

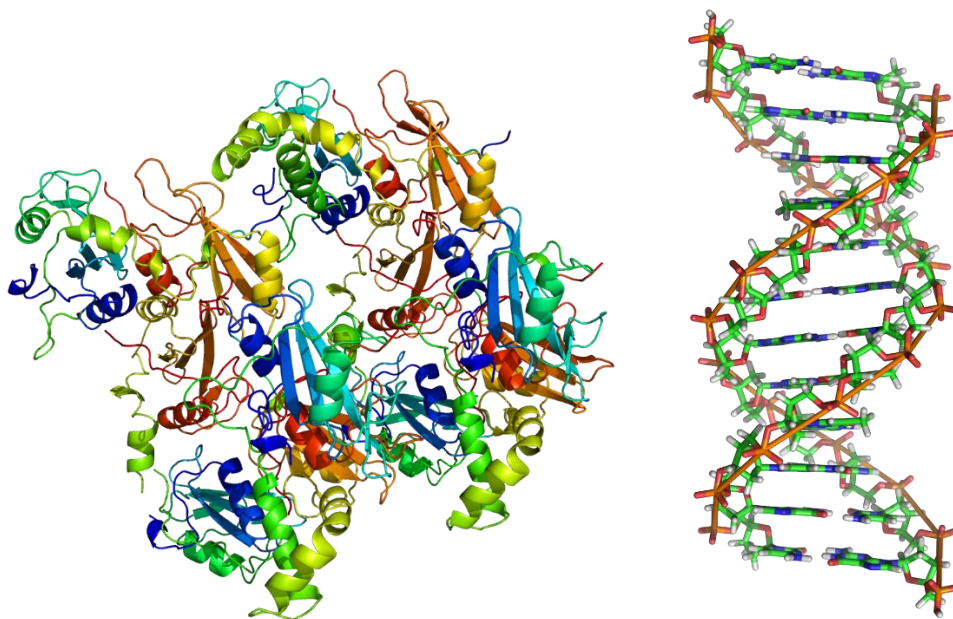


Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije

Vježbe iz kolegija **Kemija prirodnih i sintetskih polimera**

Petra Kovačec, mag. appl. chem. (pkovacec@fkit.unizg.hr)

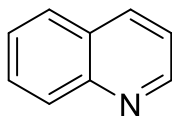
Leon Sačer, mag. appl. chem. (lsacer@fkit.unizg.hr)



Akadska godina, 2024./2025.

1. KINOLIN

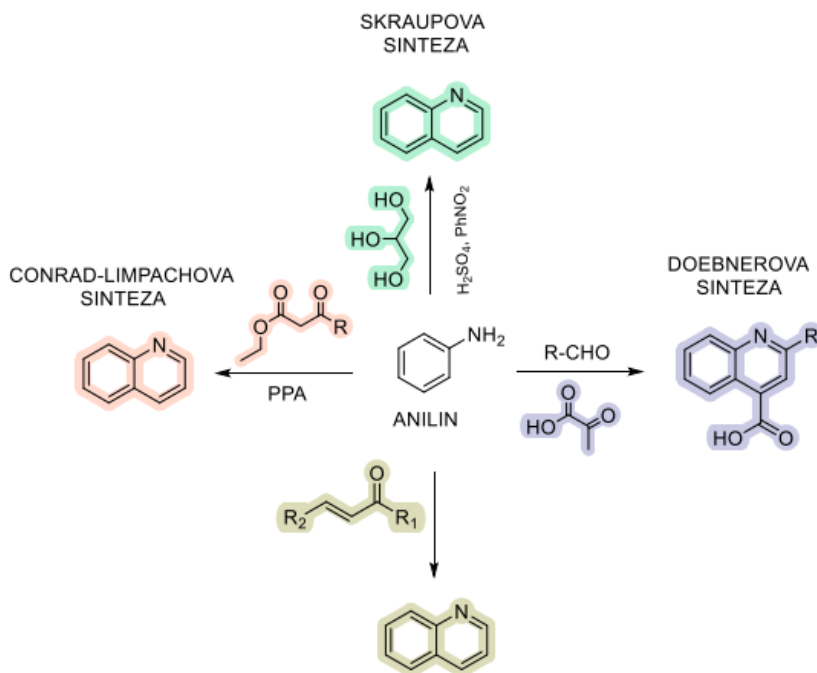
Kinolin (benzo[*b*]piridin) heterobiciklički je aromatski spoj, koji se sastoji od benzenskog prstena fuzioniranog na piridinski prsten te zbog takve strukture podliježe reakcijama elektrofilne aromatske supstitucije (slika 1). Slaba je tercijarna baza i može stvarati soli s kiselinama. Iako nesupstituiran kinolin sam po sebi nema nikakvu primjenu, lako ga je modificirati i prevesti u derivate koji se mogu primijeniti u raznim područjima. Tako na primjer lijek protiv malarije, kinin, sadrži kinolinsku jezgru. Također, njegovi derivati koriste se u antitumorskim i protuupalnim terapijama, ali i u organskim diodama za emitiranje svjetlosti (OLED) te fotonaponskim ćelijama. Mogu poslužiti i kao otapala za smole i terpene te za dobivanje boja.^{1,2}



Slika 1. Struktura kinolina.

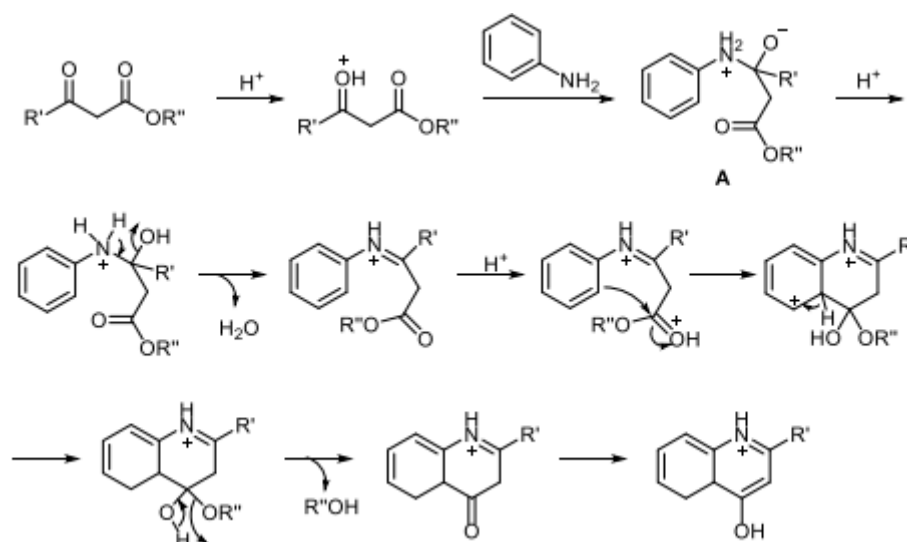
1.1. Sinteza kinolina

Kinolinski spojevi mogu se izolirati iz različitih prirodnih izvora, npr. biljka cvjetnica, citrusa te nekih životinja i mikroorganizama. Razvijene su mnoge klasične metode sinteze kinolona, među kojima su Skraupova, Doebnerova, Doebner-Von Millerova i Combesova sinteza, a jednako važna je i Conrad-Limpachova metoda koja se najčešće koristi u pripravi 4-kinolona.⁴



Shema 1. Odabrane metode sinteze kinolina

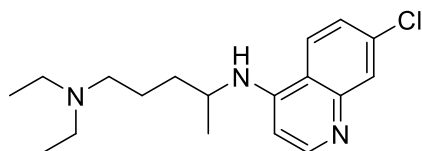
U prvom stupnju sinteze 4-kinolona koji često prelaze u tautomerni oblik 4-hidroksikinolin, dolazi do termalne kondenzacije primarnog aromatskog amina i β -ketoestera pri čemu nastaje intermedijar **A** (shema 2). Protoniranjem intermedijara **A** se formira Schiffova baza koja podliježe keto-enolnoj tautomeriji prije same ciklizacije. Nakon uklanjanja alkohola i ketoenolne tautomerije formira se konačni 4-kinolon. Međutim, tijekom kondenzacije primarnih aromatskih amina s β -ketoesterima, amino skupina može reagirati i s esterskom skupinom dajući kao intermedijar β -ketoacetamid koji ciklizira u 2-hidroksikinolin. Ovu vrstu pretvorbe otkrio je Knorr pa se metoda često naziva Conrad-Limpach-Knorrova metoda, iako između tih dviju reakcija postoji nekoliko bitnih razlika. Naime, u Conrad-Limpachovoj sintezi najčešće se koriste β -ketoesteri, dok se u Knorrovoj uglavnom koristi etil-acetoacetat. Kondenzacije pri višim temperaturama rezultiraju Knorrovim produktom, a pri nižim temperaturama Conrad-Limpachovim produktom. Važan utjecaj na iskorištenje sinteze 4-kinolona ima i izbor otapala. Obzirom da supstrat za ciklizaciju mora biti imin-enol tautomer visoke energije, a ciklizacija u poluketal narušava aromatičnost fenilnog prstena, za ovu reakciju koriste se otapala visoke točke vrelišta.⁵



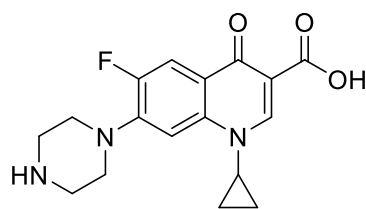
Shema 2. Pretpostavljeni mehanizam Conrad-Limpachove sinteze 4-kinolona

1.2. Biološka aktivnost derivata kinolina

Kinolini i njegovi derivati važni su lijekovi, kao što su antimalarici, antibiotici, antipsihotici, antihelmetici, lokani anestetici itd. Osim toga imaju i antivirusna, antifugalna, kemoterapeutska i citotoksična svojstva, sposobnost inhibiranja rasta stanica, poremećaja migracije stanica te inhibicije angiogeneze, odnosno procesa stvaranja krvnih žila. Značajan broj derivata kinolina ima antimikrobna svojstva, a neki od primjera su antimalarik klorokin i antibiotik ciprofloksacin. Klorokin je lijek koji se tradicionalno koristi za prevenciju i liječenje malarije. Djeluje tako da ometa razmnožavanje parazita unutar crvenih krvnih stanica. Osim toga, koristi se i za liječenje nekih autoimunih bolesti, poput lupusa i reumatoidnog artritisa.⁶ Ciprofloksacin je antibiotik iz skupine fluorkinolona koji se koristi za liječenje različitih bakterijskih infekcija, poput infekcija mokraćnog sustava, respiratornih infekcija, infekcija kože i mekih tkiva, kao i nekih gastrointestinalnih infekcija. Njegovo djelovanje temelji se na inhibiciji enzima DNA giraze potreban bakterijama za umnožavanje i popravak DNA, čime se sprječava njihovo razmnožavanje. Ciprofloksacin je učinkovit protiv širokog spektra gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija, uključujući sojeve koji su otporni na druge antibiotike.⁷



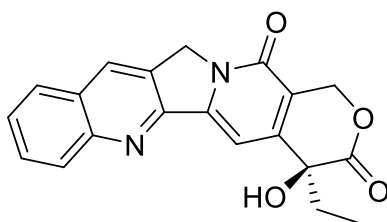
Klorokin



Ciprofloksacin

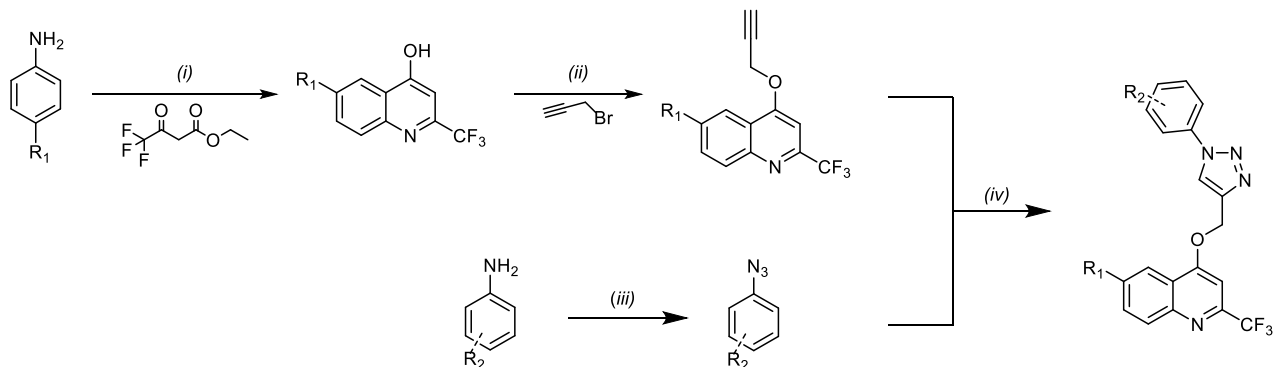
Slika 2. Struktura klorokina i ciprofloksacina

Kinolinski sustav nalazi se u velikom broju prirodnih biološki aktivnih produkata. Primjerice, kamptotecin je prirodni alkaloid prvi put izoliran 1960. godine iz biljke *Camptotheca acuminata* (slika 2.). Laboratorijska istraživanja *in vivo* i *in vitro* pokazala su jako antitumorsko djelovanje ovog alkaloida koje je uzrokovano inhibicijom enzima DNA-topoizomeraze I, koji u normalnim okolnostima sudjeluje u bitnim staničnim procesima poput replikacije, transkripcije, rekombinacije i popravka DNA. [8]



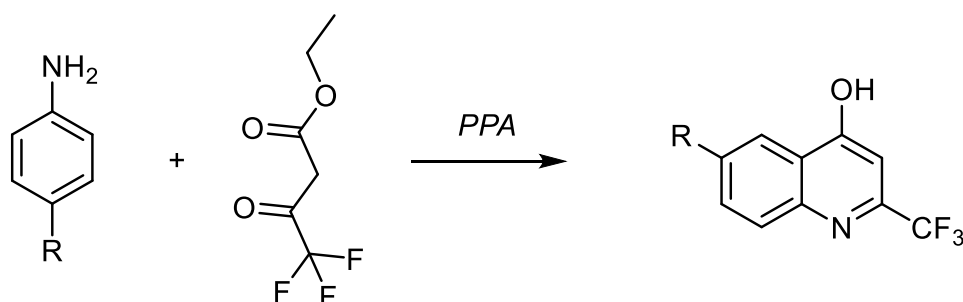
Slika 3. Struktura kamptotecina

2. SINTEZA BIOLOŠKO AKTIVNIH DERIVATA KINOLINA



Shema 3. Sinteza kinolin-triazola. Reagensi i uvjeti: (i) polifosforna kiselina, 150 °C; (ii) propargilbromid, K₂CO₃; (iii) HCl, NaNO₂, NaN₃; (iv) Metanol, Cu(OAc)₂

2.1. Sinteza 4-hidroksikinolina Conrad-Limpachovom metodom



Kemikalije:

- 4-supstituirani anilin - 500 mg (1 ekv.)
- etil 4,4,4-trifluor-3-oksobutanoat – 593 μL (1 ekv., $\rho = 1.259 \text{ g/mL}$)
- polifosforna kiselina, PPA – 3.5 g ($M = 337,9 \text{ g/mol}$)

Postupak:

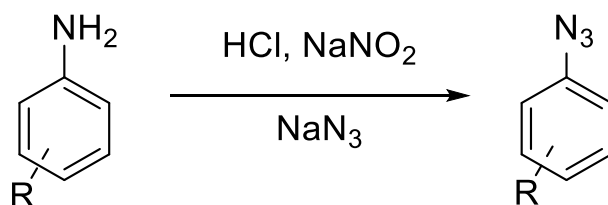
Polifosforna kiselina (2.5 ekv.) i etil 4,4,4-trifluor-3-oksobutanoat (1.0 ekv.) se pomiješaju u okrugloj tikvici. Reakcijska smjesa se zagrije na 100°C te joj se dodaje anilin (1.0 ekv.) u obrocima. Kada je dodana potrebna količina anilina reakcija se zagrije na 150°C te se miješa na refluksu 2 sata.

Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se ohladi i razrijedi s 5% otopinom natrijevog hidroksida (uz mješanje). Nastali talog se profiltrira preko Büchnerovog lijevka. Talog se zatim otopi u 10% NaOH te zakiseli s koncentriranom klorovodičnom kiselinom uz taloženje. Nastali talog se ponovo filtrira pomoću Büchnerovog lijevka te ispere s malo destilirane vode.

Referat:

1. Izračunajte iskorištenje reakcije.
2. Nacrtajte tautomerne strukture 4-hidroksikinolina

2.2. Sinteza azida



Kemikalije:

- Derivat anilin - 500 mg (1 ekv., $\delta = 1020 \text{ mg/mL}$)
- konc. HCl – (6 ekv.)
- otopina natrijeva nitrita – (1 ekv.)
- otopina natrijeva azida - (4 ekv.)

Postupak:

500 mg derivata anilina i (6 ekv.) koncentrirane klorovodične kiseline pomiješa se u dvogrloj tikvici s okruglim dnom u koju je stavljen termometar te se reakcijska smjesa ohladi na 0°C pomoću ledene kupelje. Dokopavanjem se doda (1 ekv.) otopina natrijeva nitrita. Reakcijska se smjesa miješa 30 minuta, a zatim se dokopavanjem doda (4 ekv.) otopina natrijeva azida. Reakcijska se smjesa miješa 2 h na sobnoj temperaturi te se nakon toga reakcija neutralizira s zasićenom otopinom NaHCO_3 (do $\text{pH} = 7$).

Reakcijska smjesa ekstrahira se s dietil-eterom (2 x 7 mL), a zatim s zasićenom otopinom NaCl -a (2 x 5 mL). Organski se sloj suši na MgSO_4 , filtrira i upari na rotacijskom uparivaču u ohlađenoj kupelji. Produkt je nestabilan na sobnoj temperaturi i potrebno ga je držati u hladnjaku.

Referat:

1. Kojim sve spektroskopskim metodama bi mogli dokazati da ste dobili azid. Obrazložite svoj odgovor.
2. Nacrtajte TLC-pločicu reakcijske smjese i izračunajte R_f vrijednost pojedine komponente.
3. Izračunajte iskorištenje reakcije.

3. REAKCIJE DOKAZIVANJA PROTEINA

Proteini su makromolekule građene od aminokiselina koje se međusobno povezuju peptidnim vezama. Postoji velik broj aminokiselina, no ne ulaze sve u onu skupinu koje grade proteine. Samo je 20 aminokiselina koje grade proteine, ostale nazivamo neproteinske aminokiseline, npr. ornitin i citrulin. Aminokiseline također možemo podijeliti na dvije grupe; na esencijalne i neesencijalne. Esencijalne aminokiseline su one koje treba unositi u organizam putem hrane jer ih ljudski organizam ne može sam sintetizirati, dok su neesencijalne one koje organizam sam može sintetizirati.

3.1. Taložne reakcije dokazivanja proteina

Taložne reakcije dokazivanja proteina temelje se na koloidnim svojstvima otopine proteina. U vodi se proteinske molekule otapaju stvarajući koloide. Pod utjecajem različitih čimbenika dolazi do razaranja nativne konformacije proteina, što dovodi do gubitka njegove biološke funkcije. Taj proces nazivamo denaturacija. Potpuno denaturirani protein poprima različite nasumične konformacije koje su biološki inaktivne. Do denaturacije proteina najčešće dolazi povišenjem temperature, promjenom pH (pri ekstremno niskim i visokim vrijednostima pH), dodatkom organskih otapala, pri povećanoj koncentraciji soli, dodatkom teških metala (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+}) te dodatkom različitih oksidansa i reducensa.

Pribor:

stalak s epruvetama, kapaljke, plamenik, drvena hvataljka

Kemikalije :

- Koncentrirana HCl
- Etanol
- NaOH
- UZORAK: otopina bjelanjka

Priprema uzorka: bjelanjak se u čaši odvoji od žutanjka, te se doda trostruki volumen vode.

Nakon miješanja staklenim štapićem, otopina se profiltrira preko lijevka s filter papirom.

Postupak:

U devet epruveta uliti po 2 mL otopine bjelanjka te tretirati na slijedeći način:

1. epruveta – kuhanjem otopine bjelanjka u epruveti
2. epruveta – u otopinu bjelanjka dodati nekoliko kapi koncentrirane klorovodične kiseline
3. epruveta – u otopinu bjelanjka dodati nekoliko kapi otopine natrijevog hidroksida
4. epruveta - dodati nekoliko kapi etanola i protresti

Referat:

1. Što je kvaterna struktura proteina, a što tercijska?
2. Što je denaturacija proteina?
3. Opisati opažanja u provedenoj vježbi za svaku epruvetu.

3.2. Obojene reakcije dokazivanja aminokiselina i proteina

Obojene reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina temelje se na dokazivanju peptidne (amidne) veze ili na dokazu pojedinih aminokiselina, odnosno funkcionalnih skupina koje sadržava pojedina aminokiselina. Najpoznatije su sljedeće obojene reakcije na proteine:

- biuret reakcija - dokaz peptidne veze
- reakcija s olovnim(II) acetatom - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline sa sumporom (cistein, metionin)
- ksantoproteinska reakcija - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aromatske aminokiseline (npr. tirozin)
- ninhidrinska reakcija - sve aminokiseline i proteini pokazuju pozitivnu ninhidrinsku reakciju
- Hopkin-Colova reakcija - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline s indolnim prstenom (npr. triptofan)
- reakcija s Millonovim reagensom - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline s fenolnim prstenom (npr. tirozin)
- reakcija prema Sakaguchiju - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiselinu s gvanidino skupinom (arginin)

a) Biuret reakcija

Kemikalije :

- otopina NaOH ($c = 2 \text{ mol/ L}$)
- otopina CuSO_4 ($c = 0.05 \text{ mol/ L}$)

Postupak:

Otopinu bjelanjka zaluziti s nekoliko kapi NaOH i dodati nekoliko kapi razrijeđene CuSO_4 . Otopina se oboji u ljubičasto.

Objašnjenje: Ovo je opći test na proteine te nije specifičan za pojedine aminokiseline. Naziv potječe od spoja biuret koji nastaje kondenzacijom dviju molekula uree uz izdvajanje amonijaka. Opisanu reakciju daju svi spojevi koji u molekuli imaju peptidnu vezu.

b) Ksantoproteinska reakcija

Kemikalije :

- otopina NaOH ($c = 2 \text{ mol/L}$)
- konc. HNO_3

Postupak:

U 2 mL otopine bjelanjka u epruveti dodati nekoliko kapi konc. HNO_3 i smjesu zagrijavati nekoliko minuta na vodenoj kupelji. Kad se otopina ohladi dodati NaOH do lužnate reakcije koja se ispita indikator papirom, pri čemu žuta boja prelazi u narančastu.

Objašnjenje: tu reakciju daju aromatske aminokiseline kao što su tirozin, triptofan, fenilalanin. Ovu reakciju daju i čvrste bjelančevine jer ako dušičnu kiselinu kapnemo na kožu nastaje žuto obojenje.

Referat:

1. Opisati opažanja obojenih reakcija dokazivanja proteina
2. Na čemu se temelje obojene reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina?
3. Koji je princip biuret reakcije i što se njome dokazuje?
4. Koji je princip ksantoproteinske reakcije i što se njome dokazuje?

4. Literatura

1. O. Ebenezer, M. A. Jordaan, G. Carena, T. Bono, M. Shapi and J. A. Tuszynski, *Int. J. Mol. Sci.*, , DOI:10.3390/ijms23158117.
2. L. F. E. Moor, T. R. A. Vasconcelos, R. da R. Reis, L. S. S. Pinto and T. M. da Costa, *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2021, 21, 2209–2226.
3. S. M. Prajapati, K. D. Patel, R. H. Vekariya, S. N. Panchal and H. D. Patel, *RSC Adv.*, 2014, 4, 24463–24476.
4. Z. Wang, *Compr. Org. Name React. Reagents*, 2010, 692–696.
5. D. Diaconu, V. Antoci, V. Mangalagiu, D. Amariuca-Mantu and I. I. Mangalagiu, *Sci. Rep.*, 2022, 12, 1–17.
6. Olliaro, P. L., & Tougouma, A., Chloroquine and Hydroxychloroquine for the Treatment of Malaria. *Curr. Drug Targets*. 18, 2017, 1287-1298.
7. Leis, J. A., The impact of fluoroquinolone use on the emergence of resistant bacteria, *AAC*, 64, 2020, e01838-19.
8. Matsushima, K. Recent Advances in the Development of Camptothecin Derivatives as Anticancer Agents, *Front. pharmacol.*, 14. 2023, 123456.