.2.2 HPLC-MS/MS-PDA analiza glukozinolata *Matthiola incana* 76
4. ZAKLJUČAK 83
5. LITERATURA 84
6. PRILOZI 85

UVOD

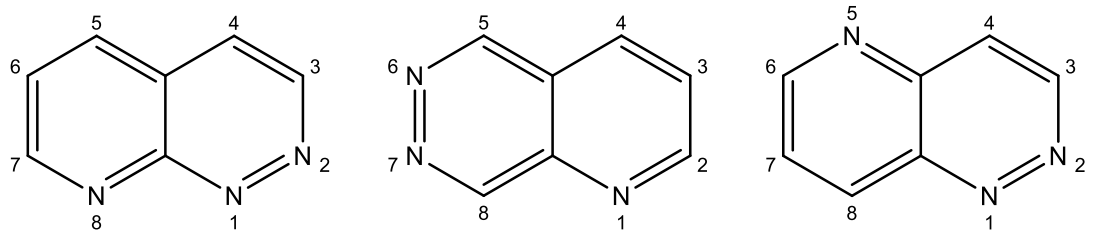
U posljednje vrijeme sve je veći interes za spojeve sa sumporom i/ili dušikom radi njihovih potencijalnih antibakterijskih, antitumorskih, mikrobioloških, nutritivnih i drugih svojstava. Specifično, pirido[3,4-*d*]piridazini proučavaju se radi svojih antibakterijskih, antihipertenzivih, antikonvulzantnih, antitumorskih, vazodilatatorskih i dr. svojstava, a glukozinolati, odnosno njihovi razgradni produkti, s kojima se svakodnevno susrećemo u raznim kupusnjačama, posjeduju antibakterijska, antimikrobna, a potencijalno i antitumorska svojstva.

Pirido[3,4-*d*]piridazini su spojevi sintetskog podrijetla s piridopiridazinskom jezgrom kao važnom sastavnicom velikog broja biološki aktivnih spojeva. Glukozinolati, po kemijskoj strukturi *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati, su biološki neaktivni spojevi, ali se uslijed oštećenja biljnog tkiva oslobađa enzim mirozinaza, koji razgrađuje glukozinolate na biološki aktivne spojeve od kojih su najvažniji izotiocijanati, nitrili i dr.

1. OPĆI DIO

1.1 PIRIDOPIRIDAZINI

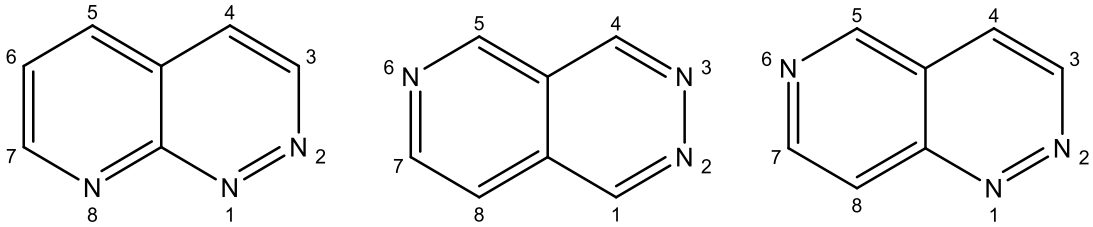
Piridopiridazini su skupina heterocikličkih spojeva koji sadrže atom dušika. Ovakav sustav je zajednička strukturna značajka mnogim biološki aktivnim spojevima. Sve moguće izomerne strukture piridopiridazina su poznate i prikazane na slici 1.1. Na strukturama je prikazano pravilno numeriranje prstena, a ispod slike su dana imena po IUPAC-u te njihova trivijalna imena, često korištena u literaturi.[1]



piridо[2,3-*c*]piridazin (1,2,8-triazanaftalen)

piridо[2,3-*d*]piridazin (1,6,7-triazanaftalen, 4,6,7-triazanaftalen, 1,6,7-piridopiridazin, 5-azaftalazin, ,6,7-benzotriazin)

piridо[3,2-*c*]piridazin (1,2,5-triazanaftalen)



piridо[3,4-*c*]piridazin (1,2,7-triazanaftalen)

piridо[3,4-*d*]piridazin (2,3,6-triazanaftalen, 2,6,7-triazanaftalen, 2,3,6-piridopiridazin, piridino[3':4'-4:5]piridazin)

piridо[4,3-*c*]piridazin (1,2,6-triazanaftalen)

Slika 1.1. Strukture i numeriranje prstena piridopiridazina.[1]

Do danas nisu poznati piridopiridazini prirodnog porijekla, ali većina ih pokazuje biološku aktivnost. Na primjer, neki pirido[2,3-*c*]piridazini pokazuju antibakterijska svojstva, a pirido[2,3-*d*]piridazini, pirido[3,4-*d*]piridazini i pirido[4,3-c]piridazini su inhibitori fosfodiesteraze, antihipertenzivi i antikonvulzanti. Pirido[2,3-d]piridazini i pirido[3,4-*d*]piridazini su i antidiuretici. Pirido[2,3-*d*]piridazini, pirido[2,3-d]piridazin-5-amini, pirido[2,3-*d*]piridazin-5(6H)-oni i pirido[2,3-*d*]piridazin-8(7H)-oni su inhibitori receptorske tirozin kinaze receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Pirido[2,3-d]piridazini, pirido[2,3-*d*]piridazin-8-amini i pirido[2,3-*d*]piridazin-4-oli se ponašaju kao antagonisti receptora faktora koji oslobađaju kortikotropin (CRF). Drugi antagonisti CRF receptora uključuju pirido[3,2-c]piridazine, pirido[3,2-*c*]piridazin-8-amine i pirido[3,2-*c*]piridazin-8-ole. Pirido[2,3-*d*]piridazini i 6,7-dihidropirido[2,3-*d*]piridazin-5,8-dioni, kao i pirido[3,4-*d*]piridazini i 2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dioni utječu na čimbenik tumorske nekroze (TNF) ili se ponašaju kao inhibitori izlučivanja. 2,3,4,6-Tetrahidropirido[2,3-*d*]piridazin-5(1*H*)-oni su antitumorski agensi, ali pirido[2,3-*d*]piridazin-5(6*H*)-oni i pirido[2,3-d]piridazin-8(7*H*)-oni pokazuju mutagena svojstva. 6,7-Dihidropirido[2,3-*d*]piridazin-5,8-dioni djeluju kao psihoaktivne droge. Pirido[2,3-*d*]piridazin-8(7*H*)-oni pokazuju vazodilatatorska svojstva. Ferocenilmetilenhidrazinopirido[2,3-*d*]piridazinoni i njihovi dioni, su pripremljeni kao potencijalni antitumorski agensi čija aktivnost je predviđena prethodnim modeliranjem. Ostala svojstva pirido[2,3-*d*]piridazin-5-ona uključuju herbicidna svojstva. 6,7-Dihidropirido[2,3-*d*]piridazin-5,8-dioni su kemiluminiscentni spojevi, a 6,7-dihidropirido[2,3-*d*]piridazin-5(6H)-oni su optički aktivni. 2,3-Dihidropirido[3,4-d]piridazin-1,4-dioni, 3,4,5,6-tetrahidropirido[3,4-*d*]piridazin-1-karboksilati su također kemiluminiscentni spojevi. Neki pirido[3,4-*d*]piridazini su depresori središnjeg živčanog sustava; npr. 2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4,5(6*H*)-trioni i 2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dioni. Antiviralnu aktivnost pokazuju 2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dioni. Neki pirido[3,4-*d*]piridazini, njihovi reducirani oblici, amini i karbonilni derivati poboljšavaju lokomotornu aktivnost dok se drugi ponašaju kao ligandi $GABA_A$ α5 receptora, ili pokazuju inhibiciju VEGF receptora. Pirido[3,4-*d*]piridazini djeluju na dijabetes tipa 2, djeluju kao serotonin-2 antagonisti i inhibiraju 11-*β*-hidroksisteriod dehidrogenazu. Hidrazon5,6,7,8-tetrahidropirido[4,3-*c*]piridazin-3(2*H*)-ona je kancerogen.[1]

1.2 SINTEZA PIRIDO[3,4-*d*]PIRIDAZINA I NJIHOVIH DERIVATA

Kemijske reakcije piridopiridazina su dobro poznate. U većini slučajeva, izravno vezani supstituenti mogu biti zamijenjeni, a oni koji sazdržavaju funkcijsku skupinu mogu biti modificirani bez narušavanja heterocikličkog sustava. Neke od reakcija specifične za piridopiridazine su: razdvajanje *N*-amino grupa, supstitucija istih fluorom, supstitucija klora alkoksi ili amino skupinom ili pretvorba u etere i hidrazine, zamjena sulfonilne skupine amino skupinom. Amino supstituenti mogu biti zamijenjeni hidroksi skupinom, a sulfanilna skupina oksidirana do sulfona. Nitro skupine mogu biti reducirane do primarnih amina, primarni amini mogu biti pretvoreni u hidrazine, a primarni i sekundarni amini *N*-acilirani. Hidroksi grupe mogu biti *O*-alkilirane ili supstituirane kloridima. Primarni amino supstituenti diazotirani ili kondenzirani s benzaldehidom kako bi formirali imine, mogu također biti i prevedeni u derivate aziridina. Esteri mogu biti hidrolizirani u odgovarajuće kiseline. Etil-eteri se mogu pretvoriti u primarne amine, koji podliježu hidrataciji do hidroksi skupina. Kiseline mogu biti esterificirane, a formirani esteri prevedeni u amide.[1]

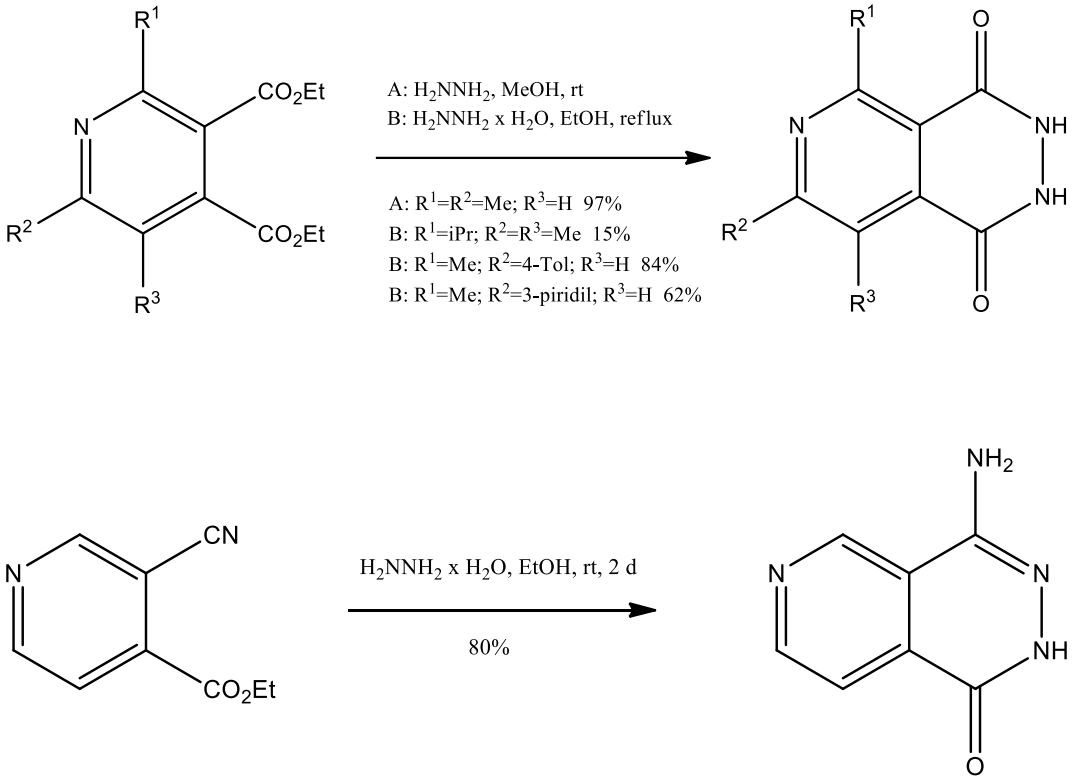
Pirido[3,4-*d*]piridazinoli se pretvaraju u kloro derivate, koji se mogu koristiti za sintezu etera, amino i sulfanil komponenti ili ponovo formirati hidrokside u reakcijama s odgovarajućim nukleofilima. Atom klora može biti zamijenjen atomom vodika. Amini se reduciraju do hidrazina, a oni do hidrazona. Amini mogu biti *N*-acilirani, a pirido[3,4-*d*]piridazinoli *O*-alkilirani ili *O*-acilirani. Kiseline se dekarboksiliraju, a metilenski derivati oksidiraju na metilenskoj grupi pri čemu nastaju ketoni. Esteri ovog tipa mogu biti hidrolizirani, a hidrazini degradirani do fenola, ili jednostavnije, zamijenjeni kisikom. Odgovarajući vodik je moguće zamijeniti deuterijem.[1]

1.2.1 REAKCIJE ZATVARANJA PRSTENA

1.2.1.1 FORMIRANJE DVIJE N-C VEZE

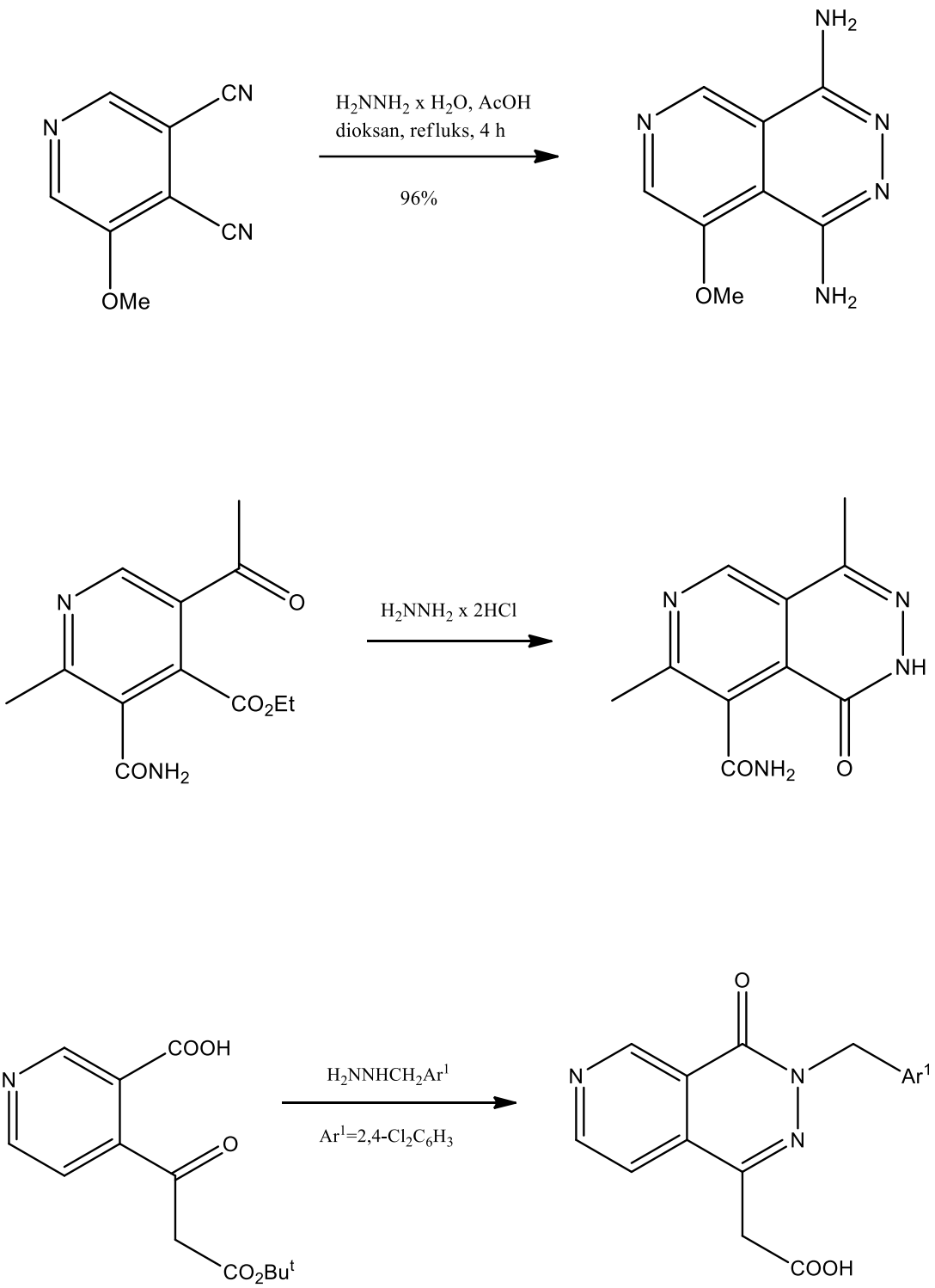
1.2.1.1.1 Cikloaminacija piridin-3,4-dikarboksilata hidrazinom

2,3-Dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dion se može dobiti kao hidrazinijeva sol u reakciji dietil piridin-3,4-dikarboksilata i hidrazin hidrata u etanolu na refluksu.[1]

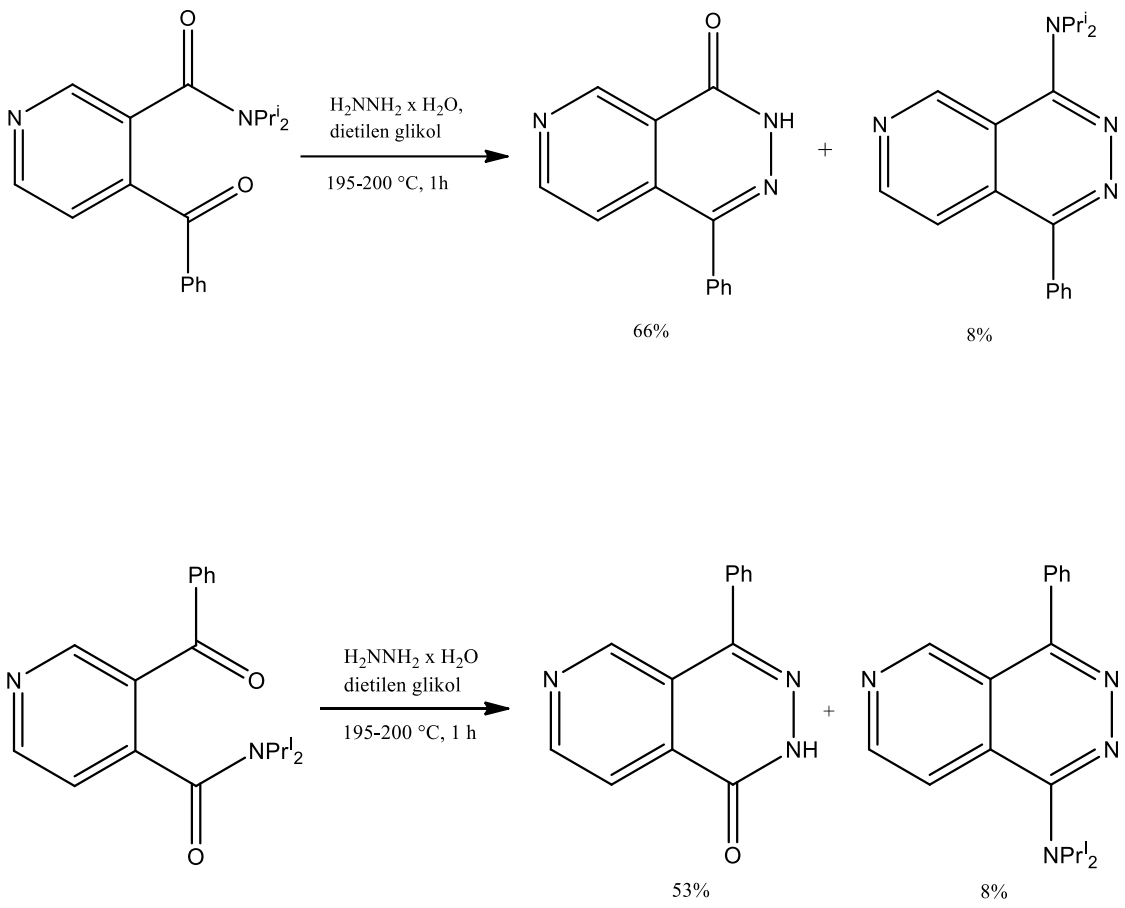


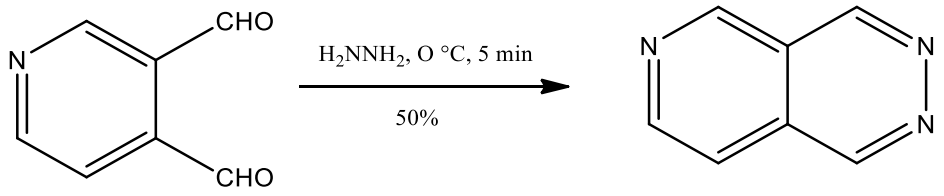
Slika 1.2. Kondenzacija dietil piridin-3,4-dikarboksilata i etil 3-cijanoizonikotinata hidrazinom.[1]

Čitav niz 3,4-disupstituiranih piridina kondenzira s hidrazinom i njegovim derivatima. (slika 1.3.)[1]



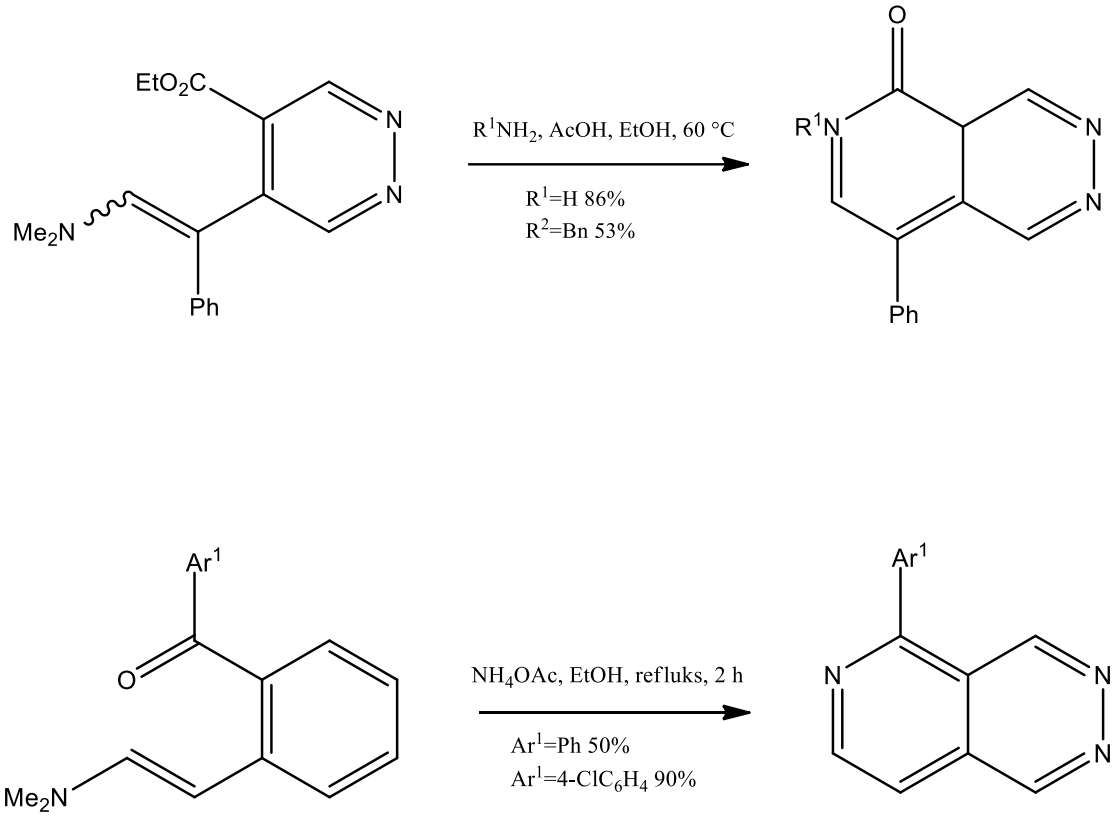
Slika 1.3. Ciklohidrazinacija 3.4-difunkcionalnih piridina.[1]





Slika 1.3. (nastavak).[1]

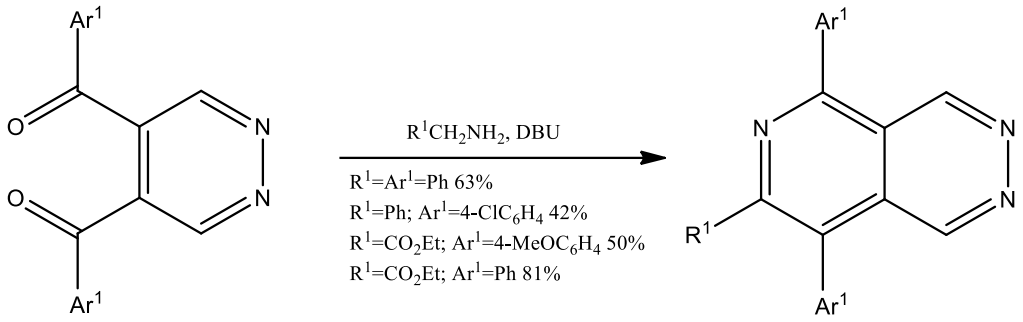
1.2.1.1.2 Cikloaminacija 4-karbofunkcionalnih 5-vinilpiridazina



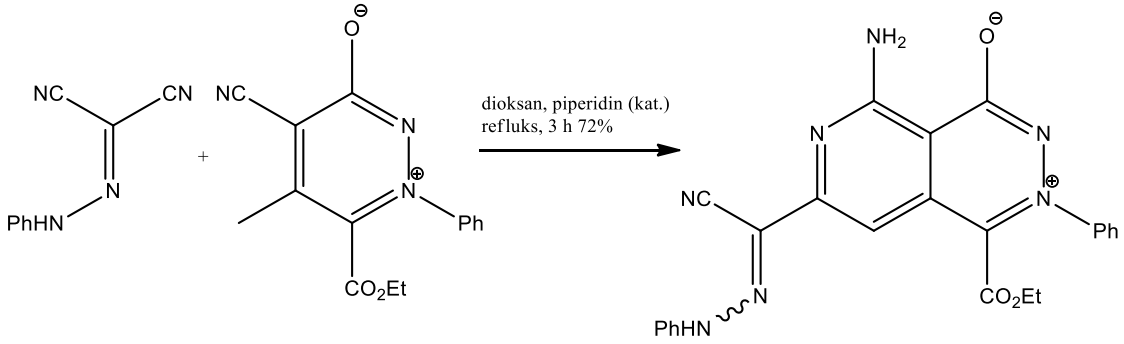
Slika 1.4. Cikloaminacija 4-acil-5-(2-aminovinil)piridazina.[1]

1.2.1.2 FORMIRANJE JEDNE N-C I JEDNE C-C VEZE

1.2.1.2.1 Kondenzacija 4,5-dikarbofunkcionalnih piridazina aminima

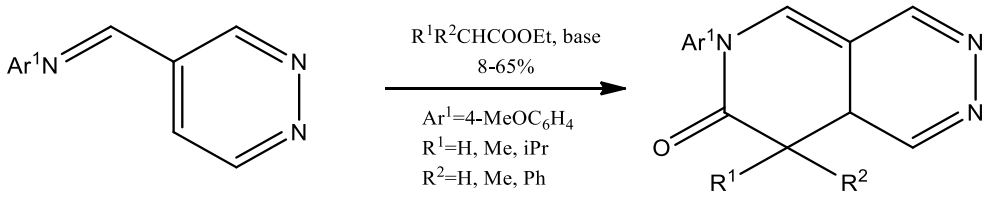


Slika 1.5. Kondenzacija 4,5-diaroil-piridazina aminoacetatima ili aminima.[1]



Slika 1.6. Sinteza piridopiridazin-2-ium-4-olata.[1]

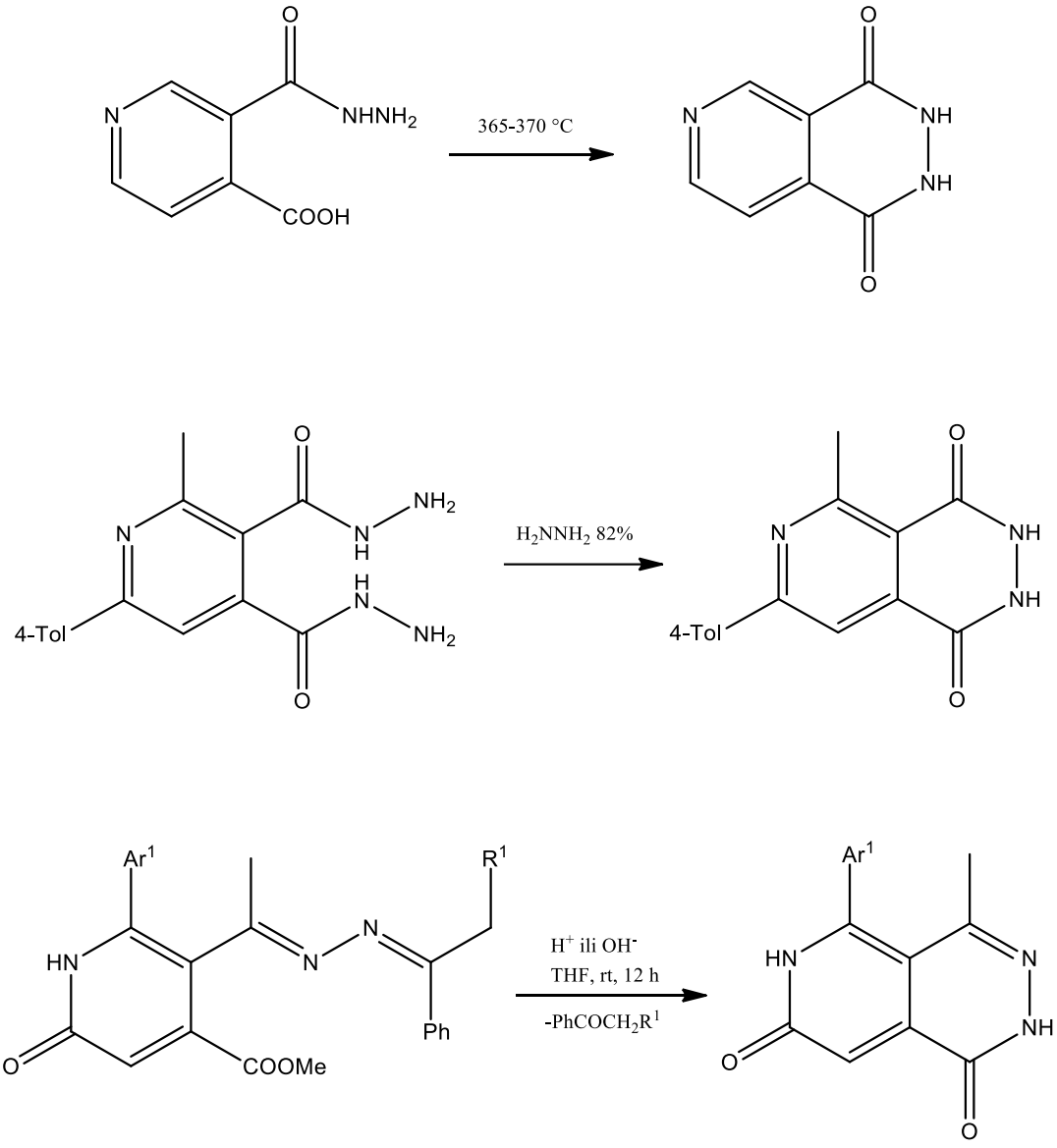
1.2.1.2.2 Kondenzacija 4-(iminometil)piridazina enolatima



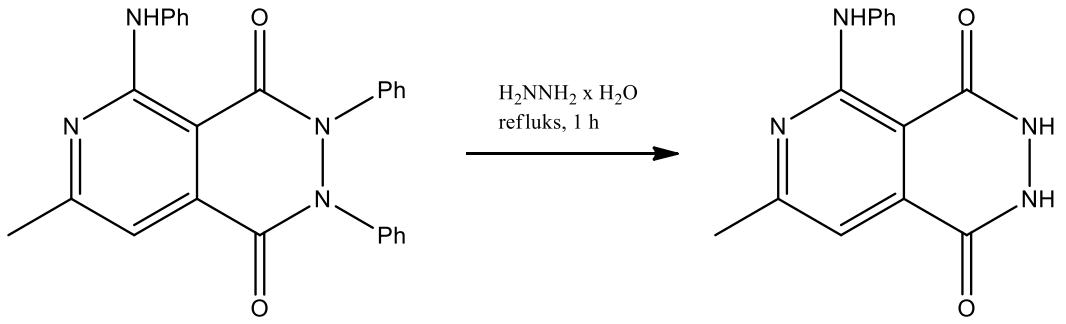
Slika 1.7. Kondenzacija 4-(iminometil)piridazina enolatima.[1]

1.2.1.3 FORMIRANJE JEDNE N-C VEZE

1.2.1.3.1 Intramolekulska ciklizacija piridinkarbohidrazida

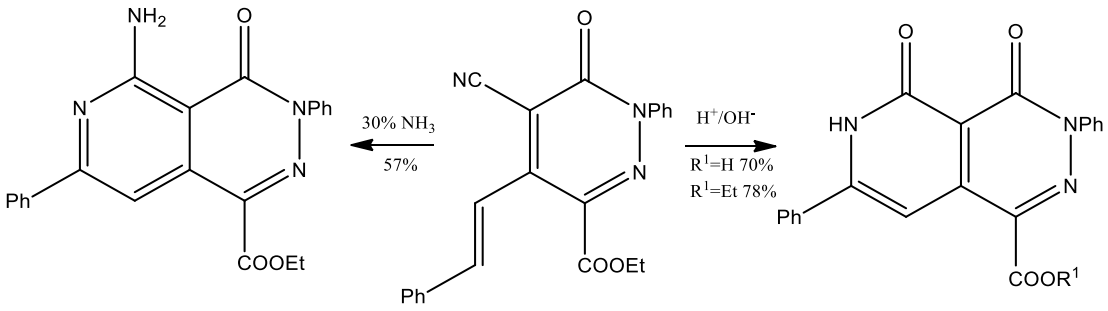


Slika 1.8. Intramolekulska ciklizacija piridinkarbohidrazida.[1]



Slika 1.9. Reakcija 7-metil-2,3-difenil-5-(fenilamino)-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona s hidrazinom.[1]

1.2.1.3.2 Intramolekulska ciklizacija 4-vinilpiridazin-5-karbonitrila

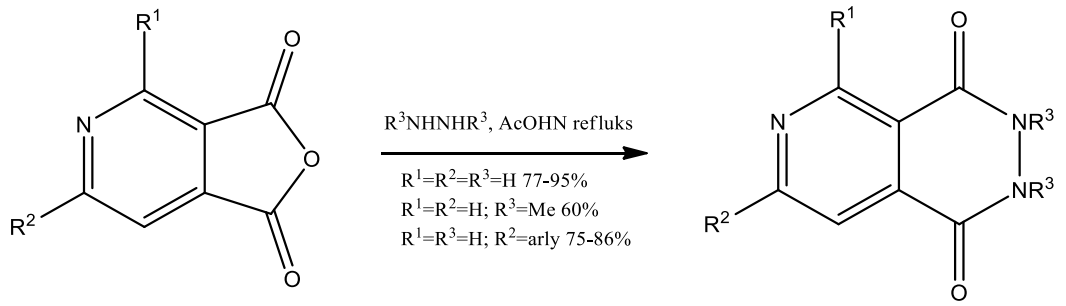


Slika 1.10. Intramolekulska ciklizacija 4-vinilpiridazin-5-karbonitrila.[1]

1.2.2 REAKCIJE TRANSFORMACIJE PRSTENA

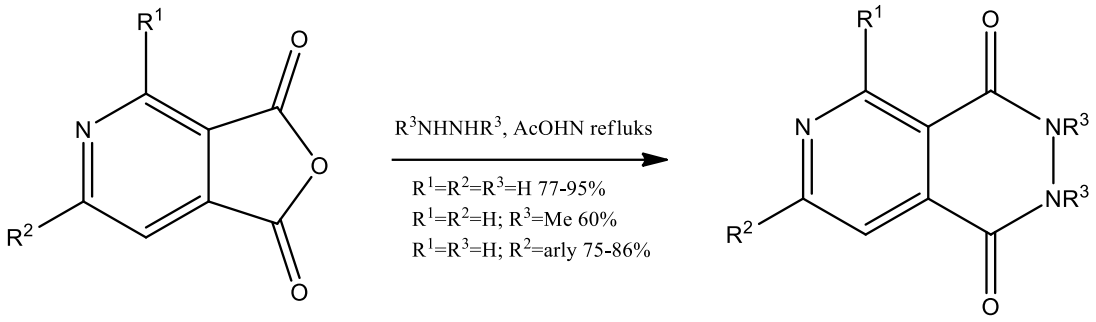
1.2.2.1 ŠIRENJE PRSTENA

1.2.2.1.1 Reakcija furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona s hidrazinom



Slika 1.11. Reakcija furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona s hidrazinom.[1]

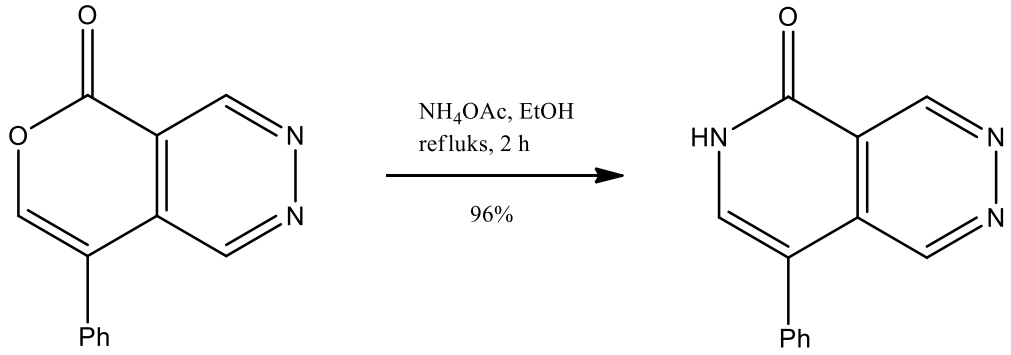
1.2.2.1.2 Reakcija 1*H*-pirido[3,4-*c*]piridin-1,3(2*H*)-diona s hidrazinom



Slika 1.12. Reakcija furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona s hidrazinom.[1]

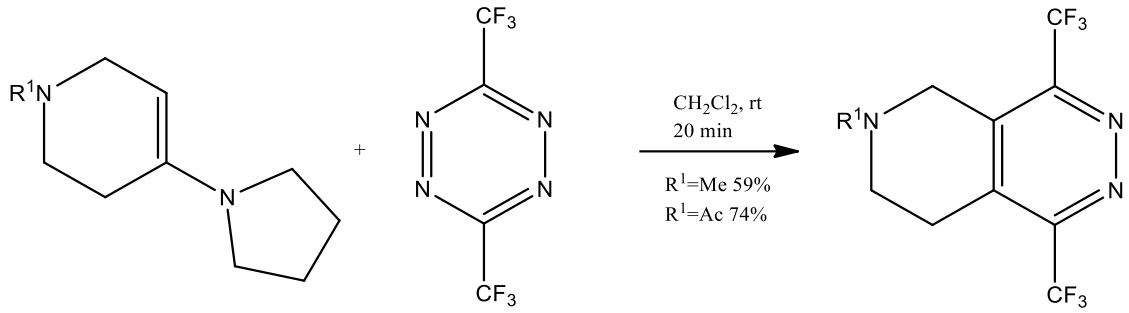
1.2.2.2 ZAMJENA SASTAVNOG DIJELA PRSTENA UZ ZADRŽAVANJE VELIČINE PRSTENA

1.2.2.2.1 Reakcija 8-fenil-5*H*-pirano[3,4-*d*]piridazin-5-ona s aminima



Slika 1.13. Reakcija 8-fenil-5*H*-pirano[3,4-*d*]piridazin-5-ona s aminima.[1]

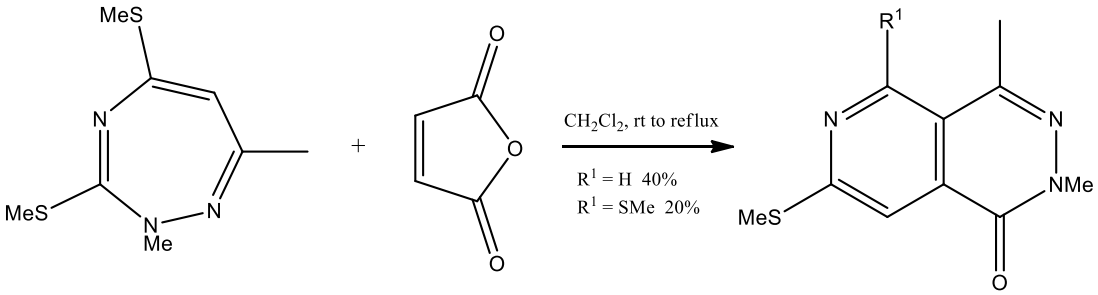
1.2.2.2.2 Intramolekulska [4 + 2] cikloadicija 1,2,4,5-tetrazina



Slika 1.14. Cikloadicija između 1,2,3,4-tetrazina i enamina.[1]

1.2.2.3 SMANJIVANJE PRSTENA

1.2.2.3.1 2*H*-1,2,4-triazepini



Slika 1.15. Reakcija između 2*H*-1,2,4-triazepina i maleinskog anhidrida.[1]

1.3 BRASSICACEAE

Kupusnjače (lat. *Brassicaceae*), poznate još i pod starijim nazivom krstašice (lat. *Cruciferae*), su porodica biljnih vrsta koje spadaju u razred dvosupnica (Eudicotiledona). Ova porodica obuhvaća više od 300 rodova sa preko 3000 vrsta koje su prirodno rasprostranjene na području umjerene klime, posebno na Sredozemlju, ali moguće ih je pronaći u gotovo svim dijelovima svijeta. Biljke ove porodice mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, a rijetko i polugrmovi i grmovi. Cijelu porodicu karakterizira ljutina koja potječe od glukozinolata, odnosno njihovih razgradnih produkata koji nastaju djelovanjem enzima mirozinaze. U porodicu se ubrajaju dobro poznate vrste poput brokule, kelja, rotkvice, gorušice, uljane repice, hrena i dr.[2,3,4]

U ovom radu su obrađene dvije biljne vrste iz porodice *Brassicaceae*, širolistna grbica (*Lepidium latifolium* L.) i sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.Br.)

1.3.1 ŠIROLISTNA GRBICA (*Lepidium latifolium* L.)

Širolistna grbica *(Lepidium latifolium* L.*)* je višegodišnja biljka čije je prirodno stanište južna Europa i zapadna Azija. Biljka je visoka između 30 cm i 1 m, a može narasti i do 2 m. Cvjeta u rano ljeto, a plodovi se razvijaju krajem ljeta i u ranu jesen. Nadzemni dio tvori rozetu nekoliko tjedana prije nego što stabljika počne rasti.[2,6]

Korijen je jako dug, debeo i minimalno razgranat i može činiti i do 40% ukupne mase biljke. Grane i listovi su voštani, sivo-zelene boje, uglavnom bez dlačica, iako ih mogu imati. Listovi rozete su dugi 30 cm i široki 8 cm s nazubljenim krajevima, dok su listovi stabljike kraći, bez peteljke i cijelih rubova i znatno rjeđe raspoređeni.[2,6]

Cvjetovi se sastoje od 4 mala ovalna lapa, 4 bijele klinaste latice i 6 tučaka gusto skupljenih u terminalne grozdove. Plod je jajasta ili eliptična komuška s jednom crveno-smeđom sjemenkom u svakom odjeljku.[2,6]

Širolistna grbica je invazivna vrsta koja se lako prilagođava različitim ekološkim uvjetima. Vrlo je kompetitivna i prilagodljiva, mijenja ekosustav u kojem raste, te ima sposobnost veće proizvodnje i iskorištavanja dušika od drugih biljnih vrsta.[2,6]

L. latifolium ima miris i okus po hrenu. Izdanak, listovi i plodovi biljke su jestivi, stoga se koristi kao hrana za ljude i životinje. Biljka je bogata nezasićenim masnim kiselinama (linolenska kiselina) i glukozinolatima (sinigrin). Alil-izotiocijanat, razgradni produkt sinigrina, ima blagotvorne učinke na zdravlje. Nutritivnoj vrijednosti doprinose i veći sadržaj glukoze i proteina, te veći omjer dušika i sumpora. Zahvaljujući visokom udjelu fenola i flavonoida biljka ima i značajnu antioksidacijsku aktivnost.[2,6]

1.3.2 SIVKASTA LJUBIČINA (*Matthiola incana* (L.) R. Br.)

Sivkasta ljubičina (Slika 1.16.) je jednogodišnja biljka iz porodice Brassicaceae. U Hrvatskoj raste u priobalnom području i na otocima. Stabljika je u osnovi drvenasta, prekrivena bijelim dlačicama, a listovi su duguljasti, nazubljenog ili cjelovitog ruba. Cvijetovi su bijeli, ružičasti ili ljubičasti, te su skupljeni u grozdaste cvatove na vrhovima stabljika. Cvate od ožujka do svibnja. Plod je mahuna duga 6-10 cm i široka oko 3 mm. Uspijeva u ekstremnim uvjetima, na staništima siromašnim dušikom i na staništima vrlo visokih temperatura. Cvijet, list i komuška su jestivi.[3,4]



Slika 1.16. *Matthiola incana* (L.) R.Br.[3]

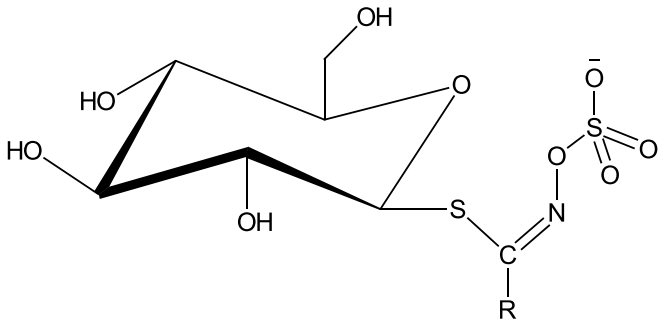
1.4 HLAPLJIVI SUMPOROVI SPOJEVI

Hlapljivi sumporovi spojevi su skupina metaboličkih produkata široke rasprostranjenosti. Nalaze se u morskim i kopnenim biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Najveća raznolikost ovih spojeva se nalazi u biljkama i to u 43 biljne porodice i 173 biljna roda (Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae itd.). Mogu se naći u različitim dijelovima biljaka: korijenu, stabljici, listu, cvijetu, sjemenkama, a sadržaj sumporovih spojeva varira ovisno o biljnoj vrsti, o području, klimi i načinu uzgoja same biljke, ali ovisno i o samom dijelu te razvojnom stadiju biljke.[2]

Hlapljivi sumporovi spojevi su posljednjih godina sve veći predmet istraživanja radi svojih bioloških svojstava kao što su efekti kemoprevencije raka, antioksidacijska svojstva, antibakterijska aktivnost i dr.[2]

1.4.1 GLUKOZINOLATI

Glukozinolati (*β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su skupina sekundarnih metabolita u nekim biljnim vrstama. Ubrajaju se u specifičnu skupinu kemijskih spojeva (fitokemikalija) koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Pronađeni su u svim dijelovima biljke. Sastav, raspodjela i sadržaj ovise o vrsti biljke, varijetetu unutar iste vrste, dijelu i razvojnom stadiju biljke te o uvjetima razvoja. Glukozinolati i njihovi razgradni produkti proučavaju se zbog svojih nutritivnih, antioksidacijskih, antitumorskih, antibakterijskih i antifungalnih svojstava te zbog osiguravanja karakteristične arome određenog povrća.[3,4]



Slika 1.17. Opća strukturna formula glukozinolata.

Struktura bočnog lanca (R), po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju, određena je aminokiselinom te se s obzirom na strukturu bočnog lanca glukozinolati dijele na alifatske, aromatske i indolne.[3,4]

Tablica 1.1. Glukozinolati prirodnog porijekla s ustanovljenim strukturama.[3,4]

GLUKOZINOLAT	R-SKUPINA	BILJKA
Glukokaparin	CH_3	*Cleome spinosa*
Glukolepidin	CH_3CH_2	*Lepidium Menziesii*
Glukokohlearin	$CH_3CH_2(CH_3)CH$	*Cochlearin officinalis*
Sinigrin	$CH_2=CHCH_2$	*Brassica nigra*
Glukonapin	$CH_2=CH(CH_2)_2$	*Brassica napus*
Glukoibervirin	$CH_3S(CH_2)_3$	*Iberis sempervirens*
Glukorafenin	$CH_3S(O)CH=CH(CH_2)_2$	*Raphanus sativus*
Sinalbin	*p*-$HOC_6H_4CH_2$	*Sinapis alba*
Glukoeripestrin	$CH_3OOC(CH_2)_3$	*Erysimum rupestre*

1.5 ODREĐIVANJE STRUKTURE SPEKTROSKOPSKIM TEHNIKAMA

1.5.1 ULTRALJUBIČASTA-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS)

Djelovanjem zračenja ultraljubičastog (UV) i vidljivog područja (VIS) elektromagnetskog spektra dobiva se energija koja premješta elektrone iz njihovog osnovnog stanja u njihovo pobuđeno stanje. Zračenje u područjima između 200-400 nm, te u vidljivom području do oko 800 nm, daje energiju potrebnu za pobuđivanje π-elektrona i neveznih elektrona, i to najčešće u konjugiranim molekulama. Jedinica u molekuli koja je odgovorna za apsorpciju je kromofor, najčešće C=O i C=C.[7,8]

Spektrofotometrom provodimo mjerenje spektra elektromagnetskog zračenja. Spektrofotometar se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora. UV/Vis spektar nastaje bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini.[7,8]

1.5.2 INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA (IR)

Apsorpcija energije različitih područja elektromagnetskog zračenja pobuđuje molekulu na različite načine. Zračenje u infracrvenom području odgovara energiji koja izaziva

molekulske vibracije. Atomi u molekuli vibriraju uvijek na određenim kvantiziranim energetskim razinama. Ako atome poliatomske molekule promatramo kao kuglice povezane elastičnim oprugama, prema zakonima gibanja postoji 3*n*-6 načina vibracije, pri čemu je n broj atoma u molekuli. Uzorak izložen infracrvenom zračenju apsorbira upadno zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskim vibracijama.[7,8]

Energije rasteznih vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između 1200 i 4000 cm^{-1}. Taj dio infracrvenog spektra vrlo je koristan za određivanje prisutnosti funkcijskih skupina organskih spojeva i naziva se područjem funkcijskih skupina. Područje frekvencije ispod 1000 cm^{-1} sadrži veliki broj vrpci i karakteristično je za određeni spoj, a naziva se još i područje otiska prsta. Najviše informacija kod interpretacije IR spektara dobije se iz područja funkcionalnih skupina (polarne kovalentne veze). Neke funkcionalne skupine mogu se vidjeti kao kombinacija različitih vrsta veza. Npr. ester, COOR sadrži C=O i C-O veze.[7,8]

1.5.3 NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA (NMR)

Nuklearna magnetska rezonancija je nezaobilazna tehnika u identifikaciji i određivanju struktura organskih spojeva, te u izučavanju dinamike i svojstava molekula u tekućem i čvrstom stanju. Rezonancija je analogna riječi apsorpcija u IR spektroskopiji i označava apsorpciju energije vezane uz promjenu nuklearnih energijskih stanja. Ova vrsta spektroskopije uključuje energijske promjene atomskih jezgara, za što je nužno magnetsko polje da bi se te promjene zapazile. NMR se može primijeniti na jezgre koje imaju magnetski moment. To su obično jezgre s neparnim masenim brojem (^{1}H, ^{11}B, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P, itd.), ali i na jezgre s parnim masenim brojem i neparnim atomskim brojem (^{2}H, ^{10}B, ^{14}N, itd.). Neke jezgre, iako spadaju u spomenute kategorije ne mogu dati NMR signal. Primjer je fluor koji je jedini halogeni element koji se uspješno upotrebljava u NMR spektroskopiji. ^{1}H-NMR spektroskopijom se dobiva podatak o okolini vodikovih atoma u molekuli, odnosno uvid o molekulskom skeletu. ^{13}C-NMR spektar daje potpuniju sliku ugljikova skeleta.[7,8]

1.6 METODE IDENTIFIKACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

1.6.1 KROMATOGRAFIJA

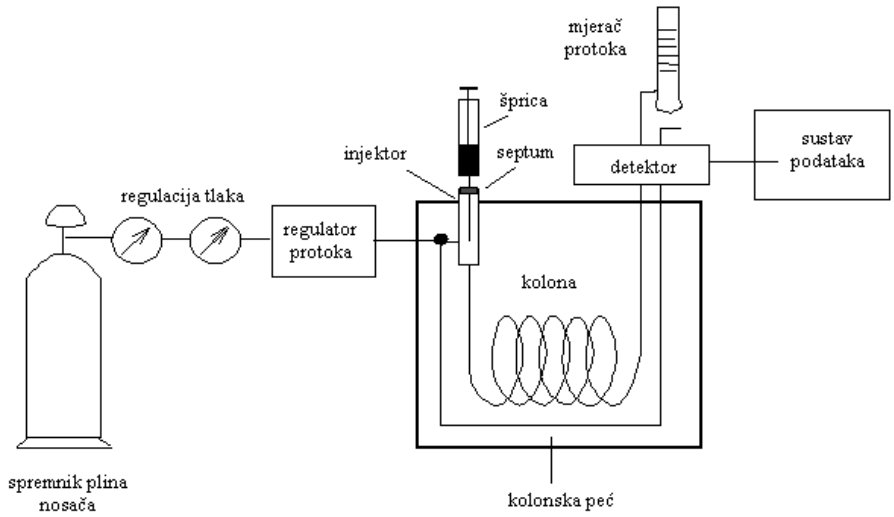
Kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za odjeljivanje, i uz odgovarajući detektor, naknadnu identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka ispitivanog uzorka na temelju njihovih fizikalnih karakteristika - različitog vremena zadržavanja u kromatografskoj koloni. Sustav u kojem se sastojci odjeljuju sastoji se od pokretne i nepokretne faze, a da bi se postiglo odjeljivanje, različiti sastojci smjese moraju imati različit afinitet prema nepokretnoj, odnosno stacionarnoj fazi. Tako će se molekule koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi na nju čvršće vezati, što će za posljedicu imati sporije eluiranje s kromatograske kolone, odnosno kasniji dolazak do detektora, za razliku od molekula koje imaju manji afinitet prema nepokretnoj fazi, koje će se brže eluirati s kolone te ranije stići do detektora.[3,5]

Kromatografiju se dijeli prema obliku kromatografske podloge (kromatografija na stupcu i plošna kromatografija) i prema agregatnom stanju pokretne faze (tekućinska, gdje je pokretna faza tekućina; plinska, gdje je pokretna faza plin te kromatografija pri superkritičnim uvjetima, gdje je pokretna faza tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka).[3,5]

1.6.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika odijeljivanja hlapljivih spojeva. Mobilna faza je inertni plin (helij, neon, argon), a stacionarna faza je krutina ili kapljevinom presvučena krutina. Kod ove tehnike nisu potrebne nikakve prethodne operacije pa se radi toga smatra vrlo brzom tehnikom, a uz to, vrlo je efikasna i kod malih količina uzorka. Tehnika se odlikuje velikom osjetljivošću, te mogućnošću razdvajanja velikog broja tvari.[3,4,5]

Uzorak za analizu mora biti hlapljiv kako bi isparioo u injektoru i treba biti stabilan na radnoj temperaturi kolone. Unosi se u maloj količini i to na način da se odjednom i što prije istisne sav uzorak iz igle za unošenje uzorka. Zatim inertni plin nosilac nosi uzorak kroz kromatografsku kolonu, na kojoj se, s obzirom na afinitet prema stacionarnoj fazi, vrši odjeljivanje. Na kraju uzorak dolazi do detektora. Detektor je uređaj koji se može temeljiti na: toplinskoj vodljivosti, plamenoj ionizaciji, fotoionizaciji, električnoj vodljivosti, a najčešće spektrometriji masa (vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) je najčešća izvedba).[3,4,5]

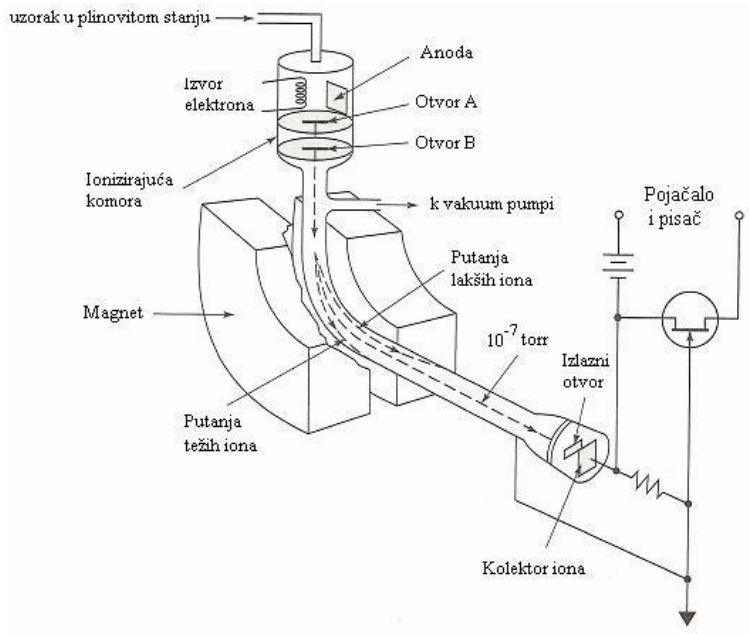


Slika 1.18. Shematski prikaz plinskog kromatografa.[4]

1.6.3 SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (MS) je analitička instrumentna tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju omjera njihove mase i naboja. Koristi se za detekciju i identifikaciju organskih molekula i njihovih degradacijskih produkata i metabolita.[5]

Nječešće se povezuje s plinskom i tekućinskom kromatografijom, a moguće je povezivanje i s kapilarnom zonskom elektroforezom i mikročipovima. Na ovaj se način dobivaju kontinuirane vezane tehnike gdje se prilikom analize gubi vrlo malo uzorka. Moguće je koristiti i diskontinuirane metode kao što su nanosprej-MS i MALDI-MS (engl. *Matrix assisted laser desorption/ionization*, MALDI). Glavne komponente svakog masenog spektrometra su ionski izvor, analizator masa i detektor.[5]



Slika 1.19. Shema spektrometra masa.[4]

U ionskom izvoru dolazi do ionizacije molekula koje se, ovisno o količini energije koja se primjenjuje u procesu ionizacije i o svojstvima analita, mogu različito ionizirati. Za ionizaciju molekula u plinovitom stanju koristi se ionizacija elektronima, kemijska ionizacija i ionizacija u polju. Pri ionizaciji elektronima između molekula uzorka i elektrona dolazi do sudara pri čemu nastaje veliki broj fragmenata te je moguće da u spektru masa signal molekulskog iona izostane. Kemijska ionizacija koristi plin reagens za ionizaciju molekula uzorka. Prvi korak je ionizacija plina reagensa elektronima, koji zatim ionizira uzorak reakcijama kojima mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni. Pri kemijskoj ionizaciji u spektru masa jasno je vidljiv signal molekulskog iona. Ionizacija poljem koristi snagu električnog polja gdje dolazi do izbijanja elektrona iz molekule uzorka. Ovom metodom nastaju kationski radikali koji se dalje razlažu na čitav niz fragmenata.[3,4,5]

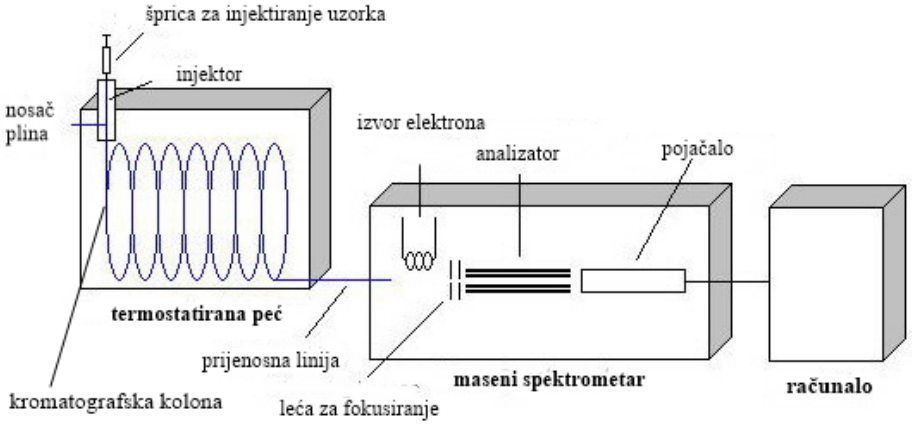
Analizatori masa razdvajaju nastale iona u vakuumu na temelju njihovih omjera mase i naboja. Najvažniji su analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *time offlight,* TOF) i kvadrupolni analizator masa, dok se u posljednje vrijeme razvija i orbitalni analizator masa s ionskom klopkom. Analizator masa koji mjeri vrijeme leta razdvaja ione iste energije, ali različitih vrijednosti odnosa mase i naboja (*m/z*) jer putuju različitim brzinama. Početno ubrzanje za sve ione je isto, ali razdvajanje počinje kad u cijevi nema djelovanja električnog polja. Ioni s većim omjerom mase i naboja (*m/z*) putuju sporije od

onih s manjim omjerom *m/z*. Masa se računa iz mjerenja vremena koje je potrebno ionima da dođu od izvora do detektora. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri elektrode, od kojih su dvije suprotne pozitivno nabijene, a preostale dvije negativno nabijene. Na elektrode se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i radiofrekventnog potencijala. Ioni s određenom vrijednošću *m/z*, koji se gibaju stabilnom putanjom u oscilirajućem električnom polju, odvajaju se od ostalih i dolaze na detektor.[3,4,5]

U detektor ulaze ioni nakon što prođu kroz analizator te se detektiraju na osnovi mase, naboja ili brzine. Kako jako mali broj iona prođe kroz analizator, potrebno je pojačati signale koje daje detektor. Najpoznatiji detektori su Faradayev cilindar, fotografska ploča te multiplikatori elektrona.[3,4,5]

1.6.4 VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

Nedostatak plinske kromatografije je kvalitatvno određivanje uzorka. Problem se rješava kombiniranjem plinske kromatografije sa spektrometrijom masa. Ovakva kombinacija tehnika omogućava dobivanje maksimalnog broja podataka uz minimalne gubitke uzorka. Obje tehnike koriste uzorak u plinovitom stanju, a karakteristični podatci dobiveni za izdvojeni spoj su retencijsko vrijeme i površina pika koja je proporcionalna količini spoja, te maseni spektar kojim se identificira odgovarajući spoj. Dobiveni maseni spektar se uspoređuje s masenim spektrom spoja koji se nalazi u Wileyevoj bazi masenih spektara.[3,4]



Slika 1.20. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS.[4]

1.6.5 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Tekućinska kromatografija (eng. *Liquid Chromatography* - LC) je analitička tehnika koja služi za razdvajanje tvari na osnovi raspodjele između tekuće pokretne (mobilne) faze i krute ili tekućinom presvučene krute nepokretne (stacionarne) faze. Koristi se za odjeljivanje analita male i velike molekulske mase, termički nestabilnih spojeva i biološki aktivnih spojeva.[3,5]

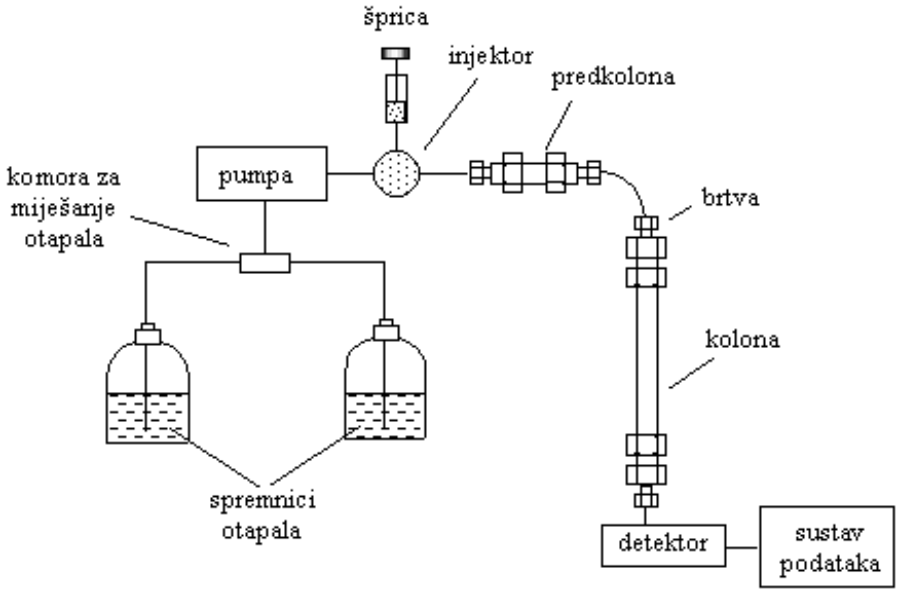
Tekućinska kromatografija može se podijeliti, s obzirom na polarnost nepokretne faze, na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu, a kod kromatografije obrnutih faza pokretna faza je polarnija od nepokretne faze.[3,5]

Prema mehanizmu odvajanja kromatografija se dijeli na adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, te kromatografiju ionske izmjene i kromatografiju isključenjem.

1.6.6 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je vrsta kolonske tekućinske kromatografije. Razliku od obične tekućinske kromatografije čini primjena tlaka zbog kojeg pokretna faza brže prolazi kroz kolonu.[3,4,5]

Sastavni dijelovi HPLC-a su spremnik pokretne faze, injektor, kolona, pumpa koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, detektor i sustav za obradu podataka.



Slika 1.21. Shematski prikaz HPLC-a.[3]

U sustavu mogu biti jedan ili više spremnika pokretne faze koji služe za skladištenje otapala iz kojega crpka kontinuirano vuče određeni volumen otapala. Crpka sadrži filtar koji sprječava unos čestica i onečišćenja u crpku. Konstantan protok pokretne faze u sustavu omogućava crpka, koja radi pri jako visokim tlakovima. Dva su načina rada: s konstantnim tlakom ili s konstantnim protokom. Način rada s konstantnim protokom omogućava kontrolirano miješanje ukoliko se koristi kombinacija dva ili više otapala. Pokretna faza može biti izokratna (sastav pokretne faze je stalan) ili gradijentna (ukoliko se tijekom analiziranja mijenja sastav pokretne faze).[3,4,5]

Automatski uzorkivač služi za automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije ulaska u kolonu. Iz bočica za uzorke unosi se točno određeni volumen zadan

programom. Kolona je najčešće uska metalna cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza. Dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjeri, mogu biti različite. Duljina kolone može biti od 100 mm do 250 mm, a promjer kolone od 2 mm do 4,6 mm. U koloni se nalaze nepokretna faza koji se sastoje od sitnih čestica, čime se povećava kontaktna površina. Analizirana tvar, ili smjesa tvari, prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom. U mobilnu fazu unosi se jako mali volumen uzorka, te se zbog specifičnih fizikalno-kemijskih interakcija komponente smjese različito zadržavaju na koloni.[3,4,5]

Na detektoru se mjere promjene svojstava analita ili pokretne faze. Najčešće se kao detektori koriste UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor ili maseni spektrometar. Detektori daju signal koji je proporcionalan nekom određenom svojstvu analita. Cijelim sustavom se upravlja preko računala, što omogućava jednostavnu kontrolu i promjenu određenih parametara te obradu prikupljenih podataka.[3,4,5]

1.6.7 VEZANI SUSTAV TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

Vezani sustav tekućinska kromatografija - spektrometrija masa (LC-MS) je novija tehnika temeljena na kombiniranju tekućinske kromatografije (HPLC, odjeljivanje sastojaka iz smjese) s masenom spektrometrijom (MS, identifikacija sastojaka). LC-MS ima veliku prednost u odnosu na ostale sustave jer može istovremeno pratiti analizu korištenjem dvaju detektora: DAD (*diode array detector*), s mogućnošću izbora do 8 valnih duljina, i spektrometra masa (do 1650 Da). LC-MS metoda izvršava kvalitativnu analizu - snimanje spektra uzorka, određivanje molekulske mase spoja, analizu fragmentacije određenog molekulskog iona (engl. *product ion*) i određivanje prekursora određenog fragmenta (engl. *precursor ion*). Dvojna spektrometrija (LC-MS/MS) radi na principu udruženih masenih spektrometara. Prvi MS uređaj ionizira uzorak direktno iz otopine i filtrira ione prema omjeru mase i naboja. Jedna od najvažnijih tehnika ionizacije je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI). Ona se može primijeniti na polarne, nepolarne i termički nestabilne spojeve i to na način da se na metalnu kapilaru kroz koju prolazi otopina s analitom primjenjuje električno polje uslijed čega dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Kapilara se može

priključiti na pozitivan kraj izvora napona, pri čemu pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi gdje se akumuliraju. Za ionizaciju se koriste još i tehnike pri atmosferskom tlaku poput termoraspršenja (engl. *thermospray*, TSP), kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmosferic pressure chemical ionization*, APCI) i ionizacije fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmosferic pressure photoionization*, APPI). Ion od interesa se dalje fragmentira u kolizijskoj ćeliji, a njegovi se fragmenti analiziraju na drugom masenom spektrometru.[3,5]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 KORIŠTENE METODE

- Tijek reakcija sintetiziranih spojeva, kao i provjera čistoće istih, ispitivana je tankoslojnom kromatografijom na aluminijskim pločicama koje su presvučene silikagelom (60 F_{254}, Merck).
- Elektrotermalni kapilarni uređaj za mjerenje točke tališta Barnstead Thermolyne Mel-temp 1001D korišten je za određivanje točaka tališta sintetiziranih spojeva.
- IR spektri su snimljeni s Thermo Scientific Nicolet iS50 FT-IR uređajem u području od 4000-400 cm^{-1} i osjetljivosti 65 cm^{-1}.
- ^{1}H-NMR i ^{13}C-NMR spektri su snimljeni pomoću Bruker Avance 300 UltraShield uređaja. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm (dijelovi na milijun) prema tetrametilsilanu (TMS, $(CH_3)_4Si$) kao unutrašnjem standardu (δ=0).
- Za homogenizaciju biljnog materijala korišten je OMNI international GLH 850, na 5000 okretaja u 5 minuta.
- Prilikom kvantizacije izotiocijanata korištena je plinska kromatografija s plamenoionizacijskim detektorom (GC-FID, model 7890A) proizvođača Agilent, Santa Clara, CA, USA. Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni HP-5 (30 m × 0,32 mm) sa slojem nepokretne faze debljine (0,25 μm). Plin nosilac je bio helij protoka 1ml/min. Temperatura injektora je postavljena na 250 °C, a volumen injektiranja uzorka 1 μL. Temperatura kolne je postavljena kako slijedi: 3 min izotermno na 60 °C, zatim zagrijavanje do 150 °C brzinom od 7 °C/min te održavanje navedene temperature u trajanju od 1 min, nakon čega se opet zagrijava brzinom od 50 °C/min do 250 °C te se postignuta temperatura održava izotermno 5 min. Temeperatura detektora je bila 300 °C.
- Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju hlapljivih sumporovih spojeva korišten je vezani sustav plinske kromatografije (Varian model 3900) i spektrometrije masa (Varian model 2100 T) proizvođača VarianInc., Lake Forest, CA, USA. Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m × 0,25 mm) sa slojem stacionarne faze debljine 0,25 μm. Plin nosioc je helij, dok je protok postavljen na 1 mL/min. Temperatura injektora je 250 °C, a volumen injektiranog uzorka 1 μL. Temperatura kolone je postavljena kako slijedi: 3 min izotermno na

60 °C, zatim zagrijavanje do 246 °C brzinom od 3 °C/min, te održavanje navedene temperature u trajanju 25 min. Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV, temperatura izvora iona je 200 °C, dok područje skeniranja obuhvaća 40-350 masenih jedinica.



Slika 2.1. GC-MS uređaj (Varian, USA).

- Za kvantizaciju desulfoglukozinolata korišten je vezani sustav HPLC-UV, PerkinElmer, NCI 900, USA. Korištena je kolona C-18 (250 mm × 4 mm) sa promjerom čestica 5µm. Kao mobilna faza korištena je smjesa vode i acetonitrila uz protok od 0,8 mL/min. Volumen injektiranog uzorka iznosi 20 µL. Za detekciju spojeva korišten je UV detektor (λ=227 nm). Radna temperatura je zadana na 30 °C, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 56 minuta. U tablici 2.1. je prikazan sastav mobilne faze korištene za analizu HPLC-om.

Tablica 2.1. Sastav mobilne faze korištene za analizu desulfoglukozinolata na HPLC-u

Vrijeme (min)	Voda (%)	Acetonitril (30%)	Gradijent
0	100	0	-
0,5	96	4	-
28,0	14	86	Linearno
4,0	14	86	-
2,0	5	95	Linearno
13,0	5	95	-
1,0	96	4	Linearno
8,0	96	4	-
0,0	0	100	-



Slika 2.2. HPLC uređaj (PerkinElmer, USA).

- Za analizu desulfoglukozinolata korišten je i vezani sustav HPLC-PDA-MS/MS-8050, Shimadzu, Japan. Sustav se sastoji od HPLC uređaja združenog s spektorofotometrijskim ultraljubičastim i vidljivim detektorom i trostrukim kvadropolnim masenim spektrometrom. Spektar snimanja valnih duljina podešen je u intervalu od 250 do 350 nm. Korištena je kolona C-18 (250 mm × 4 mm) sa slojem nepokretne faze debljine 5 µm. Kao mobilna faza korištena su dva otapala:

otapalo A – voda, uz dodatak 50 mM natrijevog klorida, a otapalo B - 30 % acetonitril, uz protok od 0,8 mL/min. Radna temperatura postavljena je na 30 °C, a trajanje analize iznosilo je 47 minuta. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 µL. Desulfoglukozinolati su analizirani praćenjem MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) prijelaza koji su dobiveni primjenom kolizijske energije - 25 eV. Temperatura izvora iona postavljena je na 300 °C, a MRM prijelazi skenirani su u pozitivnom načinu.

Tablica 2.2. Sastav mobilne faze korištene za HPLC-DAD-MS/MS analizu desulfoglukozinolata

Vrijeme (min)	**Voda (%)**	**Acetonitril (30%)**	**Gradijent**
0	100	0	-
0,02	96	4	-
28,0	14	86	Linearno
32,0	14	86	-
34,0	5	95	Linearno
38,0	5	95	-
39,0	96	4	Linearno
46,80	96	4	-
47,0	0	100	-



Slika 2.3. HPLC-DAD-MS/MS uređaj (Shimadzu, Japan).

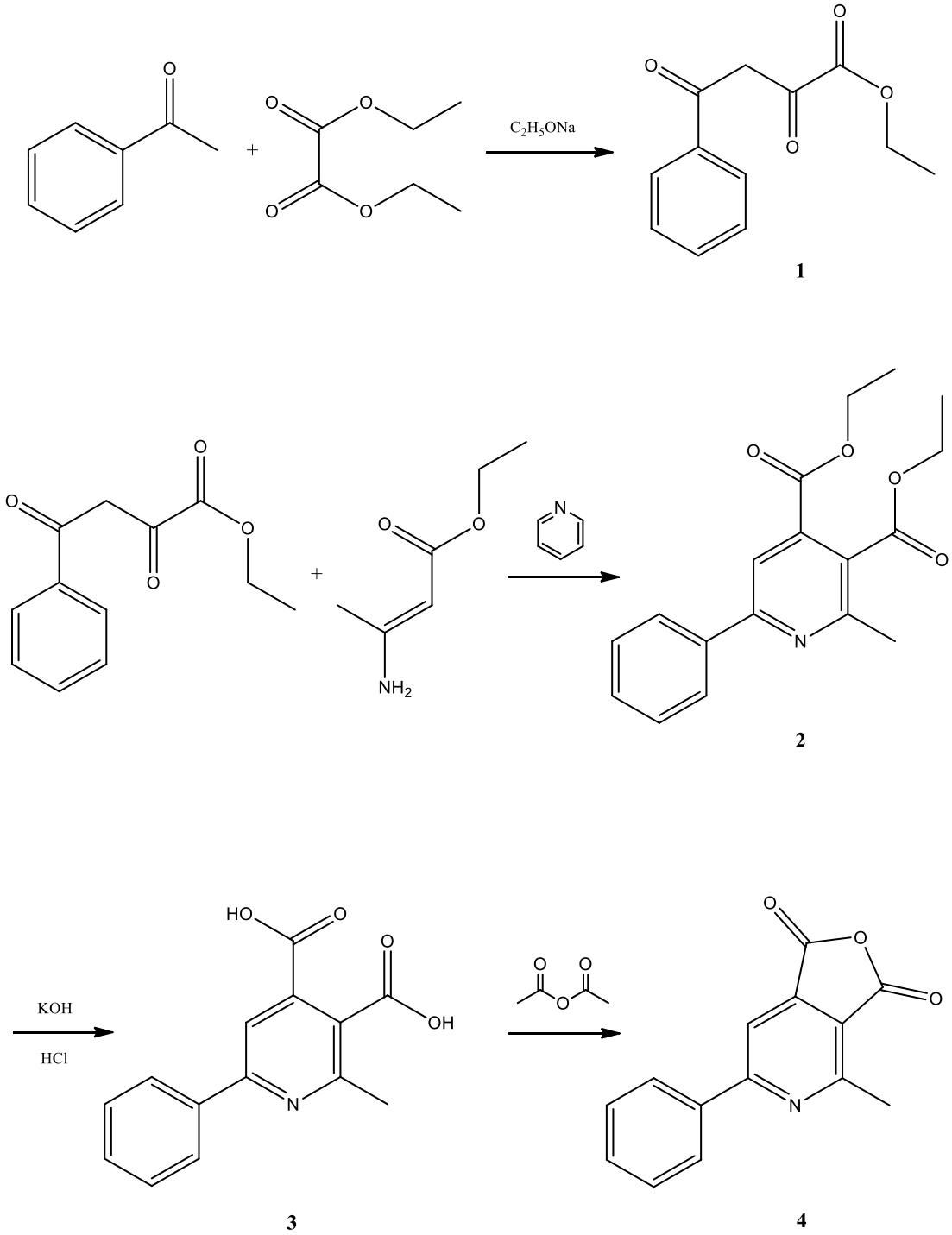
2.2 KORIŠTENE KEMIKALIJE

Reagensi korišteni za sintezu su kupljeni od proizvođača: Sigma Aldrich, Fluka, ChemPur.

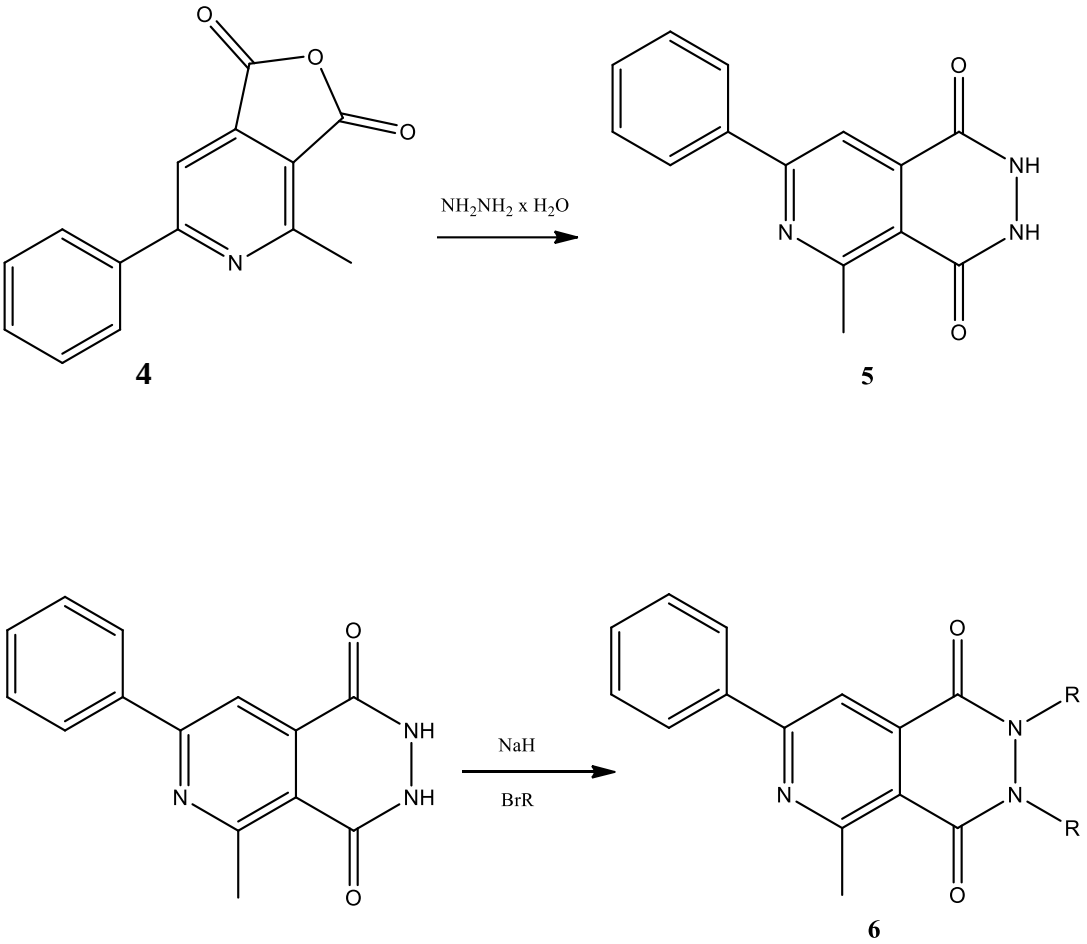
Kemikalije korištene pri ekstrakciji glukozinolata i ispitivanju gastrointestinalnih uvjeta:

- Bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska,
- Natrijev klorid, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska,
- Metanol (70 %),
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Dekstran (DEAE – sephadex A-25),
- Ultračista voda,
- Sinigrin hidrat, Sigma
- Sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich,
- Aposlutni etanol.

2.3 Sinteza 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido-[3,4-d]-piridazin-1,4-diona i njegovih derivata

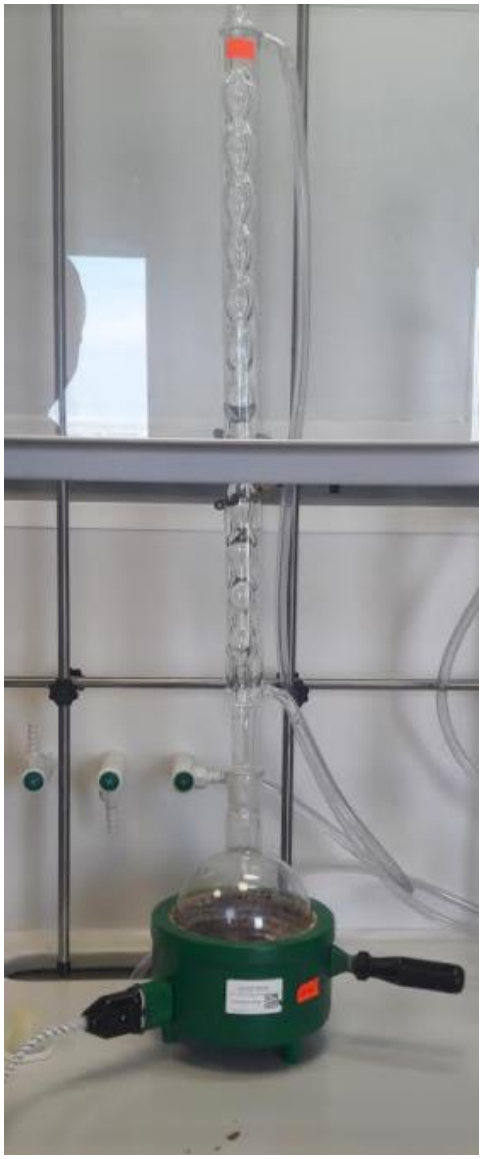


Slika 2.4.a Shematski prikaz reakcija sinteze etil-2,4-diokso-4-fenil-butanoata (1), dietil-2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilata (2), 2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilne kiseline (3), i 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona (4).



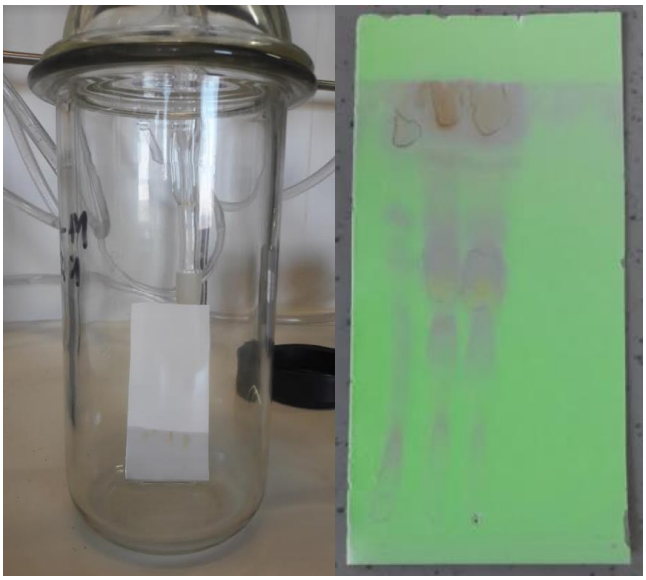
Slika 2.4.b Shematski prikaz reakcija sinteze 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona (5) i njegovih derivata (6).

Etil-2,4-diokso-4-fenil-butanoat je pripremljen iz fenil-metil-etera i dietiloksalata uz dodatak natrijeva etoksida. U tikvicu s okruglim dnom (m=254,04 g) stavljen je prethodno pripremljen etil 2,4-diokso-4-fenil-butanoat (m=65,57 g) i etil 3-aminobut-2-enoat (m=38,47 g) uz dodatak piridina (oko 12 mL). Smjesa je stavljena na refluks 1 h na 50 °C uz povremeno miješanje. Nakon 1 h ohlađena je do sobne temperature i ostavljena preko noći.



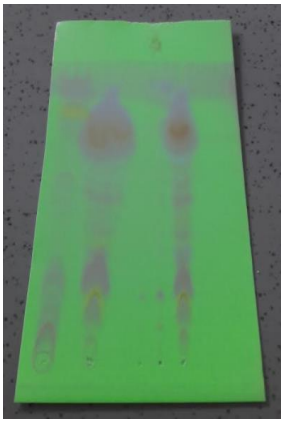
Slika 2.5. Aparatura za refluks.

Dobivena otopina testirana je na TLC (silikagel/metanol:kloroform 1:2)



Slika 2.6. TLC pločica na koju su nanešeni standard i sintetizirani spojevi.

Prva provjera na TLC pokazala je da je udio metanola u mobilnoj fazi prevelik. TLC je ponovljen (povećan udio kloroforma, 1:3 omjer u korist kloroforma) i pokazao je kako reakcija nije došla do kraja i da je i dalje prisutan reaktant (etil-3-aminobut-2-enoat) u većoj količini. Prva kolona na TLC pločici je čisti dietil-2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilat, druga i treća su sintetizirani spojevi (Slika 2.6.). Reakcija je nastavljena još 1 h na refluksu uz temperaturu od 50 °C koja je nakon 40 minuta snižena na 35 °C. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, ponovljena je provjera na TLC. Reaktant i dalje prevladava. Reakcijska smjesa je ostavljena preko noći kako bi više spoja izreagiralo. Slijedi provjera na TLC-u, ovog puta mobilna faza je toluen (Slika 2.7.).



Slika 2.7. TLC pločica - prva kolona čisti dietil 2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilat, druga i treća sintetizirani spojevi.

U reakcijsku posudu dodano je 100 mL etanola jer je otopina bila pregusta. Za hidrolizu estera uz KOH potrebna su 2 mol-a (1 mol za 1 estersku grupu), ali dodana su 3 mol-a kako bi sigurno hidrolizirale obje skupine. Odvagana je potrebna masu KOH (62,03 g) i stavljena u čašu u koju je pažljivo, uz miješanje, dodano oko 300 mL destilirane vode. Potrebno je pričekati da se otopina ohladi i postane bezbojna. Pažljivo je dodana ohlađena otopina KOH u reakcijsku posudu uz miješanje, zatim spojena na refluks (T=90°C) i puštena 3 sata nakon što je postignuta temperatura vrenja.



Slika 2.8. TLC pločica nakon reakcije hidrolize.

Na slici 2.8. TLC pločica prikazuje sljedeće: prva mrlja - ester, druga i treća su uzorci, četvrta mrlja je kiselina, odnosno očekivani produkt. Uočava se da reakcija nije došla do kraja – ponoviti refluks 2 dana po 1 h. Nakon ponovljenog refluksa, nova TLC pločica pokazuje da reakcija nije došla do kraja.



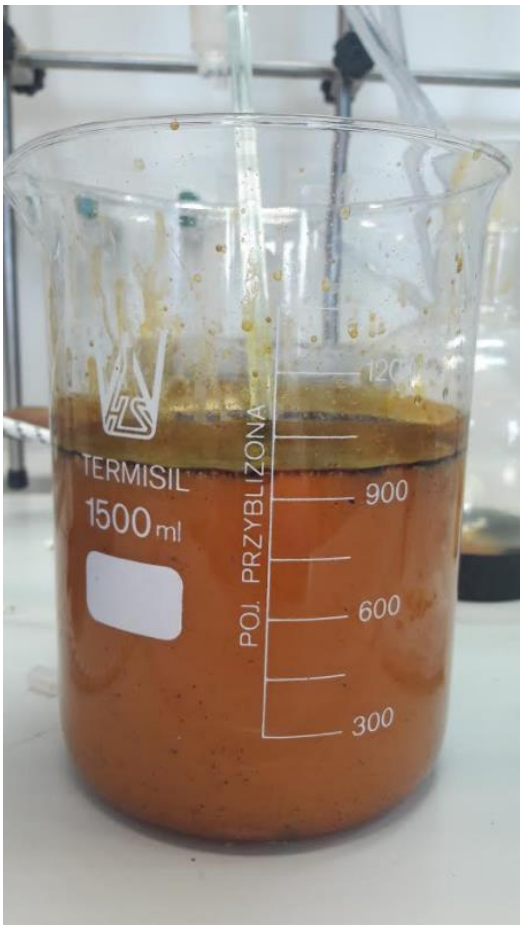
Slika 2.9. TLC pločica (mobilna faza -metanol : toluen 1:1; uzorci nanešeni istim redoslijedom kao na slici 2.8.).

Temperatura je podignuta na 100 °C i smjesa je refluksirana još 2,5 h.



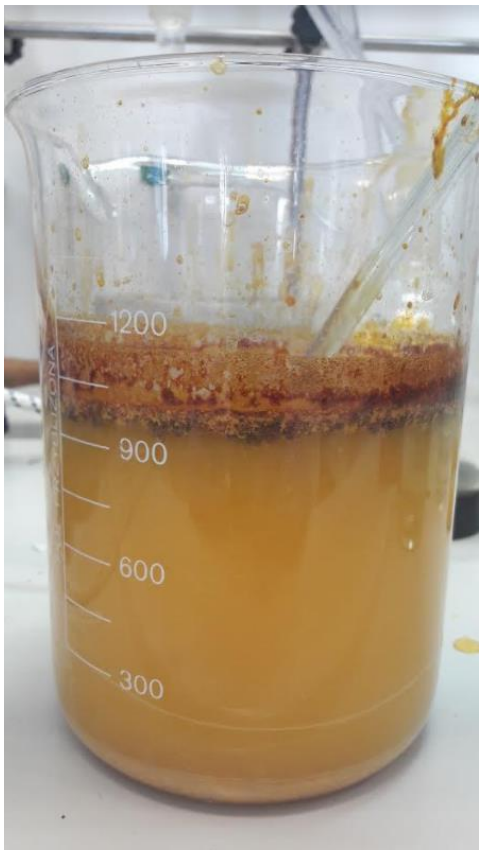
Slika 2.10. Dodatno refluksiranje smjese tijekom 2,5 h.

U veliku čašu dodati smrvljeni led i preliti destiliranom vodom. Reakcijsku smjesu dodati u smjesu leda i destilirane vode i postupno, uz miješanje, dodavati HCl do pH=2.



Slika 2.11. Led, destilirana voda, reakcijska smjesa i HCl (još nije pH=2).

Reakciju je potrebno pustiti 15-20 minuta prije provjeravanja pH. Provjera pH nije jednostavna zbog crnog sloja koji se stvara na površini (vrlo lako se može pretjerati s kiselinom upravo iz tog razloga).



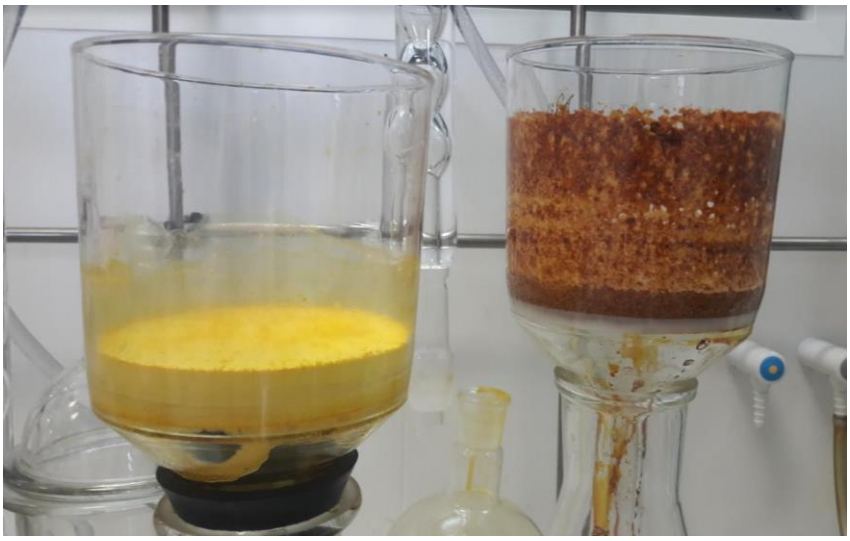
Slika 2.12. Led, destilirana voda, reakcijska smjesa i HCl (pH=2)

Očekivani produkt će se istaložiti na dnu. Talog je kombinacija narančaste, bijele i žute boje. U otopini, prilikom miješanja, vidljiva je velika količina crnih čestica koje ukazuju na prisutnost piridina i zaostalog reaktanta. Nakon što se talog slegne, slijedi filtracija preko Büchnerovog lijevka (Slika 2.13.).

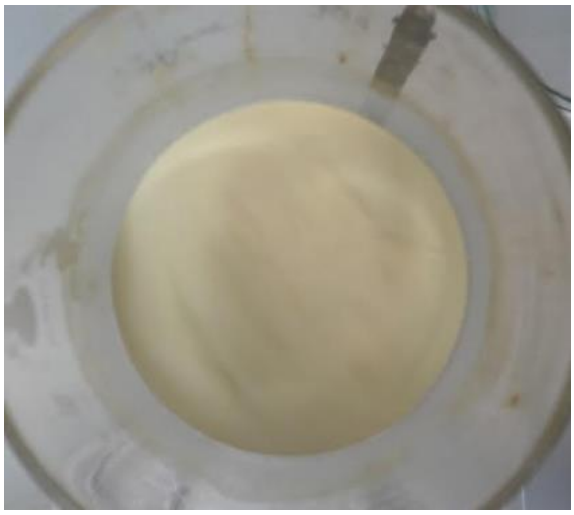


Slika 2.13. Filtracija taloga preko Büchnerovog lijevka.

Talog je potrebno ispirati etanolom do svijetložute boje (Slika 2.14.).



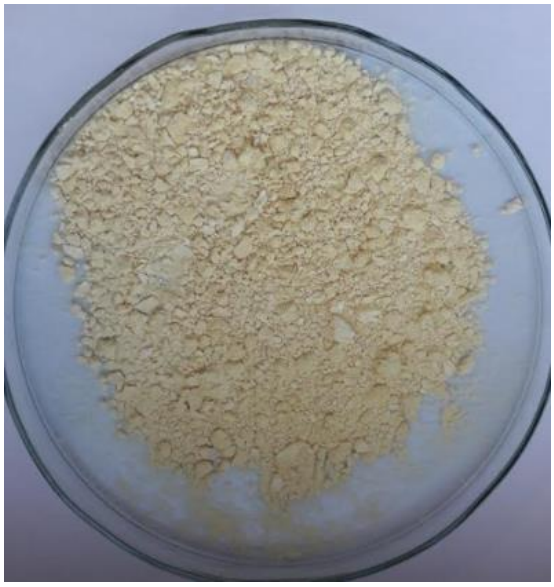
Slika 2.14. Usporedba taloga prije i poslije pročišćavanja etanolom.



Slika 2.15. Potpuno isprani talog.

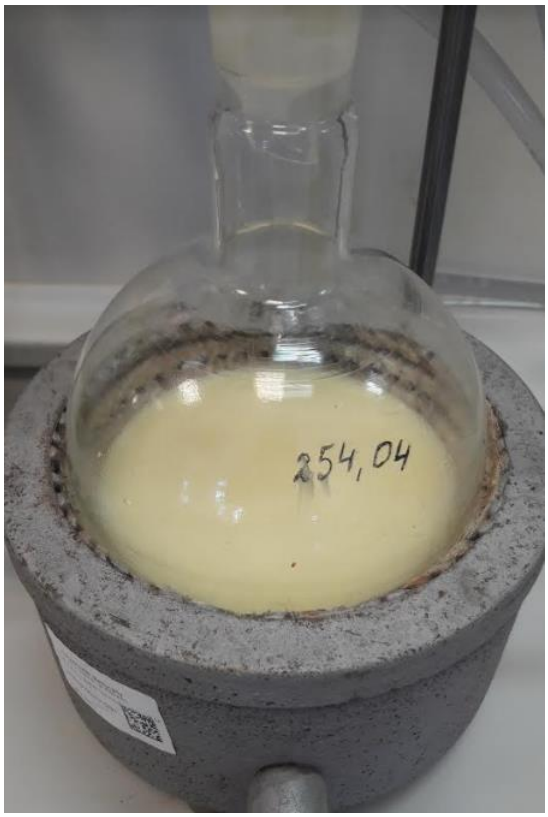
Talog se dobro osuši i provjeri točka taljenja (literaturna vrijednost oko 215 °C). Filtrat se ostavi preko noći kako bi se istaložilo još produkta (došlo je do taloženja znatne količine produkta, koja nije dalje korištena jer bi to zahtijevalo ponovno sušenje).

Temperatura taljenja je 212-213 °C.



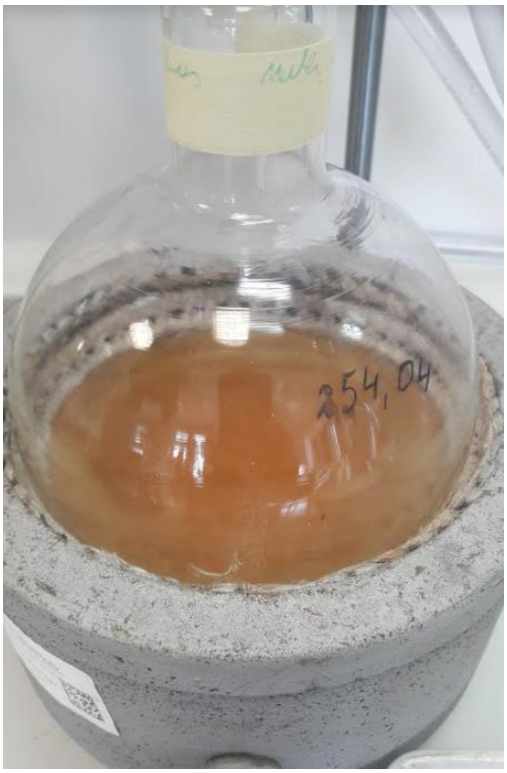
Slika 2.16. Talog nakon sušenja.

U tikvicu s okruglim dnom stavljeni su dobiveni kristali, koji su se prethodno dobro osušili, i dodan je etanol do 1/3 tikvice s okruglim dnom.



Slika 2.17. Prekristalizacija iz etanola.

Otopina je refluksirana oko 30 minuta, te nakon toga ugašena i ostavljena preko noći. Na slici 2.18. je vidljivo kako je otopina prilikom prekristalizacije promijenila boju iz bijele u narančasto-smeđu. Takva otopina filtrirana je preko Büchnerovog lijevka. Ako u tikvici ima zaostataka, oni se pokupe etanolom.



Slika 2.18. Boja otopine nakon prekristalizacije.

Filtracijom je dobiven vlažni talog u obliku paste (slika 2.19.).



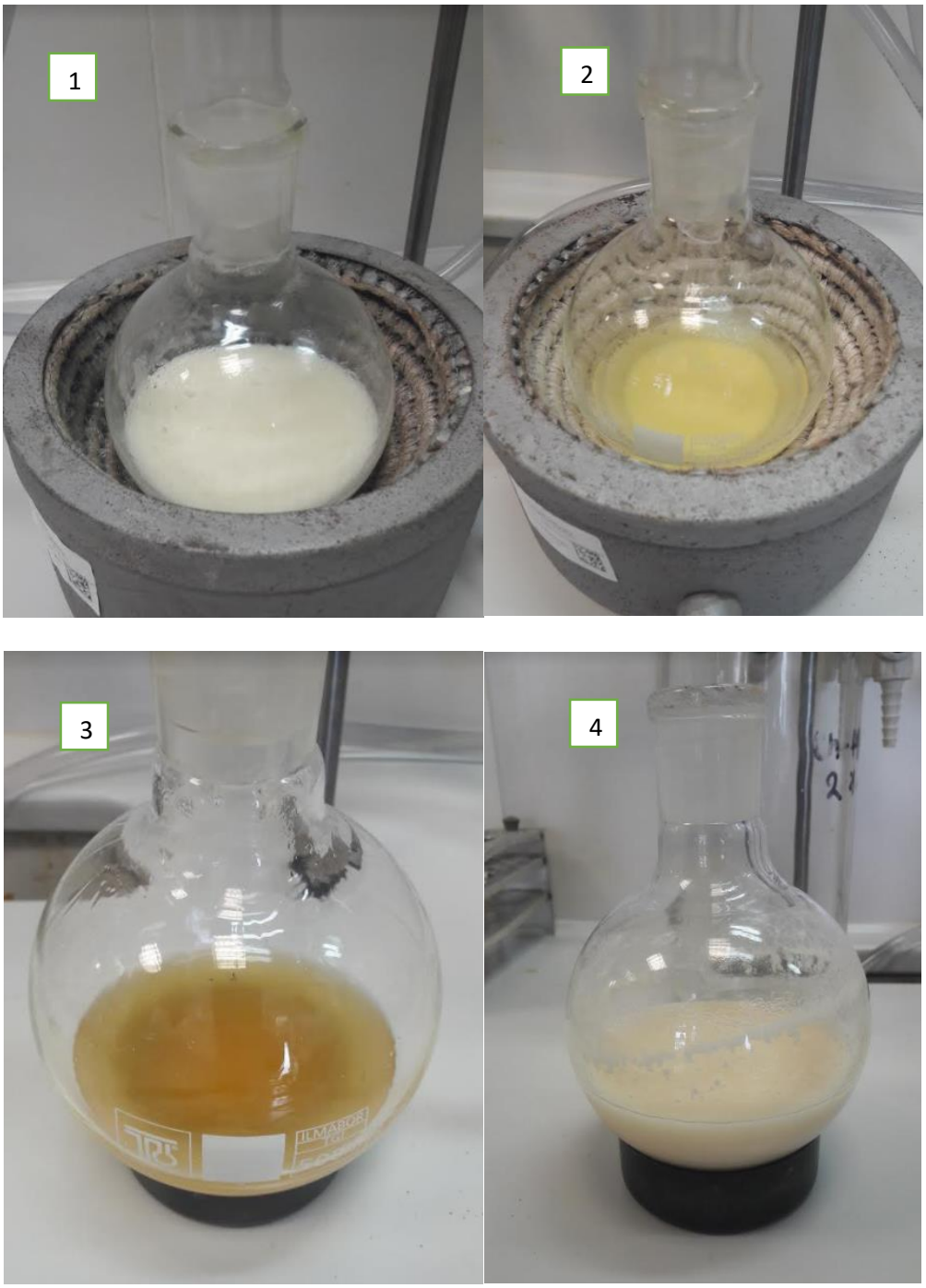
Slika 2.19. Vlažni talog pročišćene 2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilne kiseline.

Talog je potrebno dobro osušiti (moguća je pojava blago žute boje na površini taloga) te kada je moguće, talog usitniti kako bi se što bolje osušio. Filtrat upariti na rotacijskom vakuum uparivaču (RVU) i ostaviti u hladnjaku.



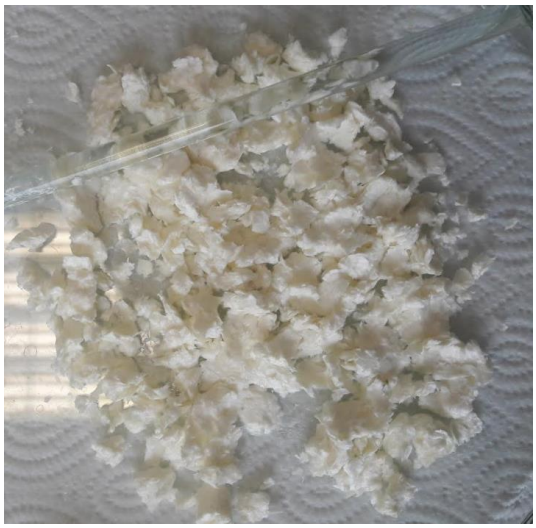
Slika 2.20. Osušeni i usitnjeni talog 2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilne kiseline.

U tikvicu s okruglim dnom dodan je spoj 3 koji je prethodno dobro osušen te je dodan acetanhidrid mase 7 puta veće od mase taloga. Pustiti na refluks oko 1 sat na 100 °C. U slučaju da se kristali ne otope, dodati još acetanhidrida (30 mL). Nakon refluksa ohladiti do sobne temperature (Slika 2.21).



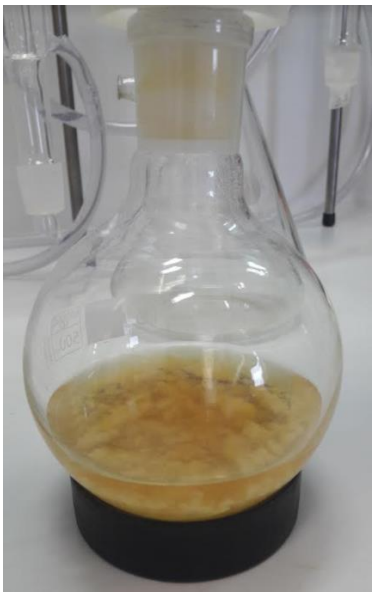
Slika 2.21. Slike prikazuju prethodno opisanu reakciju. Slika 1. prikazuje reakcijsku smjesu prije refluksiranja, slika 2. reakcijsku smjesu za vrijeme refluksiranja, slika 3. neposredno nakon skidanja s refluksa, a slika 4. reakcijsku smjesu nakon 20 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi.

Nakon hlađenja filtirati preko Büchnerovog lijevka i dobro istisnuti višak otapala. Kristali podsjećaju na staklenu vunu. Filtrat preko noći ostaviti u hladnjaku.



Slika 2.22. Kristali 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona i nečistoće.

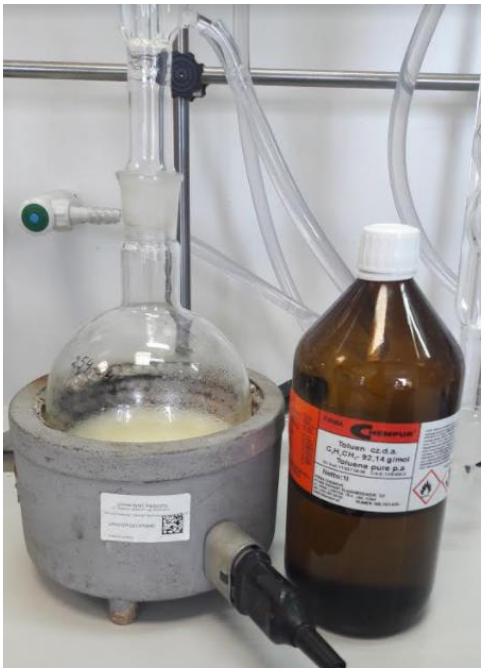
Kristale dobro osušiti i provjeriti točku taljenja (literaturno 197 °C, eksperimentalno dobivena temperatura je 199 °C). U filtratu koji je ostavljen u hladnjaku uočeni su nastali kristali, došlo je do precipitacije (slika 2.23.). Kristale filtrirati preko Büchnerovog lijevka.



Slika 2.23. Upareni filtrat u kojem je došlo do precipitacije.

Kristale 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona i nečistoće prekristalizirati iz toluena (slika 2.24.).

U tikvicu s okruglim dnom staviti dobivene kristale i dodati toluen da ih prekrije (2 cm otprilike) i refluksirati na 100 °C.



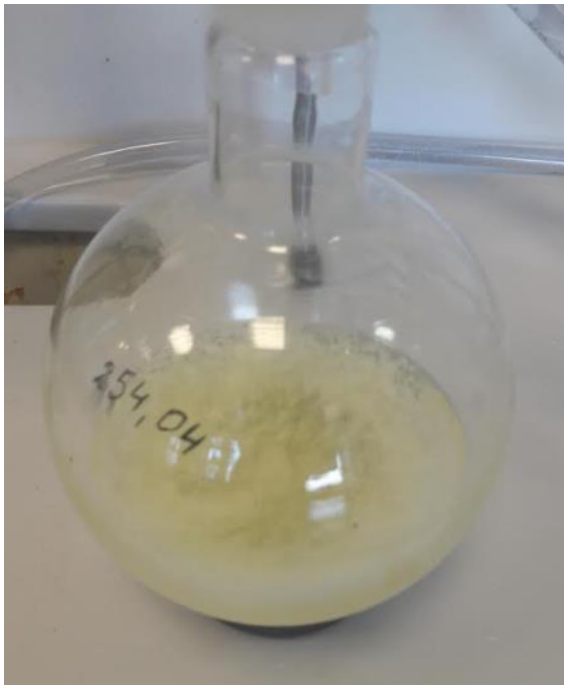
Slika 2.24. Prekristalizacija 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona i nečistoća iz toluena.

Zagrijavati dok se sve ne otopi i otopina postane bistra (slika 2.25.). Ako jako kuha, potrebno je sniziti temperaturu. Nakon što otopina postane bistra, ohladiti do sobne temperature i ostaviti preko noći.



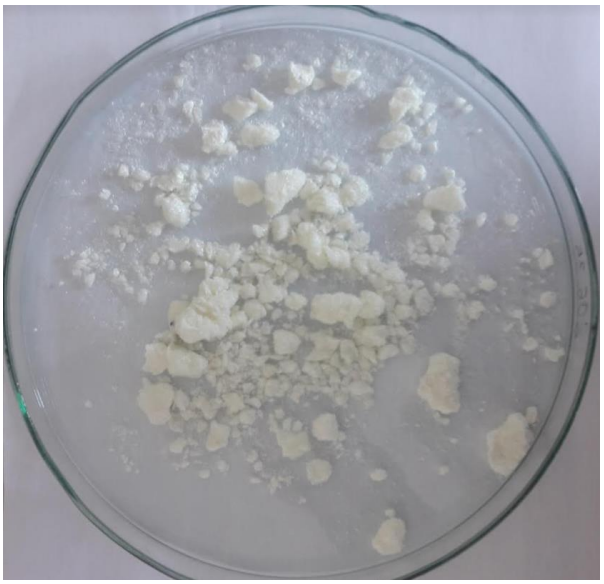
Slika 2.25. Otopljeni 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-dion i nečistoće u toluenu odmah nakon refluksa.

Kristale dobivene prekristalizacijom filtrirati preko Büchnerovog lijevka i ostaviti da se osuše. Filtrat upariti na RVU i spremiti u hladnjak.



Slika 2.26. Prekristalizacija iz toluena. Slikano 24 h nakon refluksa.

Ako je došlo do precipitacije, filtrirati preostali dio kristala i dobro ih osušiti.



Slika 2.27. Kristali 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona (4) dobiveni prekristalizacijom iz toluena.

U malu tikvicu s okruglim dnom stavljeni su dobiveni kristali 4-metil-6-fenil-furo-[3,4-*c*]-piridin-1,3-diona (8 g). Tikvica je do pola napunjena etanolom te je dodan hidrazin (18 mL). Sve je stavljeno 2 sata na refluks uz miješanje (slika 2.28.).



Slika 2.28. Reakcija međuprodukta (4) i hidrazina na refluksu

Temperatura je bila previsoka pa je došlo do burnije reakcije, dio taloga je završio u Liebigovom hladilu (slika 2.29.). Skinuto s refluksa nakon 45 minuta.



Slika 2.29. Burna reakcija pri previsokoj temperaturi.

Filtrirati preko Büchnerovog lijevka i ostaviti da se dobro osuši (slika 2.30.). Filtrat ostaviti u hladnjaku. Provjeriti temperaturu taljenja (>300 °C).



Slika 2.30. Vlažni kristali 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dion i onečišćenja.

U filtratu iz hladnjaka je došlo do precipitacije. Filtrirati preko Büchnerovog lijevka. Idući korak je prekristalizacija iz metanola.



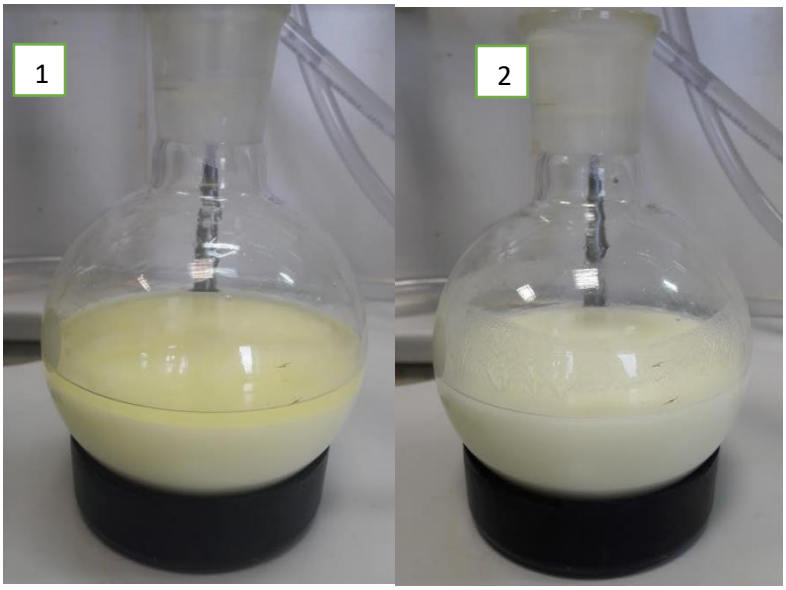
Slika 2.31. Suhi kristali 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dion i onečišćenja.

Talog usitniti, staviti u tikvicu s okruglim dnom, uliti što manju količinu metanola, spojiti na Liebigovo hladilo i pustiti da se prekristalizira na refluksu uz miješanje. (Slika 2.32.) Držati na refluksu do vrenja.



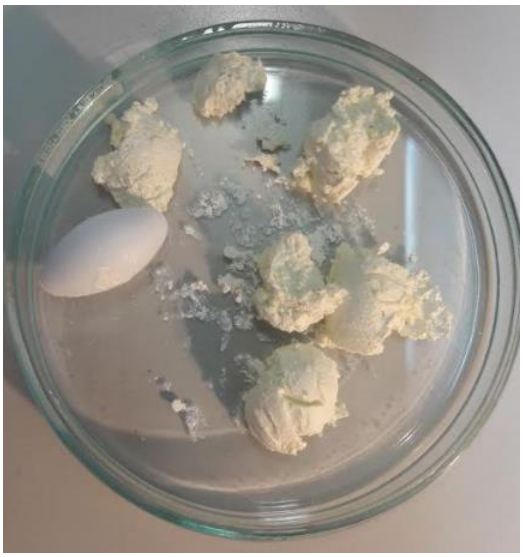
Slika 2.32. Prekristalizacija iz metanola.

Nakon 5 minuta vrenja, ugasiti i ostaviti da se ohladi do sobne temperature.



Slika 2.33. Na slici 1 je prikazana još vruća otopina tek skinuta s refluksa. Slika 2 prikazuje ohlađenu otopinu.

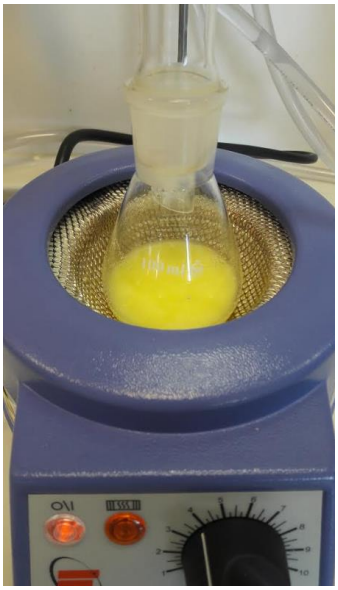
Filtrirati preko Büchnerovog lijevka i ostaviti da se dobro osuši. (Slika 2.34.)



Slika 2.34. Čisti kristali 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona (5).

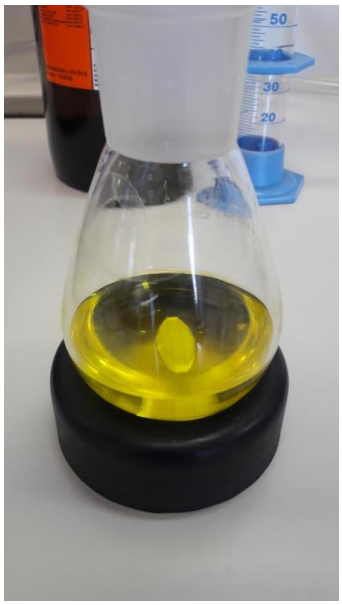
2.3.1 Supstitucija vodika - 1-brompropan

U tikvicu s okruglim dnom stavljeno je 0,5 g suhih kristala i 40 mL *N*,*N*-dimetilformamida (slika 2.35.).



Slika 2.35. Reakcija s *N*,*N*-dimetilformamidom.

Reakcijska smjesa je spojena na refluks dok se otopina ne razbistri (slika 2.36.).



Slika 2.36. Potpuno otopljeni kristali 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona u *N*,*N*-dimetilformamidu.

Nakon što se otopina razbistrila, ohlađena je do sobne temperature i dodano je 0,2 g NaH (0,008 mol, 50 %-tni NaH). Zatvoriti s $CaCl_2$ i miješati na magnetskoj miješalici 30 minuta. Dodati 0,46 mL propil-bromida, zatvoriti s $CaCl_2$ i ostaviti na magnetskoj miješalici preko noći (slika 2.37.).



Slika 2.37. Reakcijska smjesa na magnetskoj miješalici.

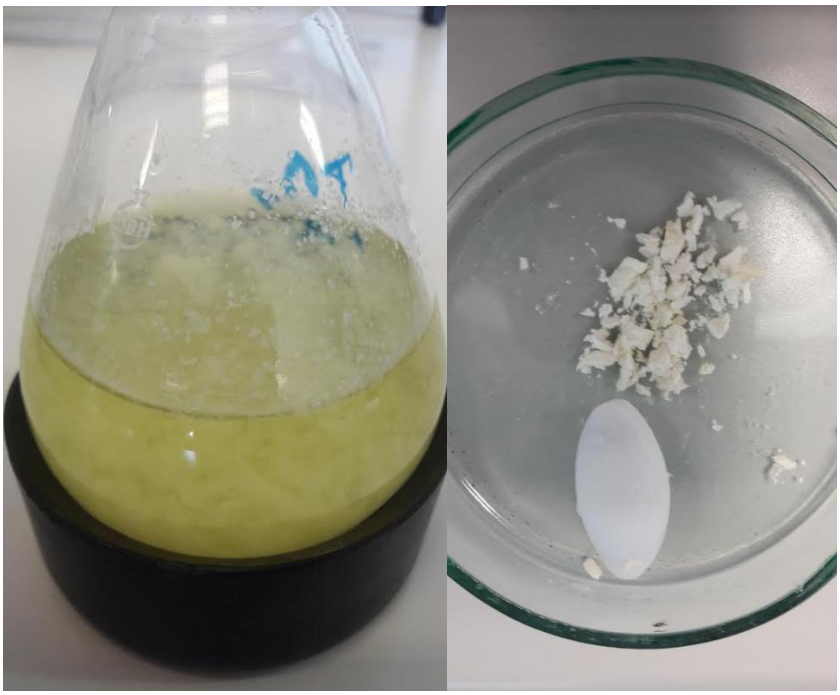
U veliku čašu uliti 75 mL destilirane vode i polako dodavati otopinu. Trebao bi nastati talog (slika 2.38.).



Slika 2.38. Destilirana voda i reakcijska smjesa.

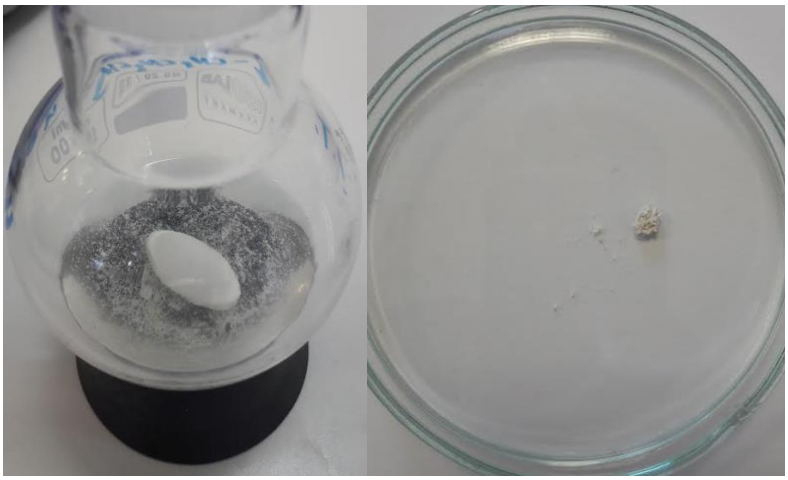
Talog filtrirati preko Büchnerovog lijevka i pustiti da se osuši, a filtrat ostaviti u hladnjaku do idućeg dana. Temperatura taljenja je bila ispod 100 °C što ukazuje na veliki

udio nečistoća. U hladnjaku je došlo do precipitacije. Preostali talog filtrirati (Slika 2.39.), a filtrat upariti na RVU i ostaviti u hladnjaku. Slijedi prekristalizacija iz etanola na refluksu uz miješanje. U što manjoj količini etanola otopiti talog i staviti na refluks.



Slika 2.39. Precipitacija iz hladnjaka i filtrirani talog.

Kada se otopina razbistri, skinuti s refluksa i ostaviti u hladnjaku. Nakon 24 sata u hladnjaku vidljivi su sitni bijeli kristali (slika 2.39.). Filtrirati preko Büchnerovog lijevka. Kristale dobro osušiti i spremni su za analizu (slika 2.40.).



Slika 2.40. Propilni derivat 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.

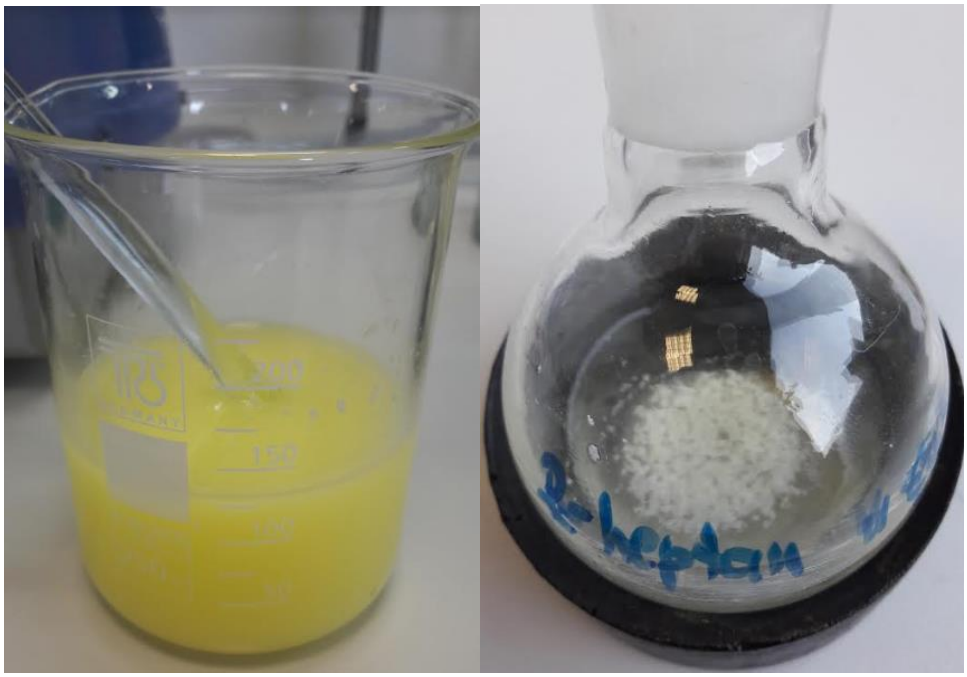
2.3.2 Supstitucija vodika - 1-bromheptan

U tikvicu s okruglim dnom dodano je 0,5 g suhih kristala i 40 mL *N*,*N*-dimetilformamida. Smjesa je stavljena na refluks i zagrijavana dok se sve ne otopi. Kada se sve otopi, pričekati da se otopina ohladi do sobne temperature, a zatim dodati 0,2 g NaH, zatvoriti s $CaCl_2$ i staviti na magnetsku miješalicu 30 minuta. Nakon toga, dodati 1-bromheptan (0,78 mL). Sve opet zatvoriti s $CaCl_2$ i ostaviti na magnetskoj miješalici do jutra (slika 2.41.).



Slika 2.41. Tikvica s reakcijskom smjesom prije dodavanja NaH.

U veliku čašu dodati 75 mL destilirane vode i polako, uz miješanje, dodavati reakcijsku otopinu iz prethodnog koraka. Dolazi do stvaranja taloga. Talog filtrirati preko Büchnerovog lijevka i staviti na sušenje, a filtrat upariti na RVU i ostaviti u hladnjaku do idućeg dana kako bi došlo do precipitacije. Nakon 24 sata u hladnjaku, došlo je do precipitacije. Kristale filtrirati i ostaviti na sušenju. Idući korak je prekristalizacija iz etanola. Kristale otopiti u što manjoj količini etanola i staviti na refluks dok se otopina ne razbistri. Kada se otopina razbistri, skinuti s refluksa i pustiti da se otopina ohladi. Prekristalizacija je bila uspješna (Slika 2.42.), kristali su se istaložili i za pretpostaviti da je funkcijska skupina uspješno zamijenjena. Kristale filtrirati i osušiti te na kraju analizirati.



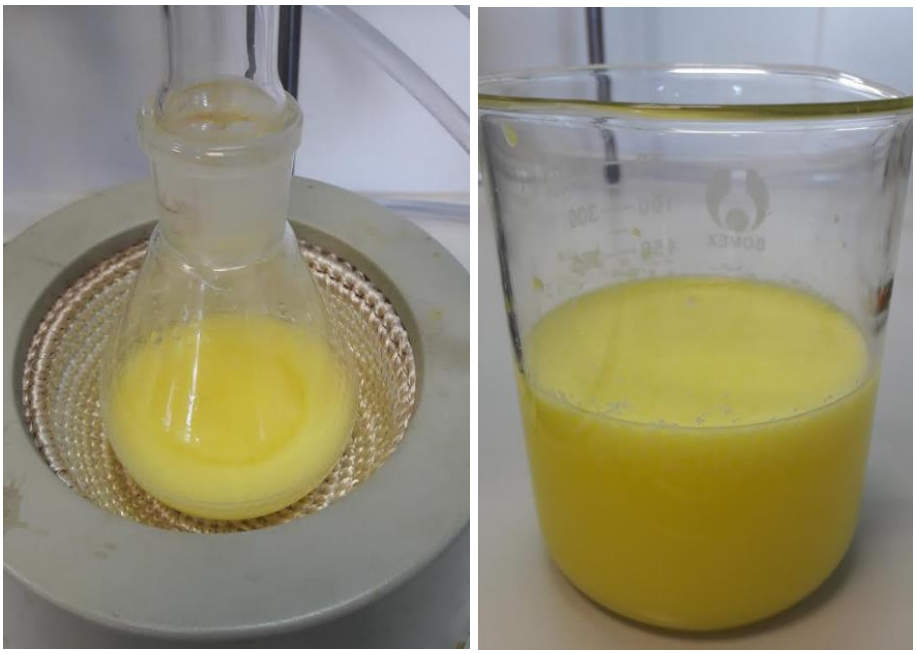
Slika 2.42. Na slici je prikazan postupak dodavanja reakcijske smjese u destiliranu vodu, te prekristalizirani kristali heptilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.

2.3.3 Supstitucija vodika - Izopropil-bromid

Izopropilni derivat 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona je sintetiziran na isti način kao prethodna dva derivata.

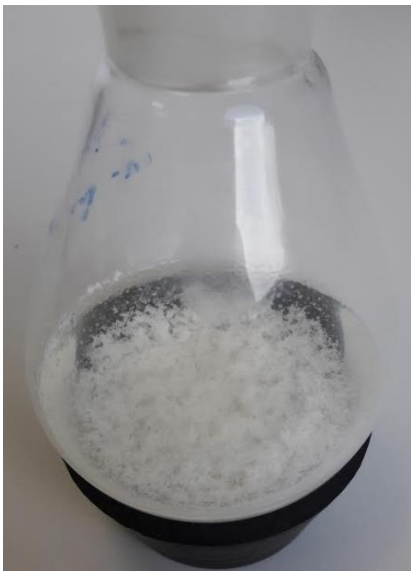
2.3.4 Supstitucija vodika – 1-brompropan - polazni spoj – standard

Postupak je isti kao i kod prethodnih spojeva, samo je količina dvostruko veća. Izvagati 1,0 g polaznog spoja (standard), staviti u tikvicu s okruglim dnom i dodati 80 mL *N*,*N*-dimetilformamida. Sastaviti refluks i refluksirati dok se sve ne otopi. (slika 2.43.) Ohladiti otopinu do sobne temperature i dodati 0,4 g NaH. Sve zatvoriti s $CaCl_2$ i staviti na magnetsku miješalicu. Nakon 30 minuta miješanja dodati 1mL propilbromida. Sve opet zatvoriti s $CaCl_2$ i ostaviti na magnetskoj miješalici do jutra.



Slika 2.43. Slika prikazuje reakcijsku smjesu na refluksu i reakcijsku smjesu nakon refluksa dodanu u destiliranu vodu.

U veliku čašu uliti 150 mL destilirane vode i polako, uz miješanje, dodavati otopinu. U ovom slučaju, za razliku od prethodnog, je nastalo puno više taloga. Za pretpostaviti je da je početni spoj koji je sinetiziran u laboratoriju znatno onečišćen. Filtrirati preko Büchnerovog lijevka, kristale staviti na sušenje, a filtrat upariti na RVU i ostaviti u hladnjaku. U hladnjaku je došlo do precipitacije, filtrirati kristale i nakon što se osuše, slijedi prekristalizacija iz etanola (slika 2.44.).



Slika 2.44. Prekristalizacija iz etanola; čisti propilni derivat 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona

2.4 EKSTRAKCIJA GLUKOZINOLATA

2.4.1 BILJNI MATERIJAL

U ovom diplomskom korišten je biljni materijal *L. latifolium* iz sadržaja kapsula „*Plante de Maylis*“ proizvedenih od strane opata u opatiji „*Notre Dame de Maylis*“, smještene na sjeverozapadu Francuske.
Sjeme *M. incane* samljeveno je i prosijano kroz sito (500 mikrona) te pripremljeno za izolaciju glukozinolata.

2.4.2. POSTUPAK IZOLACIJE GLUKOZIONALATA

Protokol za izolaciju glukozinolata korišten u ovom radu je identičan onom u diplomskom radu Dine Vlajčević pod nazivom *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata.*[4]

1. Priprema otopina potrebnih za ekstrakciju

    - 70 %-tni etanol: za pripremu 500 mL 70 %-og etanola pomiješano je 350 mL etanola i 150 mL ultračiste vode,
    - natrijev acetat (NaOAc, 20 mM, pH = 5,5): 0,8259 g NaOAc otopljeno je u 500 mL ultračiste vode, početna pH vrijednost bila je 7,9; pH je podešen na 5,5 dodatkom klorovodične kiseline (HCl, 25 %) uz miješanje na magnetskoj miješalici, otopina je do upotrebe čuvana u hladnjaku,
    - dekstran: 10,0125 g dekstrana (DEAE-Sephadex A-25 chlorideform) otopljeno je u 125 mL ultračiste vode, pripremljeni gel je čuvan u hladnjaku na 4 °C.

2. Priprema otopine sulfataze

    - 5000 U sulfataze (iz *Helix pomatia*, tip H-1) otopljeno je u 30 mL ultračiste vode uz dodatak 30 mL apsolutnog etanola te miješanje na magnetskoj miješalici (10-15 minuta, 520 okr/min),

- dobivena otopina je podijeljena u 2 kivete i podvrgnuta centrifugiranju na 4500 okr/min i pri sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta, u slučajevima kad su se nakon centrifugiranja pojavile čestice tada je otopina dodatno centrifugirana 5 minuta pri istim uvjetima
- nakon centrifugiranja, supernatant je prebačen u čistu čašu i pomiješan s 90 mL apsolutnog etanola,
- dobivena otopina je prebačena u 2 kivete i stavljena na centrifugu u trajanju od 15 minuta na 2500 okr/min pri sobnoj temperaturi,
- nakon drugog centrifugiranja supernatant je odbačen, a preostali dio otopljen u 25 mL ultračiste vode,
- dobivena otopina je "vorteksirana" i podijeljena u manje Eppendorf tube te čuvana u zamrzivaču na -20 °C.

3. Priprema referentnih uzoraka sinigrina

- pripravljenih 5 referentnih uzoraka sinigrina (Tablica 2.3.) korišteno je za izradu baždarne krivulje, a dvije veće koncentracije (271,25 i 542,50 µM) su korištene za simulaciju probave

Tablica 2.3. Priprava referentnih uzoraka te konačne koncentracije sinigrina.

	STOCK	**V_{STOCK} / µL**	**V_{H20} / µL**	**c / µM**
S1	5,17 mM	25	975	54,25
S2		75	925	162,75
S3		125	875	271,25
S4		250	750	542,50
S5		300	700	651

4. Ekstrakcija glukozinolata

- izvagani biljni materijal (odvage oko 100 mg) prebačen je u označene reakcijske tube s okruglim dnom
- u svaku reakcijsku tubu dodan je 1 mL 70 %-og etanola nakon čega je smjesa vorteksirana, a nakon toga su na tube stavljane sigurnosne kapice te su prebačene u vruću vodenu kupelj (90 °C) nekih 5 minuta tj. do početka vrenja etanola
- dalje su tube s uzorcima prebačene na ultrazvučnu kupelj (15 minuta) i nakon toga su centrifugirani na 2700 okr/min u trajanju od 10 minuta
- nakon centrifugiranja supernatant je odvojen (posebno paziti da nastavak za pipetiranje ne dođe u kontakt s biljnim materijalom) i pripremljen za simulaciju probave

5. Probava

Sinigrin

Uzorci čistog sinigrina koncentracija 271,25 i 542,50 µM podvrgnuti su simulaciji probave na način da se alikvotu od 1 mL podesio pH na 2,5 što predstavlja uvjete u želucu (dodatkom 70 µL 0,5 M HCl) i na pH 7,5 kao uvjeti u dvanaesniku (lat. *duodenum*) dodatkom 5 µL 1 M NaOH. U dodatna dva uzorka spomenutih koncentracija dodani su žučani, odnosno crijevni sokovi iz pacijenata donatora sakupljenih u Kliničkom-bolničkom centru Split. Dodano je 400 µL žučanog te 1 mL crijevnog soka u drugi uzorak te su nadopunjeni vodom do 2 mL. Konačne koncentracije sinigrina dane su u tablici 2.4.

L. latifolium i *M. incana*

Uzet je alikvot od 650 µL ekstrakta *L. latifolium*-a te je kao i za sinigrin, pH podešen na 2,5 dodatkom 3 µL 0,5 M HCl, odnosno 10 µL NaOH za pH 7,5. Ostalim uzorcima dodani su žučani (260 µL) i crijevni (650 µL) sokovi te sve nadopunjeno etanolom do 1,5 mL. Postupak je ponovljen i za etanolni ekstrakt sjemena *M. incane*.

Tablica 2.4. Konačne koncentracije sinigrina

	Sinigrin 271,25 µM	Sinigrin 542,50 µM	Sinigrin u *L. latifolium* (6.37 µmola/g suhog materijala)
pH 2.5	378,32 µM	739,54 µM	17,47 µmola/g
želudac	478,68 µM	713,72 µM	17,13 µmola/g
pH 7.5	271,96 µM	231,03 µM	12,33 µmola/g
Dvanaesnik	234,97 µM	540,5 µM	7,73 µmola/g



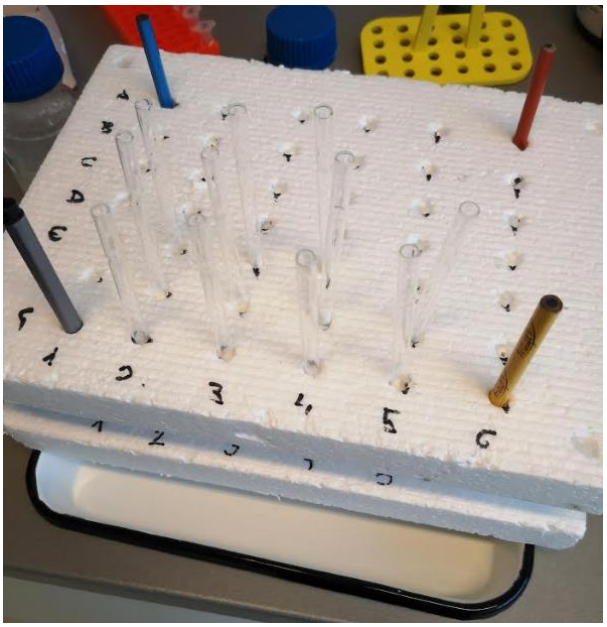
Slika 2.45 Uzorci nakon simulacije probave

Nakon obrade uzoraka, potrebno je bilo pripremiti ih za analizu na HPLC-u što podrazumijeva proces desulfatacije u svrhu pročišćavanja.

6. Desulfatacija uzoraka nakon probave

- filtar papir je smljeven u mlincu
- staklene pipete, koje služe kao kolone, napunjene su pripremljenim filtar papirom u visini od 1 cm, materijal je zbijen kako ne bi došlo do istjecanja gela. Tako pripremljene pipete postavljene su na stalak ispod kojeg se nalazi posuda za sakupljanje otpada prilikom ispiranja kolona (Slika 2.46.),

- dekstran je potrebno neposredno prije upotrebe izvaditi na sobnu temperaturu i protresti prije punjenja kolona gdje predstavlja stacionarnu fazu,
- u svaku kolonu otpipetira se 0,5 mL dekstrana te se pazilo da se kolone kod kojih je došlo do istjecanja gela zamijenje novima,
- u svaku kolonu još je dodan po 1 mL ultračiste vode,
- 2-mL tube za ekstrakte potrebno je prethodno označiti,



Slika 2.46. Kolone za desulfataciju glukozinolata.

- ispiranje kolona; prvo se doda 2 puta po 1 mL 70 %-og etanola kako bi se uklonile nepolarne molekule, zatim 1 mL ultračiste vode u svaku kolonu u svrhu ispiranja etanola i na kraju je u svaku kolonu dodano 2 puta po 1 mL 20 mM NaOAc kako bi se postigli optimalni uvjeti za djelovanje enzima sulfataze,
- nakon ispiranja kolona posuda za otpad zamijenjena je stalkom u kojem se nalaze označene tube za ekstrakte i iznad tog stalka postavljen je stalak s kolonama na način da svaka kolona odgovara oznaci na tubi,
- u svaku kolonu dodano je 20 µL otopine sulfataze koja je prethodno izvađena na sobnu temperaturu te još 50 µL NaOAc nakon čega su kolone prekrivene aluminijskom folijom i ostavljene preko noći,



Slika 2.47. Kolone s pripadajućim tubama za ekstrakte.

- sljedeći dan je u kolone dodano 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode kako bi desulfoglukozinolati eluirali s kolone,
- tako dobiveni uzorci te sinigrin prebačeni su u bočice za HPLC te do analize čuvani u zamrzivaču na -20 °C.



Slika 2.48. Uzorci nakon probave i desulfatacije.

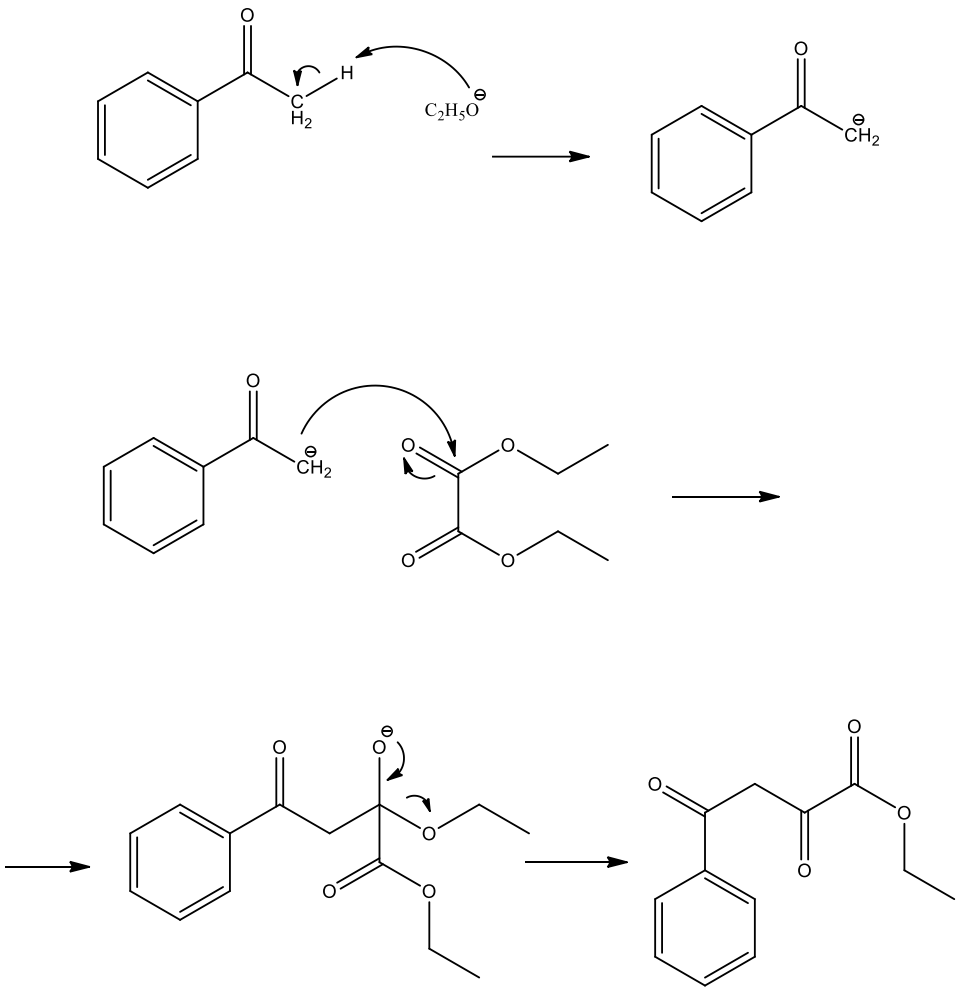
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1 Sinteza 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona

U ovom radu opisana je sinteza 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona i njegovih derivata zbog svoje potencijalno široke primjene u medicini. Cilj ovog rada bio je sintetizirati navedene spojeve reakcijama klasične sinteze.

Sinteza i spektroskopska analiza

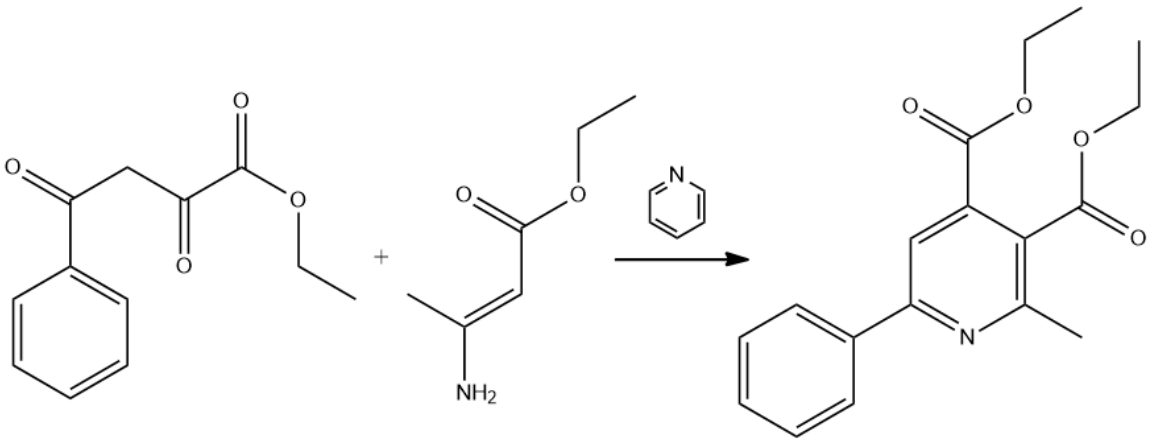
Sinteza 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona je provedena u 5 koraka. 1. korak je reakcija nukleofilne acilne supstitucije opisana mehanizmom na slici 3.1.



Slika 3.1. Mehanizam nukleofilne acilne supstitucije.

Cilj reakcije je dobivanje etil-2,4-diokso-4-fenil-butanoata reakcijom iz fenil-metil-etera i dietiloksalata uz dodatak natrijeva etoksida. Masa dobivenog produkta je 65,57 g, a iskorištenje reakcije 64 %.

2. korak reakcije je reakcija nukleofilne adicije etil-3-aminobut-2-enoata na etil-2,4-diokso-4-fenil-butanoat uz dodatak piridina pri čemu nastaje dietil-2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilat. (slika 3.2.)



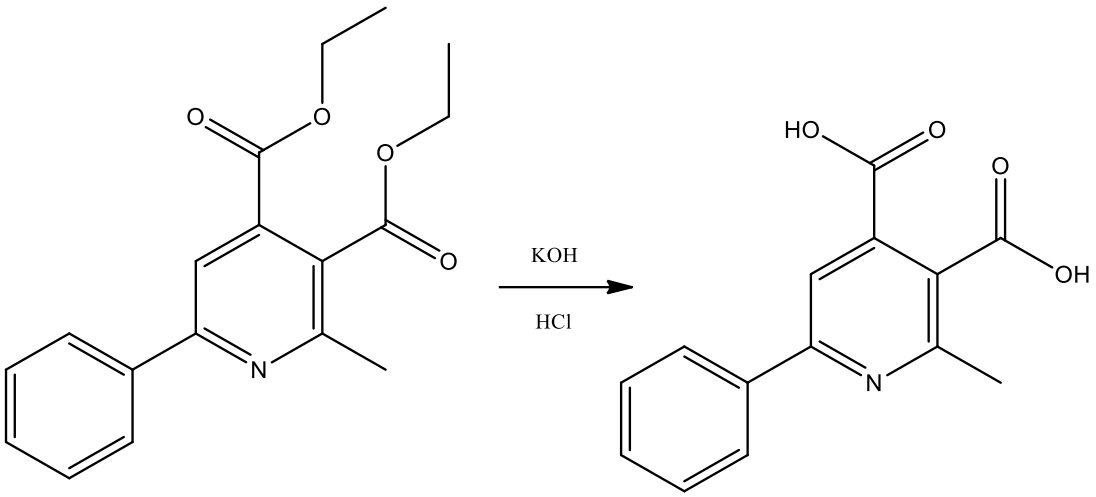
Slika 3.2. Reakcija adicije etil-3-aminobut-2-enoata na etil-2,4-diokso-4-fenil-butanoat uz dodatak piridina.

Predviđeno vrijeme reakcije na refluksu bilo je 1 sat, ali čak i nakon 3 sata refluksa i 24 sata stajanja na sobnoj temperaturi, TLC pločica je pokazivala kako je prisutno još dosta reaktanata. Reakcija je nastavljena bez obzira.

3. korak sinteze bila je hidroliza estera uz KOH. Hidrolizi se pristupilo na način da je za uklanjanje jedne esterske skupine potrebno dodati 1 mol lužine, odnosno za dvije esterske skupine 2 mola. Problem ovog koraka također je bilo vrijeme potrebno za sintezu. Teoretsko vrijeme sinteze je bilo znatno kraće od eksperimentalnog, ali problem su bile i nečistoće, odnosno reaktanti zaostali iz prošle reakcije, najviše piridin koji je uvelike smetao prilikom provjere pH nakon zakiseljavanja otopine.

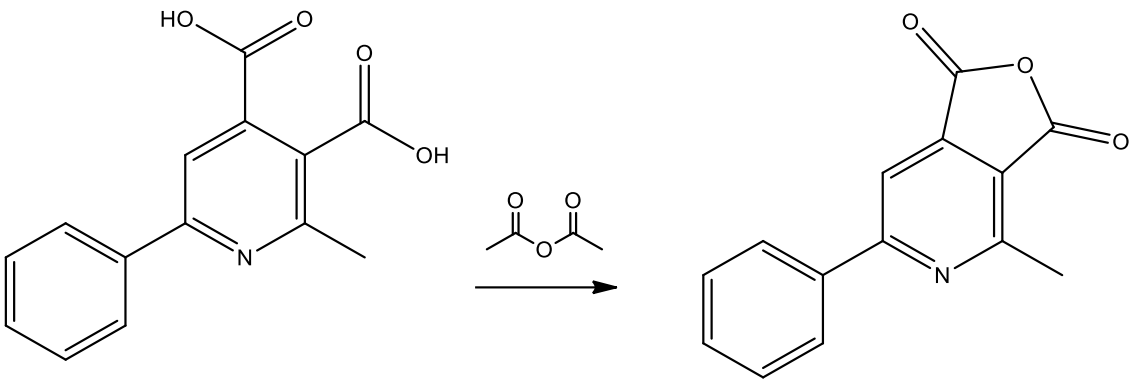
Dietil-2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilat dobiven ovom reakcijom je svijetložute boje. Nakon prekristalizacije talog je bijele boje, vrlo je visoke čistoće (T_t=213-214 °C; razlikuje se samo za 1 °C), ali vrlo malog prinosa, tek nešto iznad 30 %

(31,5 %). Razlog malog iskorištenja je upravo veliki udio reaktanata zaostalih iz prethodne reakcije i nemogućnost sigurne provjere pH vrijednosti otopine lakmus papirom.



Slika 3.3. Hidroliza estera.

4. korak sinteze je reakcija između dietil-2-metil-6-fenil-piridin-3,4-dikarboksilata i acetanhidrida (slika 3.4.) u kojoj dolazi do formiranja još jednog, peteročlanog prstena. Reakcija je vrlo kratka, oko 1h, te ju karakterizira nekoliko promjena boje kroz različite stupnjeve reakcije. Otopina je mliječno bijele boje prije refluksiranja, prilikom refluksiranja otopina postaje prozirno-žute boje, neposredno nakon skidanja s refluksa otopina poprima žuto-smeđu boju, a nakon što se ohladila otopina više nije prozirna i bijelo-žute je boje. Kristali su prekristalizirani, a prinos ove reakcije bio je izvrsnih 78 %.



Slika 3.4. Sinteza 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona.

Zadnji korak sinteze je reakcija između 4-metil-6-fenil-furo[3,4-*c*]piridin-1,3-diona i hidrazina u etanolu s ciljem nastajanja traženog produkta 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona. Reakcijom dolazi do pucanja peteročlanog prstena u svrhu nastanka piridopiridazinske jezgre. Kristali dobiveni reakcijom se prekristaliziraju iz metanola. Prinos reakcije je 50,4 %.

Spoj je potvrđen na IR spektrofotometru i na ^{1}H i ^{13}C NMR-u. (svi ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR i IR spektri se nalaze u poglavlju 6. Prilozi od 6.1. - 6.11.

U ^{1}H-NMR spektru na 3,1 ppm vidi se pik koji odgovara CH_3 skupini iz molekule. Pikovi na 7,5 ppm odgovaraju 4 vodika, jednom iz piridopiridazinskog prstena i 3 iz fenilne skupine. Preostala 2 vodika iz fenilne skupine nalaze se na nešto višoj vrijednosti, 8.4 ppm, dok se vodici iz amidne skupine iz nekog razloga ne vide.

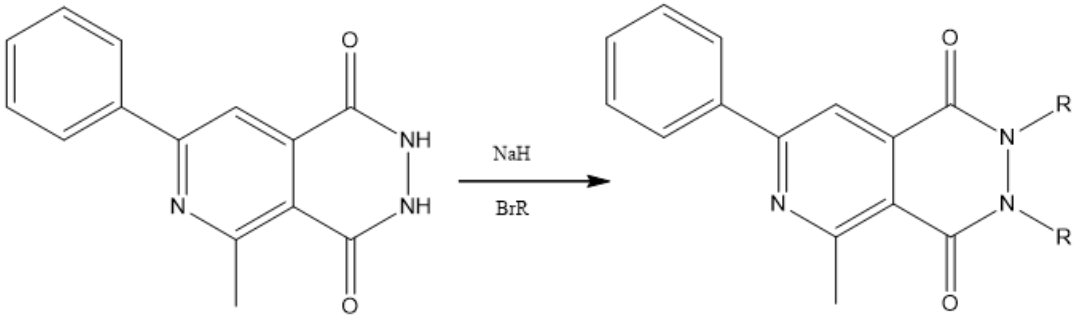
^{13}C-NMR pokazuje 12 signala koji odgovaraju 14 C atoma, jer su 4 C atoma iz fenilne skupine, oni u *orto* i *meta* položaju, zapravo jednaki.

Pikovi na 3290 i 3180 cm^{-1} u IR spektru ukazuju na N-H istezanja iz amidne skupine. Pik nešto iznad 3000 cm^{-1} odgovara $C(sp^2)$ - H(1s) iz benzenovog prstena, a pikovi od 2970 do 2870 cm^{-1} $C(sp^3)$ - H(1s) iz metilne skupine direktno vezane za prsten. Na 1650 cm^{-1} vidljiv je jasan pik koji odgovara karbonilnoj skupini amida, a nešto niža vrijednost od očekivane, rezultat je konjugacija kroz cijelu molekulu. "Šuma" pikova između 1600 - 1400 cm^{-1} odgovara $C(sp^2)=C(sp^2)$ vezama u aromatskim prstenovima. Pik na 1275 cm^{-1} pripada C-N vezi iz amida.

3.1.1 Sinteza derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona

3.1.1.1 Supstitucija vodika na dušiku propilnom skupinom

Pretpostavljena je reakcija supstitucije oba vodika na dušicima u molekuli 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona. Iz IR i NMR spektara uočava se da reakcija nije išla pretpostavljenim putem, već da se supstitucija vodika dogodila na oba dušika ali u dva različita produkta. Vodik u jednom produktu supstituiran je propilnom skupinom na gornjem N atomu, dok je vodik u drugom produktu supstituiran propilnom skupinom na donjem N atomu. Također, za pretpostaviti je da udio produkata nije jednak, jer na gornji N atom fenilna skupina ima veći utjecaj te bi on trebao lakše otpustiti proton, odnosno, supstitucija na njemu bi trebala biti lakša od drugog N atoma na koji fenilna skupina ipak nema takav utjecaj. Prinos reakcije bio je 43,7 %.



Slika 3.5. Reakcija supstitucije vodika (R = -$CH_2CH_2CH_3$).

3.1.1.1.1 Supstitucija vodika na dušiku propilnom skupinom – interpretacija spektara

Iz IR i ^{1}H-NMR jasno je vidljivo da oba vodika na dušiku nisu supstituirana, jer postoji signal koji indicira, u IR-u na oko 3300 cm^{-1} i u ^{1}H-NMR-u na 11,9 ppm, vodik vezan za dušik. Vodik direktno vezan za dušik je vidljiv u rasponu od 5 do 9 ppm, ali zbog velikog utjecaja fenilne skupine i konjugiranih dvostrukih veza nalazio bi se na višoj vrijednosti ppm, kao što je to i slučaj s dobivenim realnim spektrom.

Na oko 1 ppm vidljivi su pikovi koji odgovaraju CH_3 skupini iz propilne skupine. Kako je također vidljivo, cijepanje nije triplet već multiplet, a to indicira kako je supstitucija išla u 2 smjera, tj. u jednom slučaju je zamijenjen vodik na jednom dušiku, a u drugom slučaju drugi vodik kod drugog dušika, što bi objasnilo više uočenih spektara u ^{1}H-NMR koji se preklapaju.

Središnji CH_2 u propilnoj skupini koji se vidi na 1,9 ppm bi se cijepao na 6 odgovarajućih pikova, no zbog lošije rezolucije (300 MHz) isto se ne uočava, ali integracija govori da postoji više vodika nego što to odgovara CH_2 skupini. To predstavlja također potvrdu da je došlo do preklapanja CH_2 skupine iz 2 spoja, jednog koji odgovara jednoj, a drugog koji odgovara drugoj zamjeni vodika na dušiku.

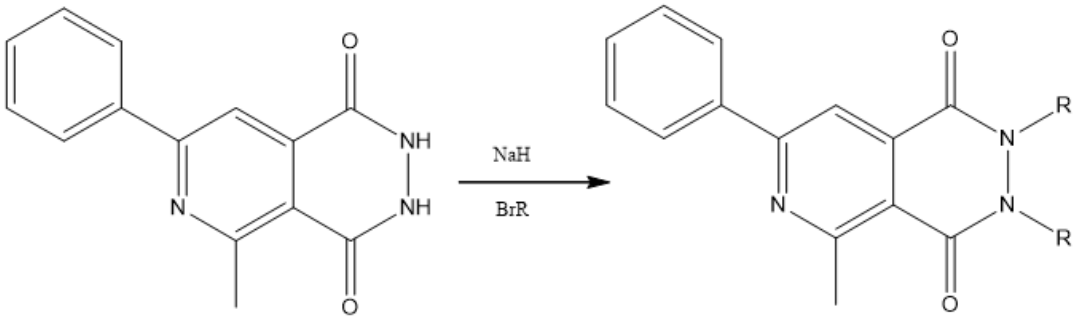
CH_2 skupina koja je vezana direktno na dušik je vidljiva na oko 4 ppm. Kako je za očekivati, propilna skupina koja je vezana na gornjem dušiku (4,2 ppm) zbog većeg utjecaja fenilne skupine je više odsjenjena nego u slučaju vezivanja za "donji" dušik (3,9 ppm).

^{13}C-NMR pokazuje, u području od 10 do 25 ppm, da postoje pikovi propilnih skupina koje potječu od 2 različita spoja s obzirom na supstituciju dušika.

Iz IR spektra, na 3300 cm^{-1} i 3170 cm^{-1} vidljivo je N-H istezanje koje odgovara sekundarnim amidima. Pik na 3020 cm^{-1} odgovara $C(sp^2)$ - H(1s) iz benzenovog prstena, a pikovi od 2970 - 2870 cm^{-1} $C(sp^3)$ - H(1s) iz metilne skupine direktno vezane za prsten i iz propilne skupine vezane na N u prstenu. Na 1660 cm^{-1} vidljiv je jasan pik koji odgovara karbonilnoj skupini koja je dio amida, a nešto niža vrijednost od očekivane, rezultat je konjugacija u cijeloj molekuli. Šuma pikova između 1600 - 1400 cm^{-1} odgovara $C(sp^2)=C(sp^2)$ vezama u aromatskim prstenovima. Pik na 1270 cm^{-1} pripada C-N vezi iz amida.

3.1.1.2 Supstitucija vodika na dušiku heptilnom skupinom

Postupak supstitucije heptilnom skupinom je isti kao i propilnom. Prinos ove reakcije se znatno razlikuje od prinosa supstitucije propilnom skupinom i iznosi samo 21,2 %.



Slika 3.6. Reakcija supstitucije vodika (R = -$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$).

3.1.1.2.1 Supstitucija vodika na dušiku heptilnom skupinom – interpretacija spektara

Iz ^{1}H-NMR spektra na 0,9 ppm se uočava pik koji odgovara CH_3 skupini vezanoj direktno za aromatski prsten. Pikovi od 1,1 do 1,6 ppm odgovaraju 4 CH_2 skupine koje slijede nakon CH_3 iz heptila. Redom peta CH_2 skupina se nalazi na 1,8 ppm i vidljiv je multiplet (5), dok je CH_2 skupina direktno vezana na dušik na 4,2 ppm i jasno je vidljiv triplet. Ova skupina je potvrda da je supstitucija uspješno provedena na gornjem dušiku koja je više odsjenjena radi većeg utjecaja fenilne skupine u odnosu na donji dušik gdje se na 3,9 ppm vidi mali signal vjerojatno od drugog spoja koji je suspstituiran, gdje je supstituiran donji dušik, ali u vrlo malom postotku. Potvrda da je supstituiran samo 1 dušik, a ne 2, vidi se na 12 ppm koji odgovara vodiku vezanom za dušik.

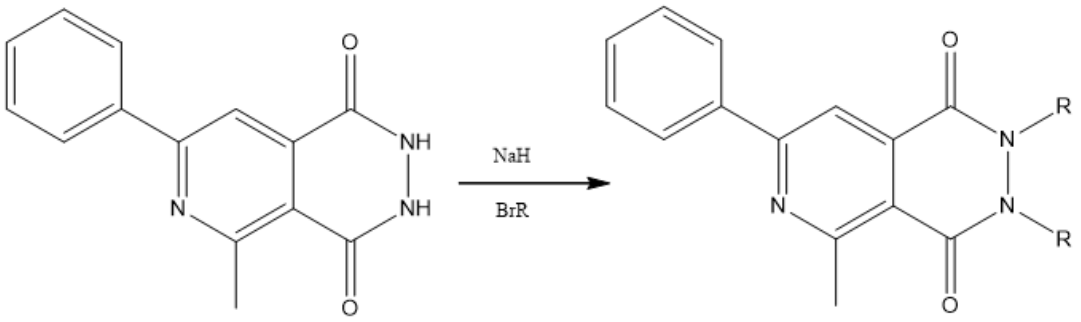
^{13}C-NMR, gdje se jasno vidi 7 signala između 14 i 32 ppm koji odgovaraju redom: 6 ugljika iz heptila i 1 ugljiku direktno vezanom na piridinski prsten, a ugljik iz heptilne skupine vezan direktno na dušik nalazi se na 67 ppm, potvrđuje pretpostavku da se radi o samo jednom monosupstituiranom spoju.

IR spektar, na 3300 cm^{-1} i 3170 cm^{-1}, pokazuje da je prisutna N-H skupina, što potvrđuje pretpostavku da je došlo samo do jedne zamjene jedne funkcijske skupine. Pik

na 3022 cm^{-1} odgovara $C(sp^2)$ - H(1s) iz benzenovog prstena, a veliki izraženi pikovi tek nešto ispod 3000 cm^{-1} odgovaraju $C(sp^3)$ - H(1s) iz metilne skupine direktno vezane za prsten i iz heptilne skupine vezane na N u prstenu. Pik na 1668 cm^{-1} pripada karbonilnoj skupini iz amida koja je na nešto nižim vrijednostima od očekivane radi velikog broja konjugacija. "Šuma" pikova između 1600 - 1400 cm^{-1} odgovara $C(sp^2)=C(sp^2)$ vezama u aromatskim prstenovima. Veliki pik na 1276 cm^{-1} pripada C-N vezi iz amida.

3.1.1.3 Supstitucija vodika na dušiku izopropilnom skupinom

Postupak supstitucije je isti kao u prethodna 2 slučaja. Iskorištenje reakcije je nešto bolje od supstitucije heptilnom skupinom i iznosi 37,7 %.



Slika 3.7. Reakcija supstitucije vodika (R = $-CH(CH_3)_2$).

3.1.1.3.1 Supstitucija vodika na dušiku izopropilnom skupinom – interpretacija spektara

^{1}H-NMR prikazuje pik na 12 ppm koji odgovara N-H, što govori da je i u ovom slučaju također supstituirana samo jedna skupina. Multiplet na 5,2 ppm odgovara C-H u izopropilu koji je vezan direktno na dušik. Pik na 3 ppm odgovara metilnoj skupini direktno vezanoj na aromatsku jezgru, a pikovi na 1,3 ppm odgovaraju dvije CH_3 skupine iz izopropilne skupine.

^{13}C-NMR potvrđuje da je i ovaj spoj monosupstituiran. U području do 30 ppm vidljiva su 3 signala, 2 singla odgovaraju dvjema CH_3 skupinama izopropilne skupine,

dok zadnji odgovara CH_3 skupini direktno vezanoj za aromatski prsten. Pik na 70 ppm odgovara CH skupini iz izopropilne vezanoj direktno za N.

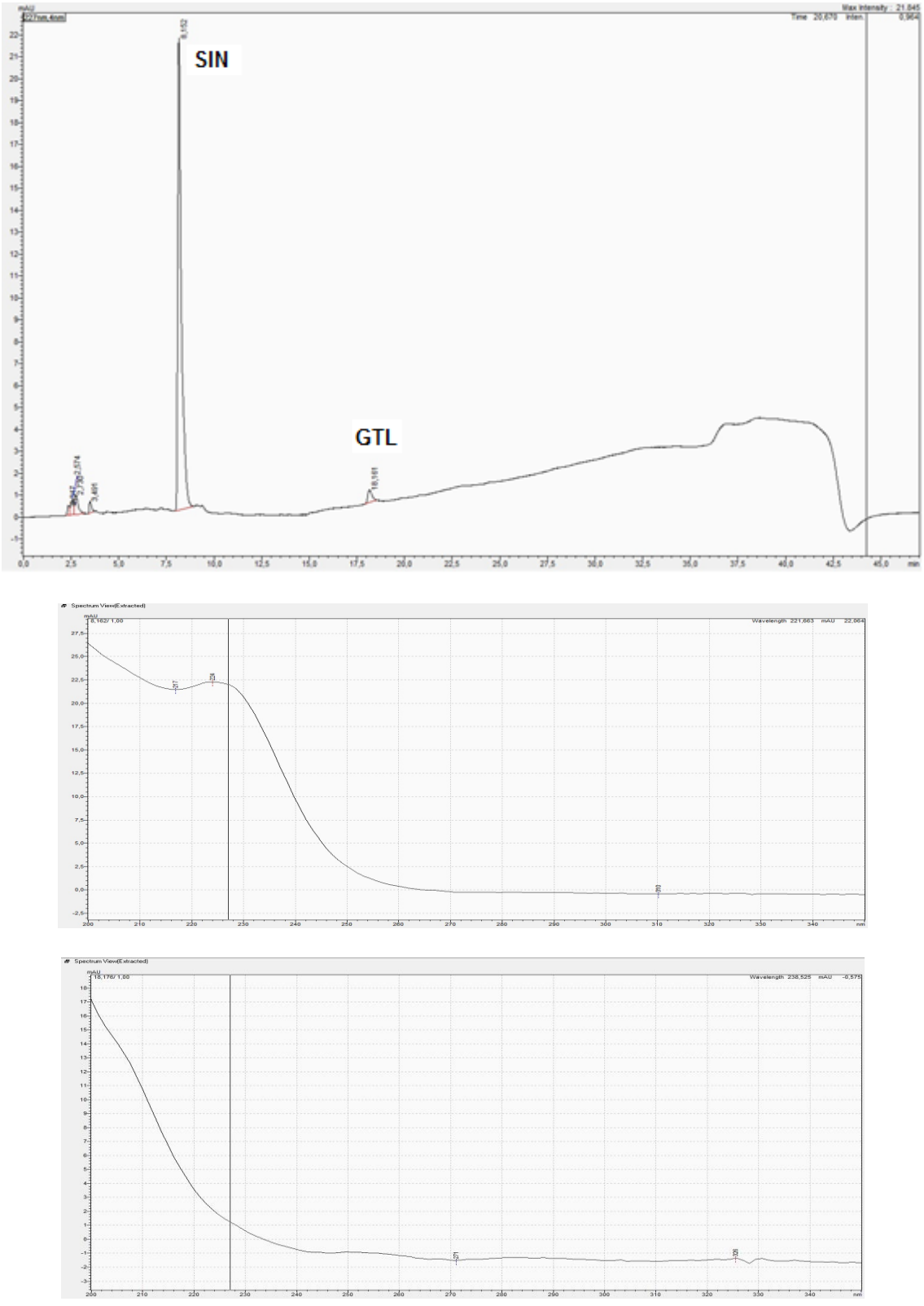
3.2 Glukozinolati: analiza i probava

Glukozinolati su jedinstvena i važna skupina sekundarnih metabolita u nekim vrstama biljaka zastupljenih u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Za prehranu ljudi najznačajnija je porodica Brassicaceae, čiji biološki učinak se često povezuje s nizom biološki aktivnih tvari (izotiocijanati, nitrili) koje nastaju tijekom razgradnje glukozinolata.

Glukozinolati se razlikuju prema varijabilnom aglukonskom dijelu (alifatski, arilaromatski, indolni) te prisutnom sadržaju u različitim biljnim organima te između pojedinih vrsta. U ovom dijelu diplomskog rada cilj je bio odrediti prisutne glukozinolate u lišću *Lepidium latifolium* i sjemenu *Mathiola incana* korištenjem HPLC-MS/MS-PDA tehnike. Izolirani glukozinolati te čisti sinigrin podvrgnuti su procesu dvofazne *in vitro* probave korištenjem ljudskih želučanih i crijevnih enzima. Dodatno je istražen i učinak pH vrijednosti (2.5 and 7.5) na stabilnost glukozinolata, a koji su karakteristični za želučanu tj. crijevnu probavu. Kvantifikacija istraživanih glukozinolata prije i poslije probave provedena je HPLC analizom desulfoglukozinolata i usporedbom s vanjskim standardom prop-2-enilglukozinolatom (desulfosinigrinom).

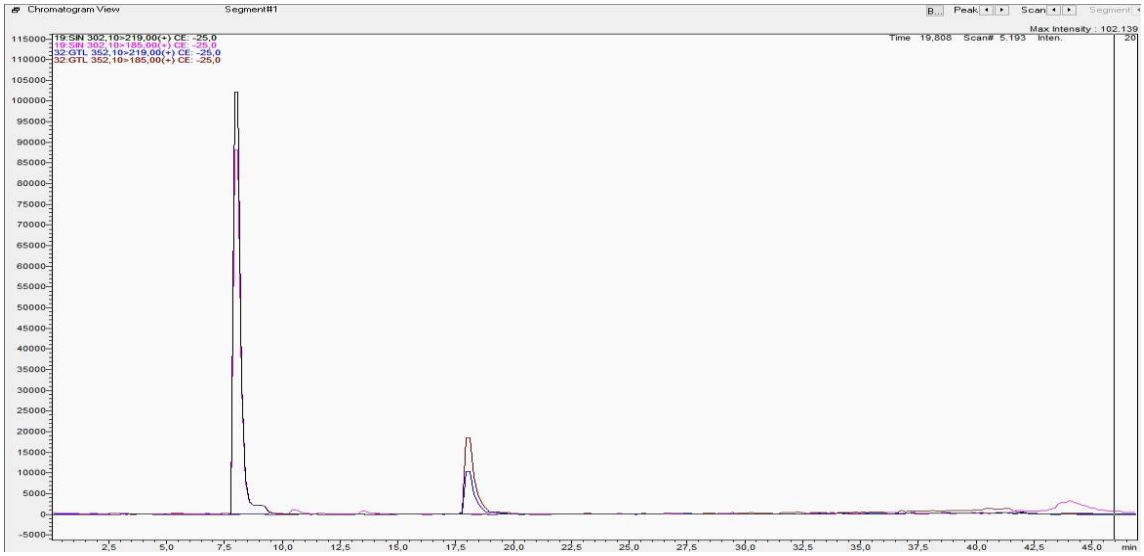
3.2.1 HPLC-MS/MS-PDA analiza glukozinolata *Lepidium latifolium*

Kao najzastupljeniji glukozinolat u biljnoj vrsti *Lepidium latifolium,* HPLC analizom identificiran je glukozinolat sinigrin. Sljedeći glukozinolat koji je identificiran je glukotropeolin, no u vrlo malim količinama. Desulfosinigrin ima vrijeme zadržavanja 7,7 minuta, dok glukotropeolin 18,5 minuta. Dobiveni HPLC kromatogram s karakterističnim UV/Vis spektrima pri 227 nm identificiranih glukozinolata prikazani su na slici 3.8.



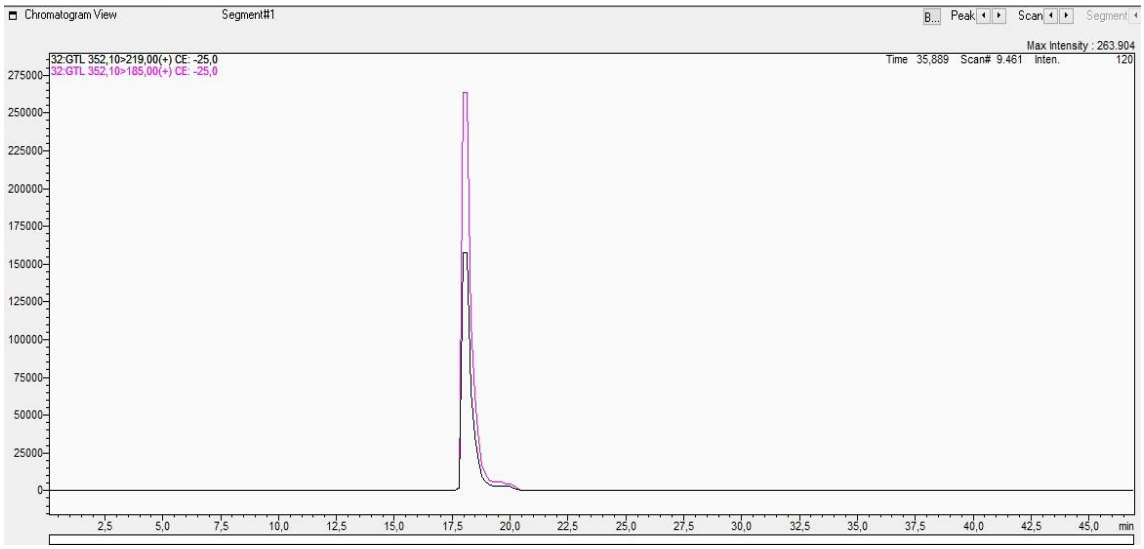
Slika 3.8. HPLC-PDA kromatogram i UV/Vis spektar desulfosinigrina (DS-SIN) te desulfoglukotropeolina (DS-GTL).

Sinigrin kao najzastupljeniji glukozinolat, potvrđen je i na MS/MS-u (Slika 3.9.) primjenom literaturno dostupnih MRM prijelaza za desulfoglukosingirn s vezanim natrijevim kationom (302,10 > 219; 185 m/z).



Slika 3.9. MRM prijelaz za desulfosinigrin s vezanim natrijevim kationom.

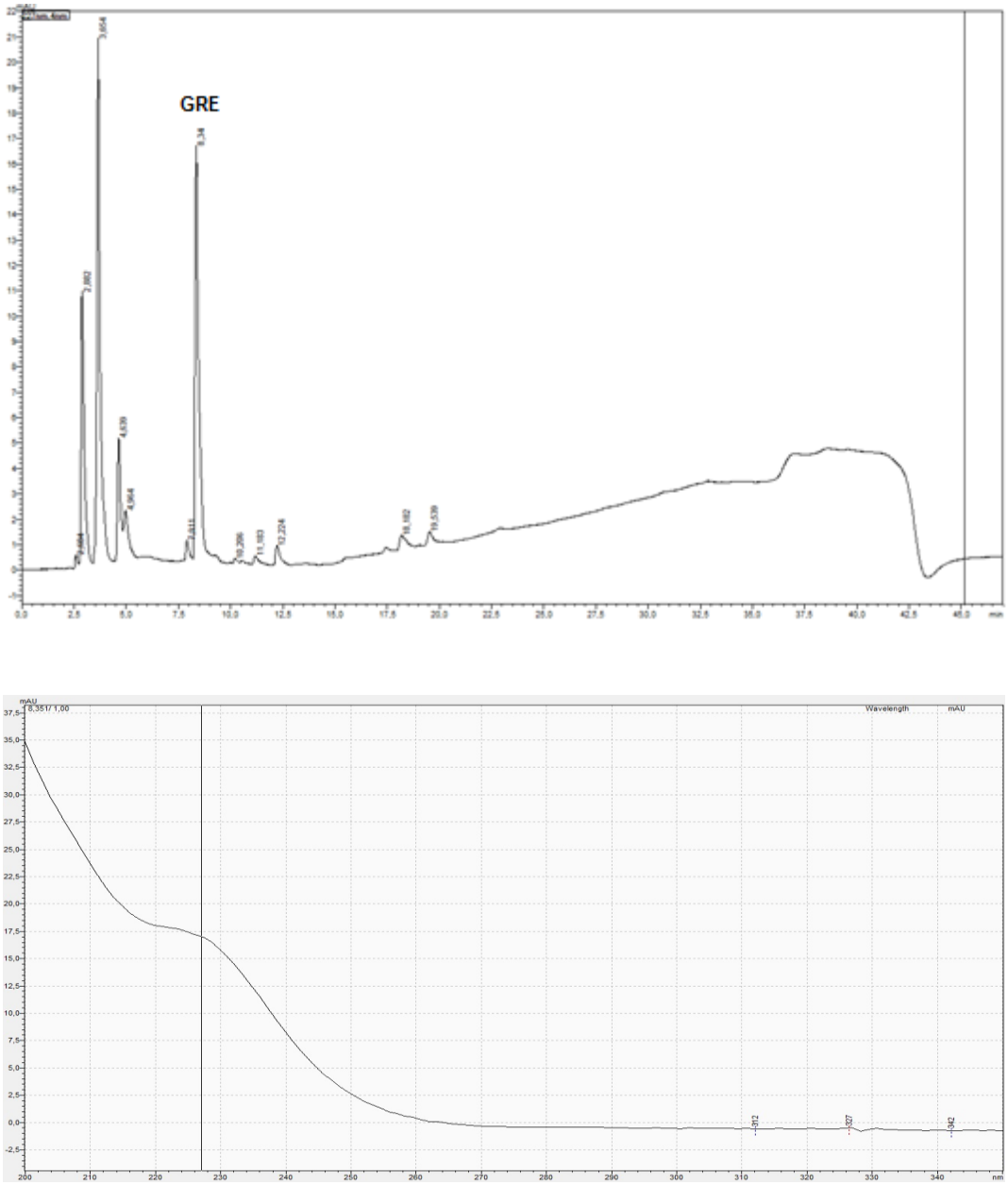
Glukotropeolin potvrđen je na MS/MS-u (Slika 3.10.) primjenom literaturno dostupnih MRM prijelaza za desulfoglukotropeolin s vezanim natrijevim kationom (352,10 > 219; 185 m/z).



Slika 3.10. PDA i MS/MS spektar desulfoglukotropaeolina.

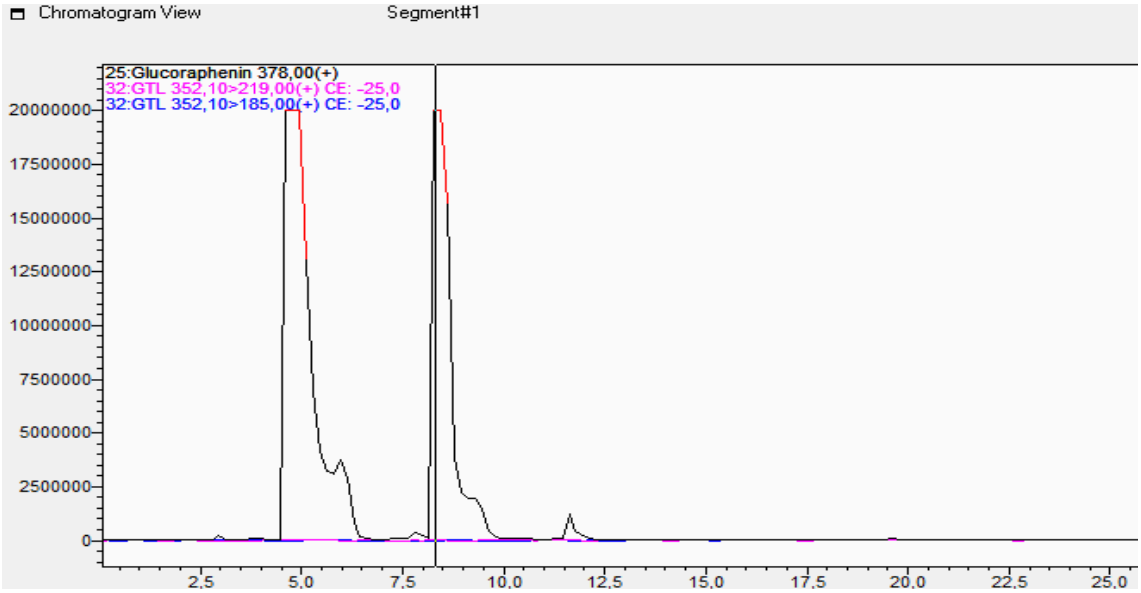
3.2.2 HPLC-MS/MS-PDA analiza glukozinolata *Matthiola incana*

Kao najzastupljeniji glukozinolat u biljnoj vrsti *Matthiola incana*, HPLC analizom identificiran je glukozinolat glukorafenin (GRE) pri 8,3 min. Dobiveni HPLC kromatogram s karakterističnim UV/Vis spektrom pri 227 nm identificiranih glukozinolata prikazani su na slici 3.11.



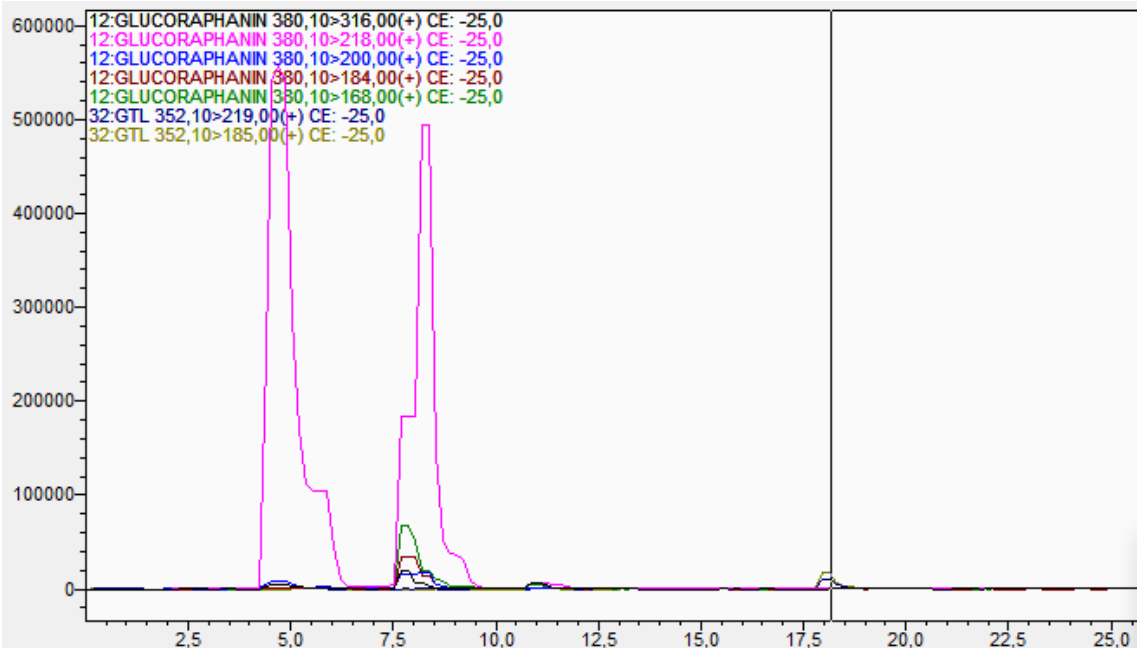
Slika 3.11. HPLC-PDA kromatogram i UV/Vis spektar desulfoglukorafenina (DS-GRE).

Glukorafenin kao najzastupljeniji glukozinolat, potvrđen je i na MS/MS-u (Slika 3.12.) primjenom praćenja odabranog iona (SIM-tehnika; engl. *selected ion monitoring*) koji odgovara desulfoglukorafeninu s vezanim natrijevim kationom (378,0 m/z).



Slika 3.12. MS desulfoglukorafenina s vezanim natrijevim kationom.

Osim glukorafenina MS/MS tehnikom na vremenu 8,1 min detektiran je i glukorafanin praćenjem MRM prijelaza (380 >316; 218; 200; 184; 168m/z).

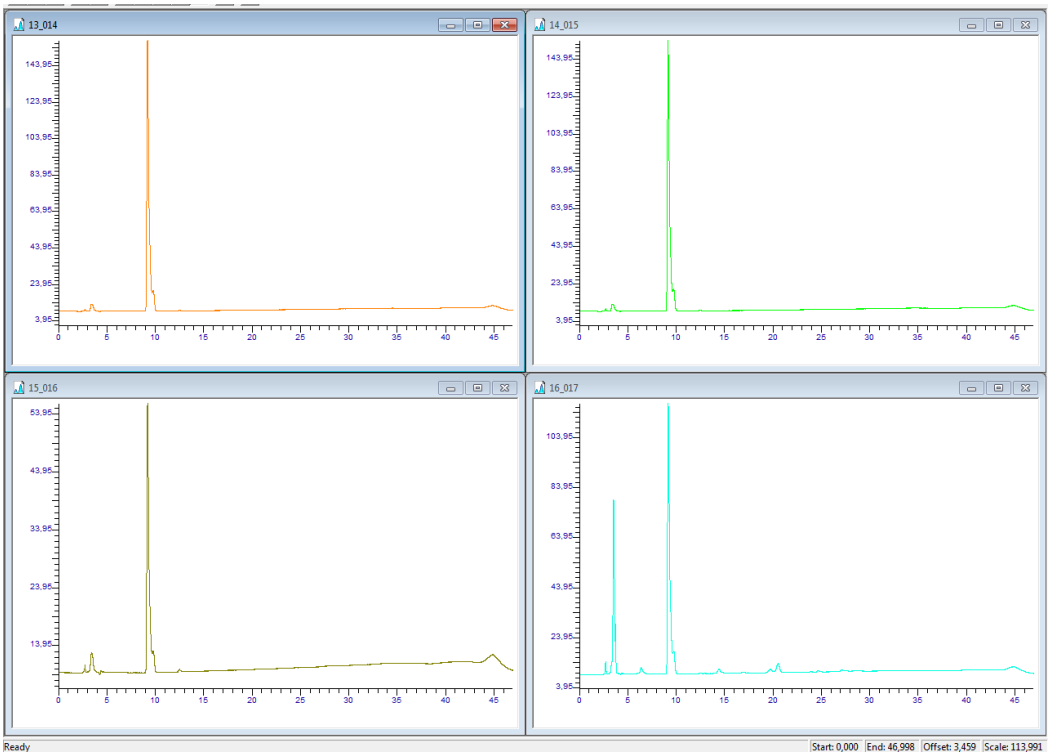


Slika 3.13. MRM prijelaz za desulfoglukorafanina s vezanim natrijevim kationom.

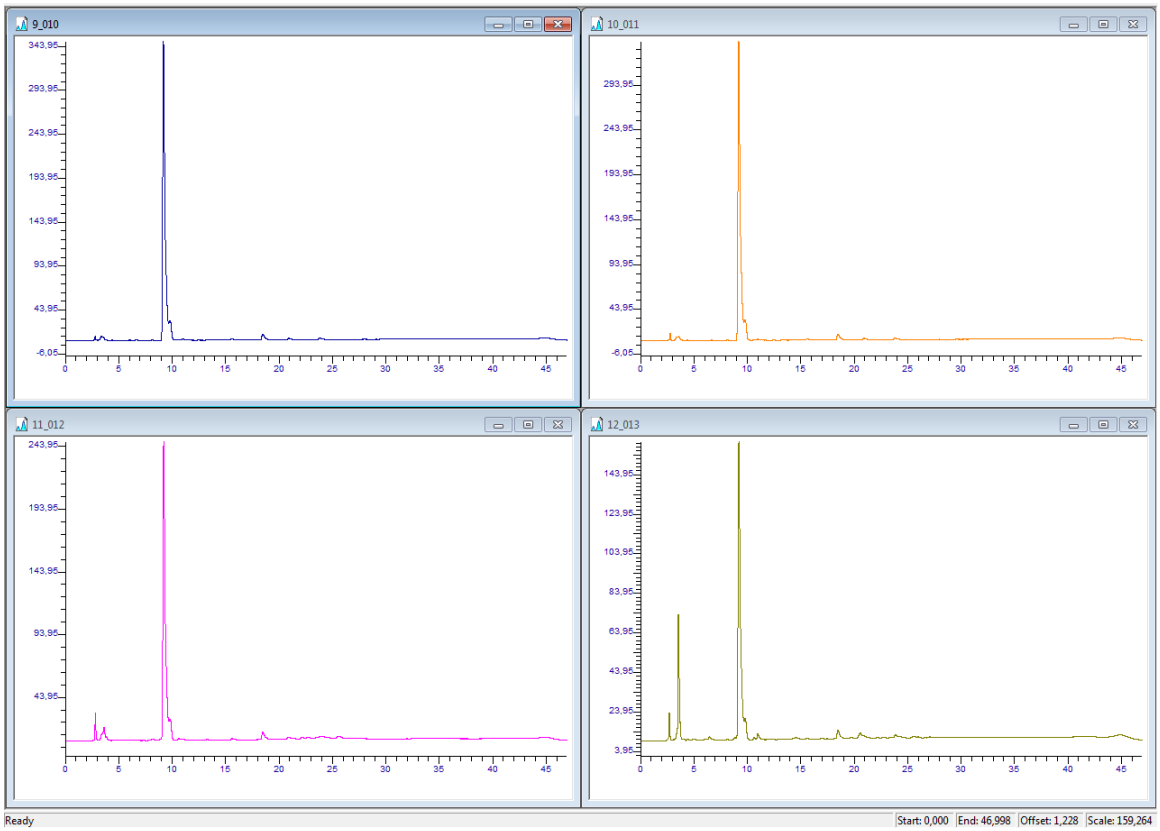
3.2.2.1 Kvantizacija glukozinolata i njihova stabilnost u uvjetima simulirane probave

3.2.2.1.1 Probava sinigrina i glukozinolata u *Lepidium latifoliumu*

Na slici 3.14. prikazani su kromatogrami dobiveni u uvjetima simulirane dvofazne probave sinigrina (standard) te na slici 3.15. sinigrina u realnom uzorku *L. latifolium*.



Slika 3.14. Kromatogrami sinigrina (standard) dobiveni u uvjetima simulirane dvofazne probave 542,50 μM (13-pH 2,5; 14-želudac; 15-pH 7,5; 16-crijevo).



Slika 3.15. Kromatogrami sinigrina (*L. latifolium*) dobiveni u uvjetima simulirane dvofazne probave

Lepidium latifolium L. - Probava – 6.37 µmola/g suhog materijala

Uzorak 9-pH 2,5, 650 µL + 35 µL HCl 0,5M;
Uzorak 10-želudac-650µL + 260 µL GAS;
Uzorak 11-pH 7,5 650 µL + 10 µL NaOH 1M;
Uzorak 12-crijevo – 650 µL DUO) – nadopuna s EtOH do 1,5 mL ukupnog volumena

Temeljem navedenog preko vanjskog standarda sinigrina analizom desulfosinigrina utvrđen je sadržaj nakon promatranih uvjeta te je u tablici 3.1. izračunata stabilnost (%) koja predstavlja zaostali sinigrin.

Tablica 3.1. Stabilnost (%) zaostalog sinigrina

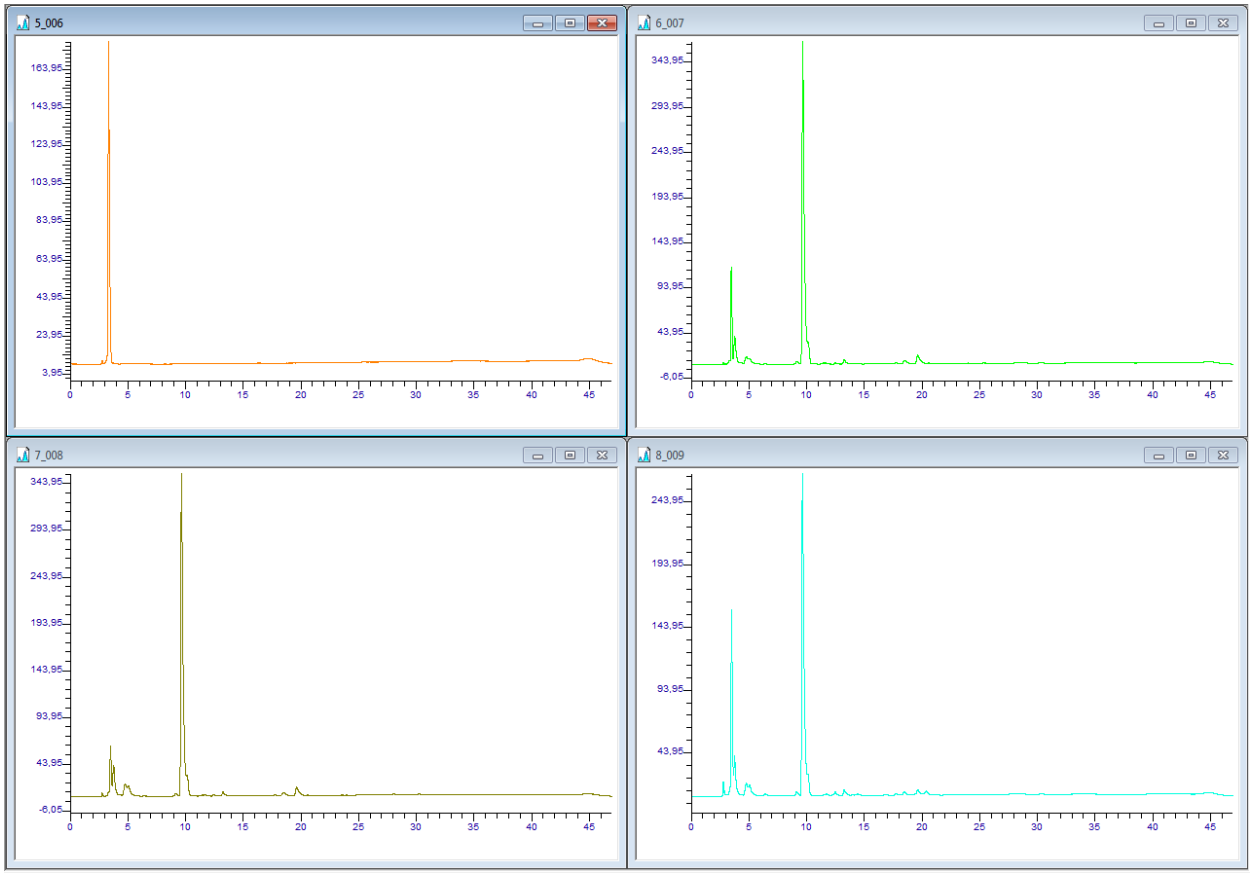
	pH 2,5	Želudac	pH 7,5	Crijevo
Sinigrin 542,50 μM	739,54 μM	713,72 μM	231,03 μM	540,5 μM
Stabilnost (%) *	100,00	96,5	31,2	73,1
Sinigrin u *L. latifolium* 6,37 μmola/g suhog materijala	17,47 μmola/g	17,13 μmola/g	12,33 μmola/g	7,73 μmola/g
Stabilnost (%) **	100,0	98,1	70,6	44,4

* Stabilnost sinigrina procijenjena na temelju najveće koncentracije – 739,54 μM

** Stabilnost sinigrina procijenjena na temelju najveće koncentracije – 17,47 μmola/g

Na slici 3.14. je prikazana probava pripremljene koncentracije sinigrina (542,5 μM), a na slici 3.15. sinigrina u *L. latifolium* (6,37 μmola/g suhog materijala). Procjena je napravljena temeljem najveće koncentracije (739,45 μM). Ono što se uočava u kromatogramu je pojava novih pikova kod crijevne probave, dok to nije slučaj kod želučane faze te su koncentracije sinigrina nakon crijevne probave značajno manje od želučane probave. Sve ukazuje da je crijevna probava prisutna. Moguće je da u kiseloj fazi također dolazi do razgradnje u hlapljive spojeve koji se neće detektirati HPLC analizom, već bi se isto uočilo smanjenjem same koncentracije sinigrina. Također, probavu čistog sinigrina bilo bi dobro ponoviti, ali na nižoj koncentraciji (slično onoj u realnom uzorku) kako bi bila bolje usporediva s onom u realnom uzorku.

3.2.2.1.2 Probava glukorafenina u *Matthiola incana* (L.) R.Br.



Slika 3.16. Kromatogrami glukorafenina (*M. incana*) dobiveni u uvjetima simulirane dvofazne probave

Tablica 3.2. Stabilnost zaostalog glukorafenina

	pH 2,5	Želudac	pH 7,5	Crijevo
Glukorafenin u *M. incana* 11,34 µmola/g suhog materijala	0 µmola/g	13,58 µmola/g	13,19 µmola/g	10,27 µmola/g
Stabilnost (%) *	0,00	100,00	7,12	75,62

* Stabilnost glukorafenina procijenjena na temelju najveće koncentracije – 13,58 µM

Uočava se nestanak glukorafenina (t=8,5 min) kod kisele faze, dok se isto nije dogodilo kod želučane faze, što je neobično pa bi ovo ispitivanje trebalo ponoviti kako bi

bili sigurni u rezultate. Također, kao i u slučaju sinigrina, tj. kod *L. latifolium,* najmanja koncentracija glukorafenina je kod crijevne probave, pa se može zaključiti da je tu prisutna nestabilnost glukorafenina.

4. ZAKLJUČAK

Sintetizirana su 3 nova derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona, koji su potencijalno biološki aktivni.

Uspješno su izvedeni svi koraci sinteze koji su prethodili reakcijama supstitucije vodika na 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-dionu.

Infracrvena spektroskopija i nuklearna magnetska rezonancija potvrdile su strukturu svih sintetiziranih derivata što govori da su se pretpostavljene reakcije zaista odvile.

Iz podataka sa spektara, za pretpostaviti je da je supstitucija lakša na "gornjem" dušiku, koji pod utjecajem fenilne skupine lakše otpušta proton pa se u tom slučaju lakše supstituira.

Iskorištenja reakcija imaju niske vrijednosti što je možda rezultat nedovoljnog pročišćavanja međuprodukata, ali i nastanak nusprodukata.

U budućnosti treba težiti boljim metodama pročišćavanja (preparativna kromatografija), ali i potvrdi dobivenih međuprodukata spektrometrijskim tehnikama

Za pretpostaviti je da je sinigrin stabilan u kiseloj i želučanoj fazi. Početna koncentracija je stoga 739,54 μM te je kod crijevne faze došlo do smanjenja za oko 230 μM.

Također je za pretpostaviti kod *Lepidium latifolium* da je početna koncentracija veća od pretpostavljene od prethodne analize tj. 17,47 μM.

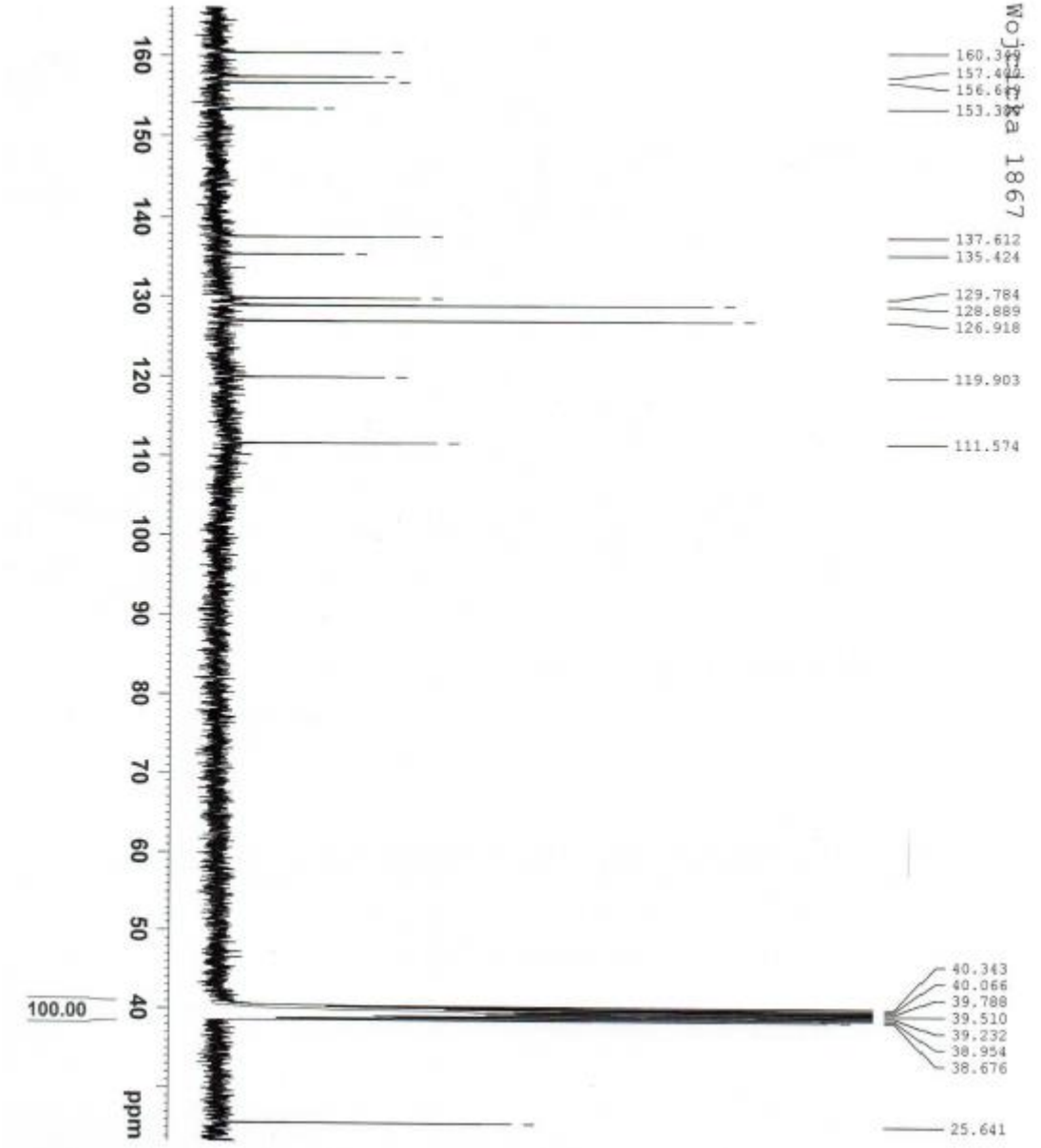
Ono što se još uočava je prisutnost pika glukotropeolina (benzil-glukozinolat) u analizi *L. latifolium* kod svih faza probave što pretpostavlja njegovu stabilnost u istraživanom vremenu od 30 min, do 2 sata.

Kvantifikaciju uzorka prije probave i nakon probave bi trebalo ponoviti kako bi bili sigurni u rezultate. Ono što se jasno vidi je trend da kod crijevne probave glukozinolati pokazuju nestabilnost.

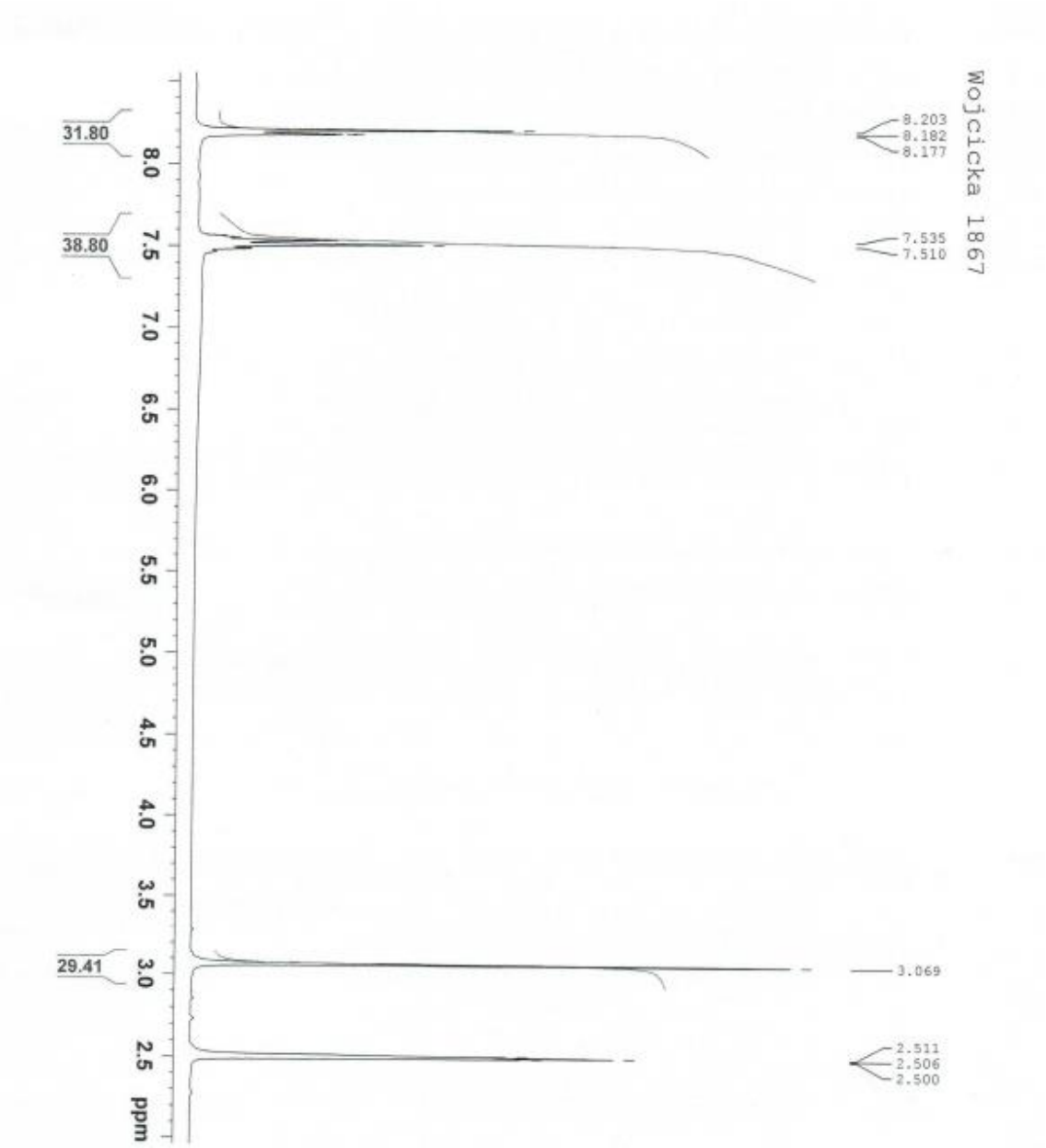
5. LITERATURA

1. Sako, M. Product class 18: Pyridopyridazines iz Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 16: Six-Membered Hetarenes with Two Identical Heteroatoms (urednik: Yamamoto, Y.), Stuttgart, 2004, str. 1109-1153.
2. Brzović, P. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama Lepidium spp. (BRASSICACEAE) I Moringa oleifera (MORINGACEAE).* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2017.
3. Silić, A. *Glukozinolatni profil u biljkama Diplotaxis enuifolia (L.) DC. I Matthiola incana (L.) R. BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima*. Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2018.
4. Vlajčević, D. *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata.* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2018.
5. Knežević, A. *Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka Entakapona*. Diplomski rad, Zagreb: Prirodoslovni-matematički fakultet, 2017.
6. Katičić, M. *Citotoksično djelovanje Lepidium spp. na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom.* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet, 2018.
7. Pine, S. H. *Organska kemija*. Zagreb : Školska knjiga, Zagreb, 1994.
8. Gazivoda Kraljević, T. *Određivanje struktura organskih spojeva;* Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, nerecenzirani nastavni materijal, str. 1-90.

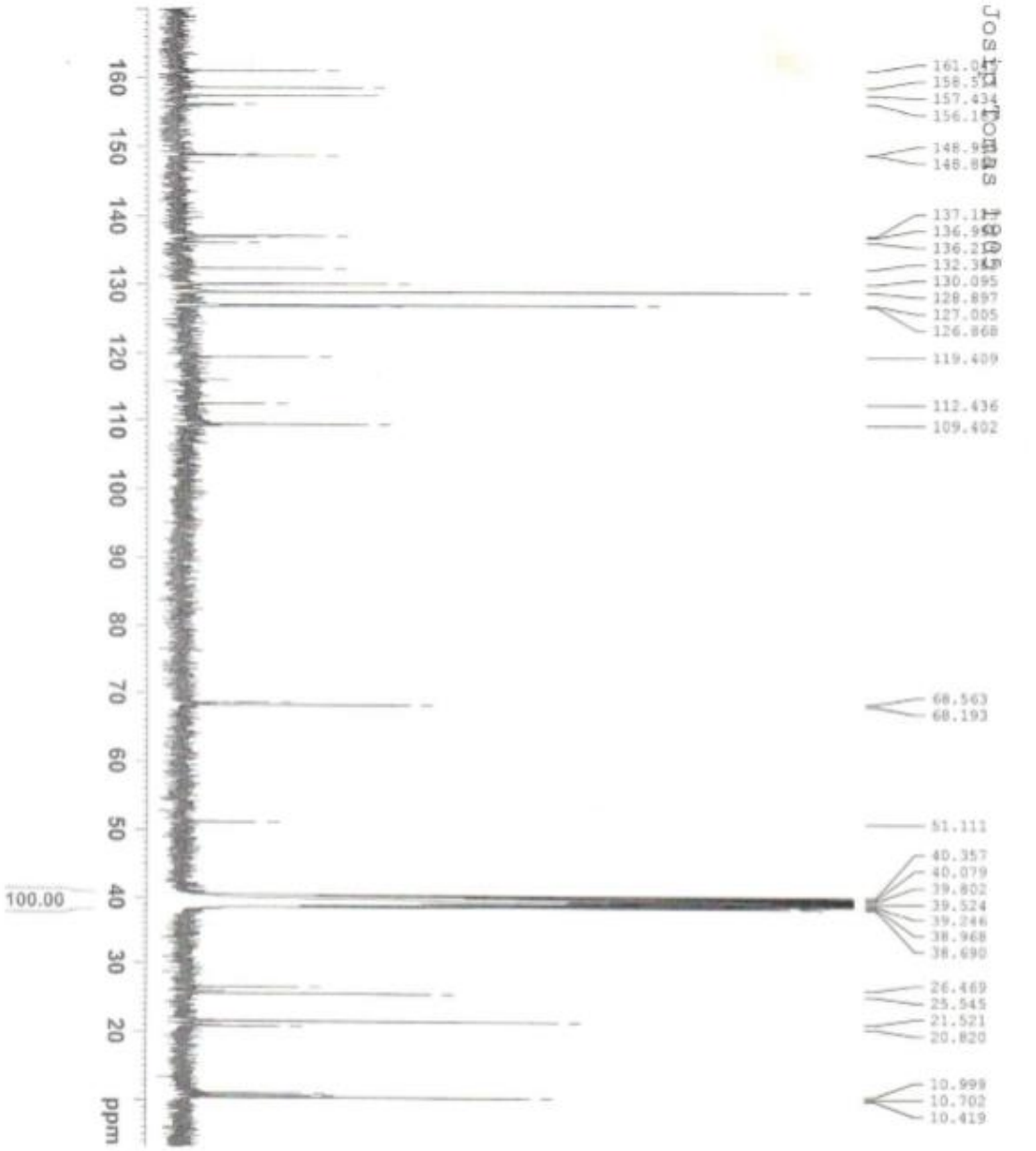
6. PRILOZI



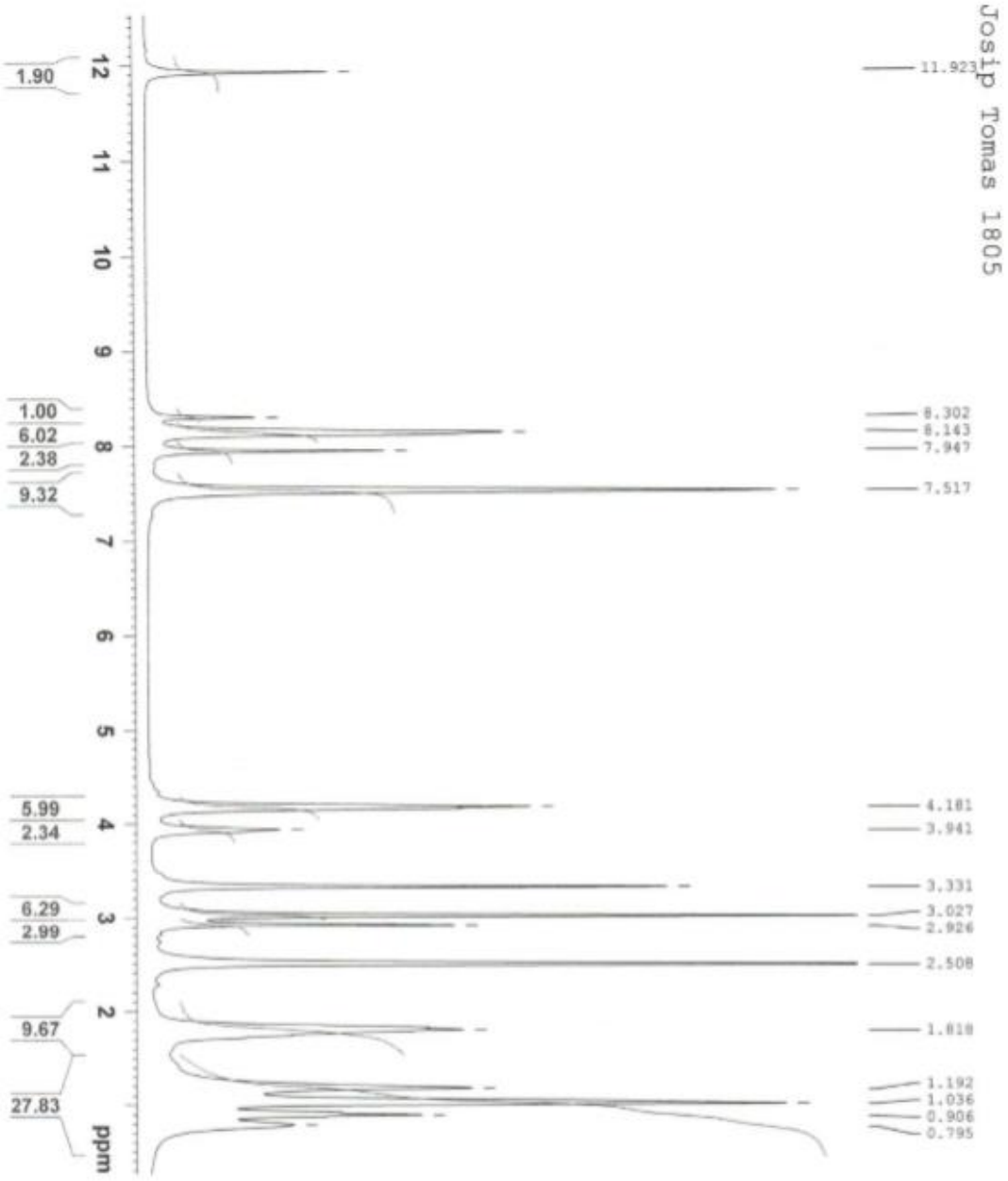
Slika 6.1. ^{13}C-NMR spektar 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



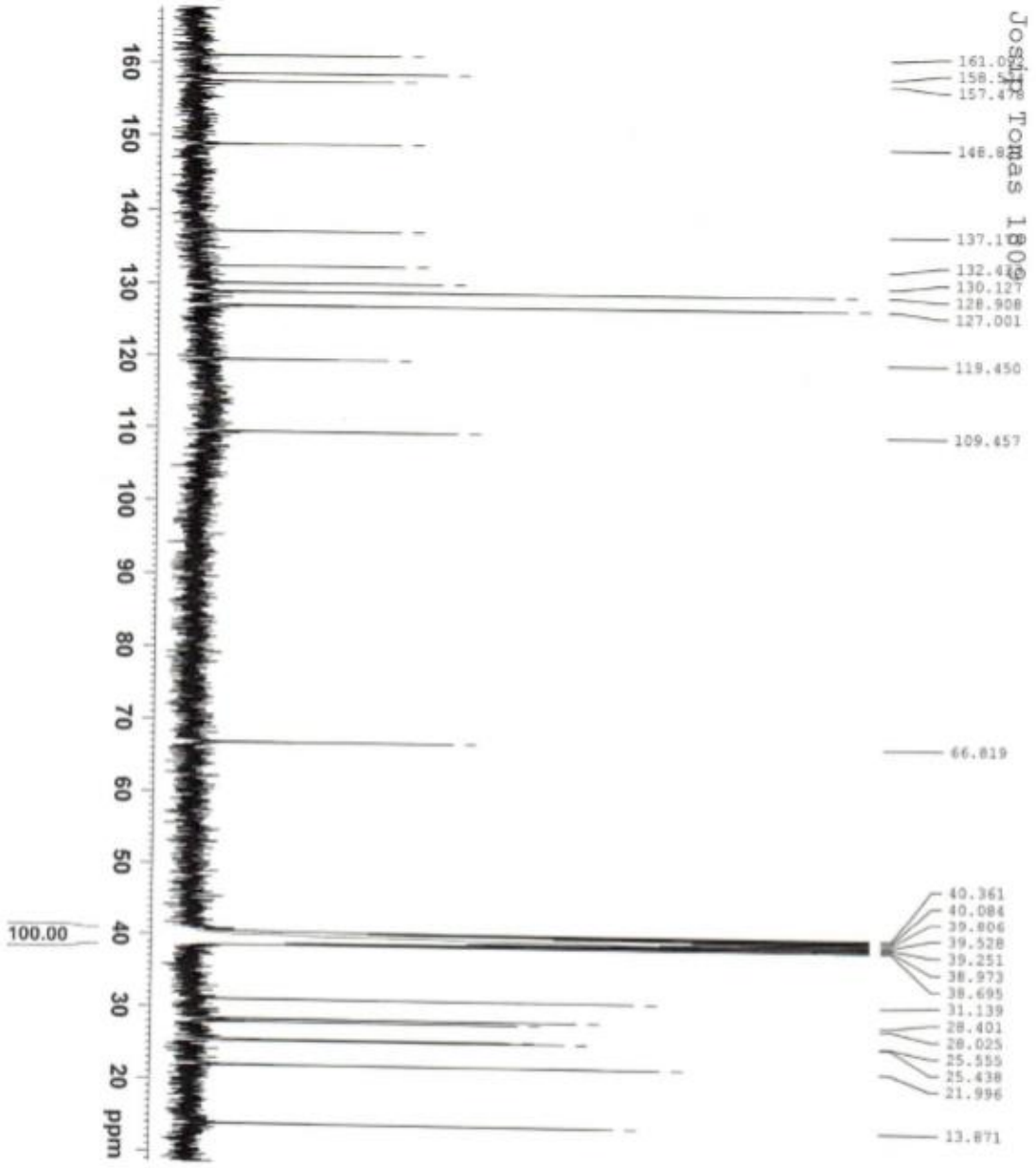
Slika 6.2. ^{1}H-NMR spektar 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



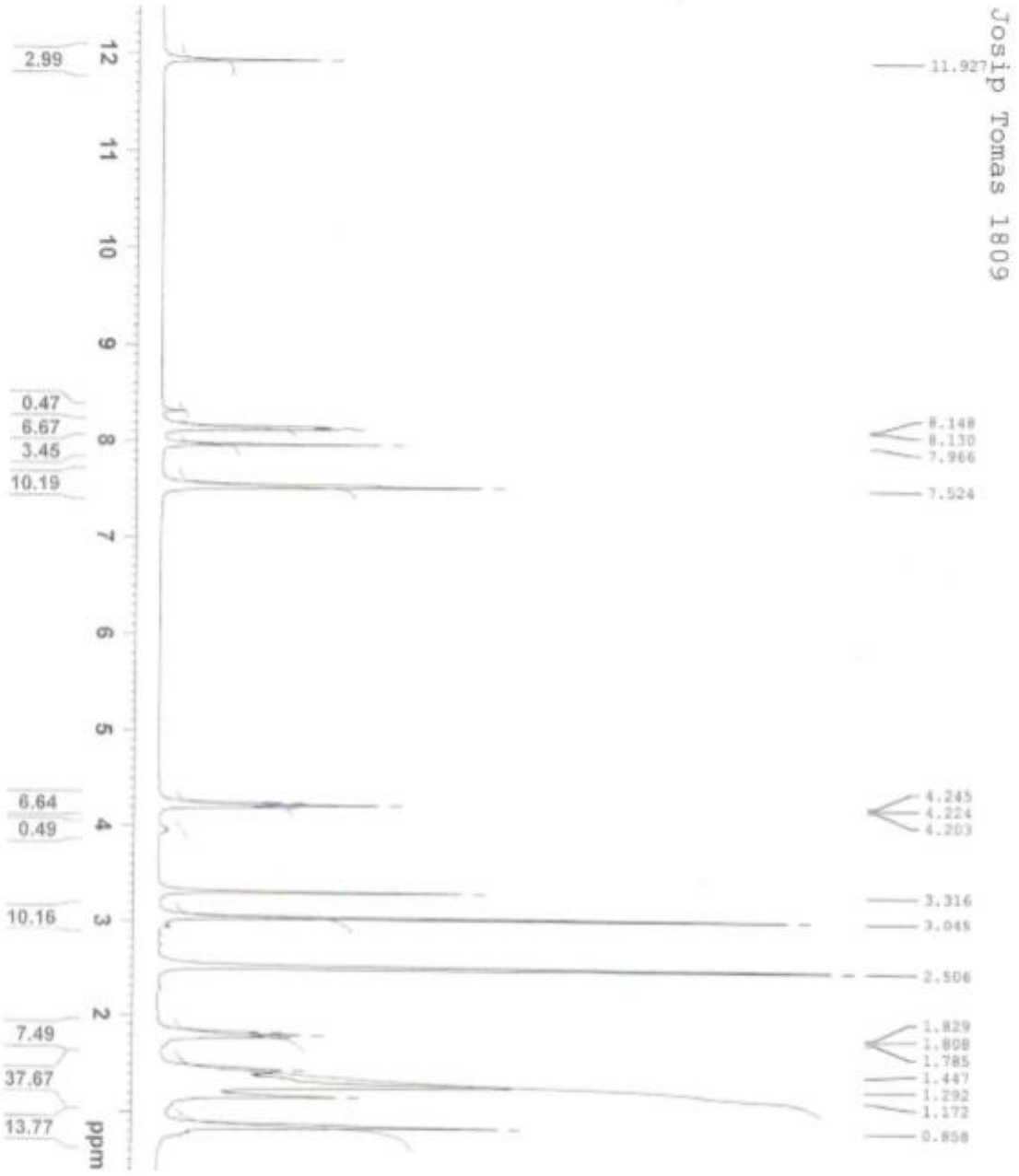
Slika 6.3. ^{13}C-NMR spektar propilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



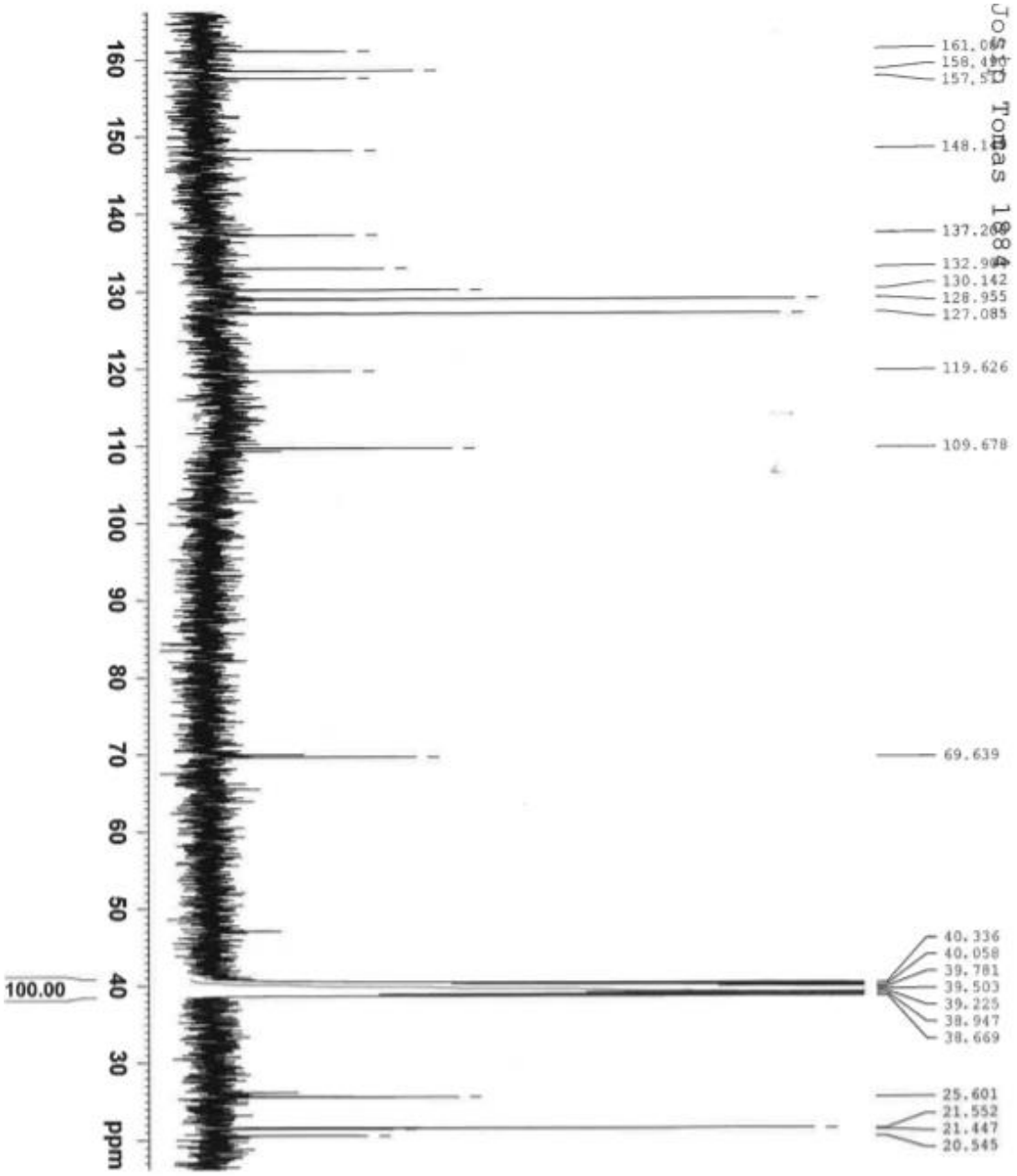
Slika 6.4. ^{1}H-NMR spektar propilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



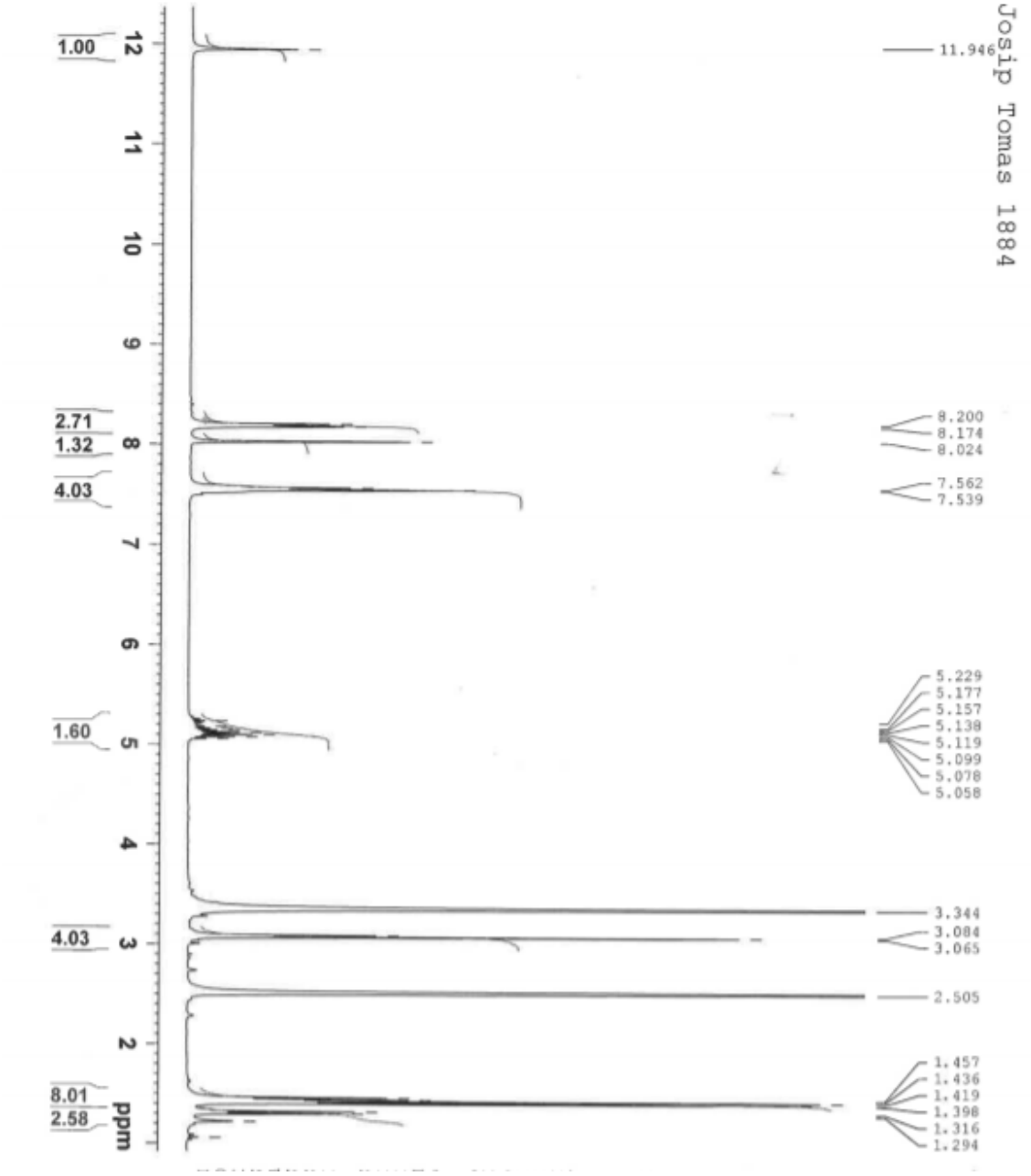
Slika 6.5. ^{13}C-NMR spektar heptilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



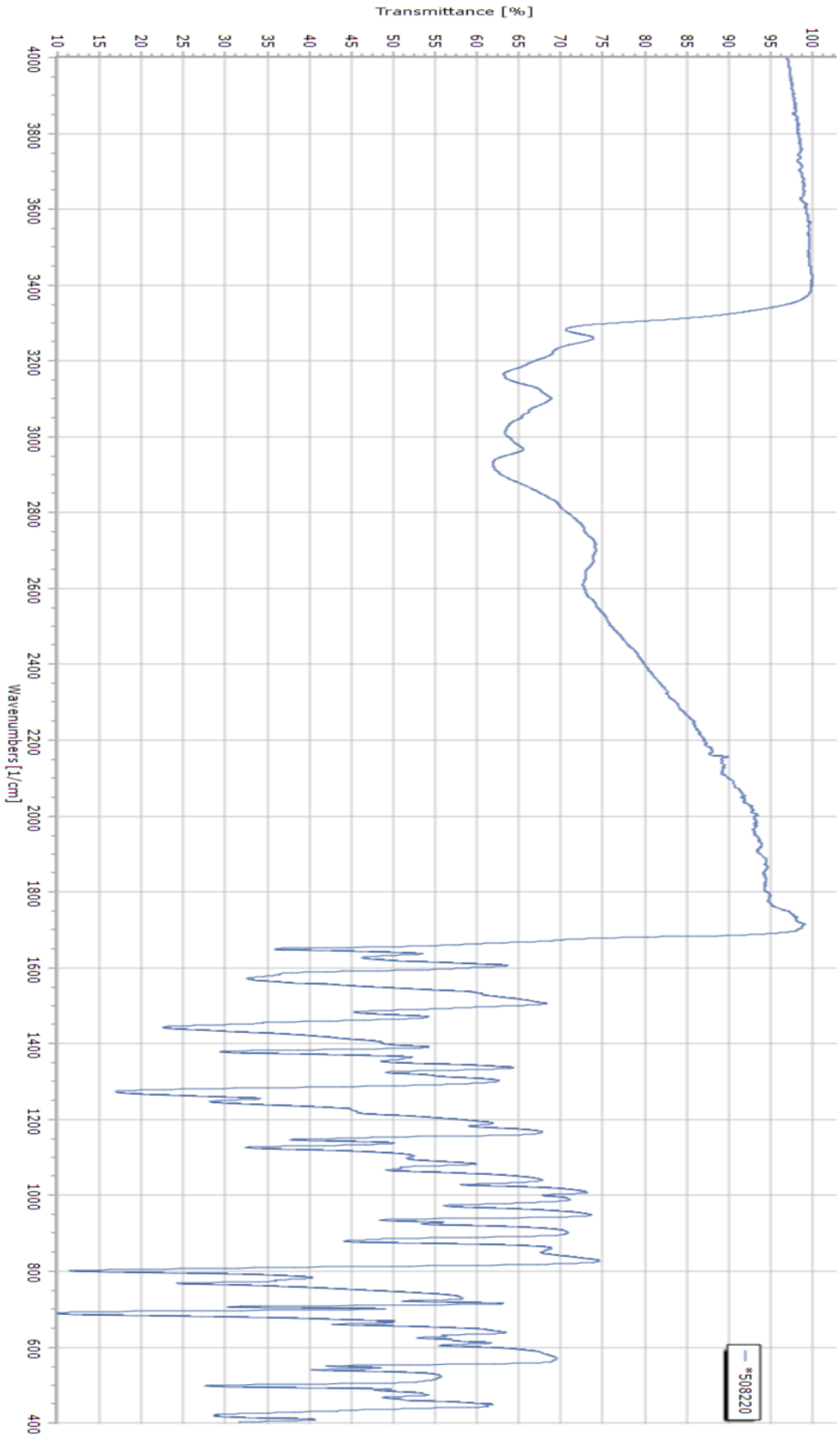
Slika 6.6. ^{1}H-NMR spektar heptilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



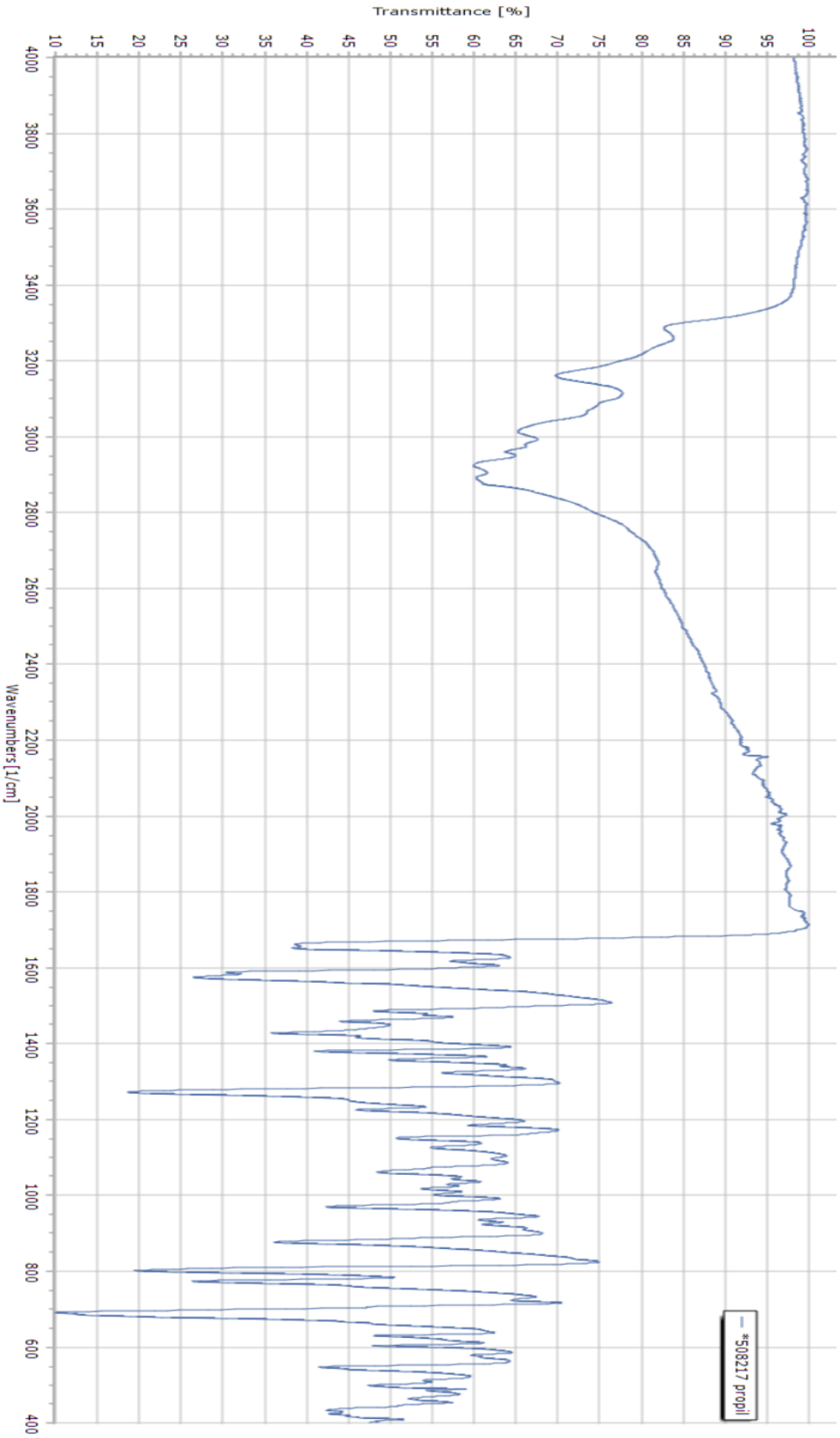
Slika 6.7. ^{13}C-NMR spektar izopropilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



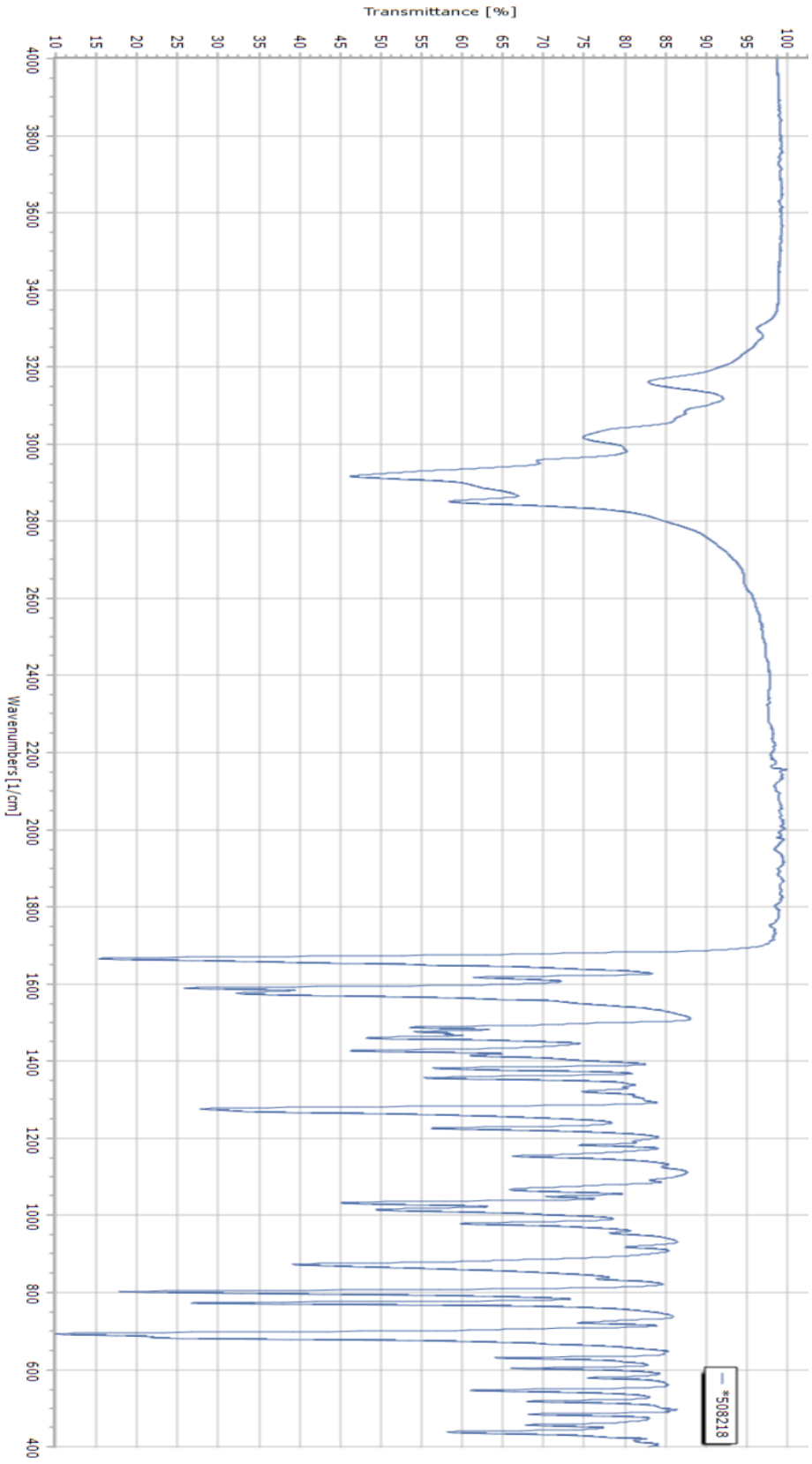
Slika 6.8. ^{1}H-NMR spektar izopropilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



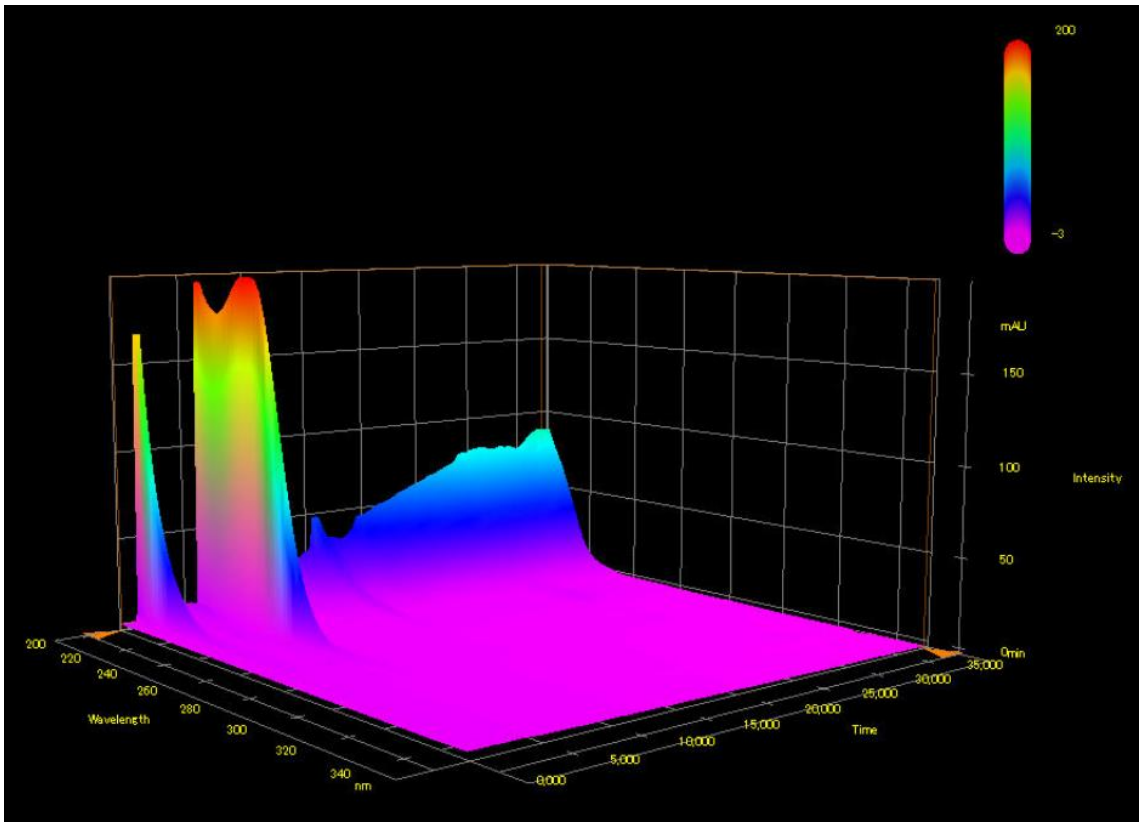
Slika 6.9. IR spektar 5-metil-7-fenil-2,3-dihidropirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



Slika 6.10. IR spektar propilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona.



Slika 6.11. IR spektar heptilnog derivata 5-metil-7-fenil-2,3-dihidro pirido[3,4-*d*]piridazin-1,4-diona



Slika 6.12. 3D prikaz UV spektra L. latifolium (200 – 350 nm).