

Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Kristina Pavlović

**Sinteza oksimskih derivata kao potencijalnih inhibitora  
kolinesteraza korištenjem mikroreaktorskog sustava**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Irene Škorić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

## POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

ACh – eng. Acetylcholine - acetilkolin

AChE – eng. Acetylcholinesterase - acetilkolinesteraza

AD – eng. Alzheimer's disease – Alzheimerova bolest

BChE – eng. Butyrylcholinesterase – butirilkolinesteraza

COSY - eng. Correlation Spectroscopy - korelacijska spektroskopija

DCM - diklormetan

DMF - dimetilformamid

E - dietil-eter

*E* - njem. entgegen - nasuprot; sa suprotnih strana

FEP – eng. Fluorinated Ethylene Propylene – fluorirani etilen-propilen polimer

FTIR – eng. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

GC – plinska kromatografija

HPLC – visokoučinkovita tekućinska kromatografija

HSQC- eng. Heteronuclear Single-Quantum Correlation – heteronuklearna korelacija preko jedno veze

IR - infracrveno

NMR - eng. Nuclear Magnetic Resonance - nuklearna magnetska rezonancija

NOESY - eng. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy - spektroskopija koja koristi nuklearni Overhauserov efekt

PE – petroleter

PFA – eng. Perfluoroalkoxy – perfluoralkoksi polimer

PTFE – eng. Polytetrafluoroethylene – politetrafluoretilen polimer

UPLC-MS – visokočinkovita tekućinska kromatografija - masena spektrometrija

UV/Vis – ultraljubičasto/vidljivo

Z - njem. zusammen - zajedno; s iste strane

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. <i>FLOW</i> -KEMIJA .....	2
2.1.1. Sustav za sintezu .....	5
2.1.2. Reaktori .....	7
2.1.3. Višefazne reakcije .....	8
2.1.4. Utjecaj miješanja i temperature .....	10
2.2. <i>FLOW VS BATCH</i> .....	12
2.3. PRIMJENA <i>FLOW</i> -KEMIJE .....	13
2.4. PRIMJERI <i>FLOW</i> -REAKCIJA .....	16
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
3.1. UVOD .....	20
3.2. OKSIMI I OKSIMSKI DERIVATI .....	21
3.2.1. Sinteza oksima i oksimskih etera .....	23
3.3. MIKRO- <i>FLOW</i> FORMILIRANJE .....	27
3.4. PRIKAZ OKSIMA I OKSIMSKIH ETERA U AKTIVNOM MJESTU AChE I BChE POMOĆU SeeSAR PROGRAMSKOG PAKETA .....	29
4. EKSPERIMENTALNI DIO .....	34
4.1. SINTEZA OKSIMA .....	34
4.2. SINTEZA OKSIMSKIH ETERA .....	36
4.3. MIKRO- <i>FLOW</i> FORMILIRANJE .....	39
5. ZAKLJUČAK .....	42
6. ZAHVALE .....	43
7. LITERATURA .....	44
SAŽETAK .....	50
SUMMARY .....	51
ŽIVOTOPIS .....	52
PRILOZI .....	53

## 1. UVOD

U organskoj sintezi se sve više pažnje posvećuje *flow*-kemiji koja ima brojne prednosti nad *batch* odnosno šaržnom sintezom. Glavne prednosti su bolja učinkovitost, ekološka prihvatljivost i sigurnost, no *flow*-kemija nije univerzalni pristup za sve probleme koji mogu zateći organske sintetske kemičare te prije provedbe odabranih reakcija treba razmotriti isplativost obzirom na šaržnu sintezu.<sup>1,2</sup> Sigurnosti i ekološkoj prihvatljivosti *flow*-reakcija značajno doprinosi korištenje malog volumena kemikalija i otapala budući da se reakcije provode u mikro- ili mezoreaktorima napravljenima od inertnih materijala.<sup>1</sup> Mogu se na taj način provoditi i višefazne reakcije, no dizajn reaktora treba osigurati učinkovito miješanje faza.<sup>2</sup> Zbog brojnih prednosti, *flow*-sinteze su predmet kontinuiranog istraživanja i uvjeti provedbe šaržnih reakcija se optimiraju kako bi se postigla što veća učinkovitost, sigurnost i *scale-up*.

U ovom radu ispitana je *flow*-sinteza formilnog derivata benzobicyklo[3.2.1]oktadiena u kojoj se koristi opasna kemikalija POCl<sub>3</sub>, a sintetizirani spoj je važan kao početni spoj za daljnju sintezu oksima i oksimskih etera. U radu je prikazana i općenita primjena oksima i oksimskih etera te sinteza do sada literaturno nepoznatih benzobicyklo[3.2.1]oktadienskih oksimskih etera. Literaturno poznati oksimski derivati pokazali su se kao dobri reaktivatori fosforiliranih enzima acetil- i butirilkolinesteraze, ali i kao njihovi inhibitori. S obzirom na to da je poznato da oksimski derivati ulaze u aktivno mjesto kolinesteraza, u radu je prikazan potencijalni ulazak sintetiziranih spojeva u aktivno mjesto enzima korištenjem SeeSAR programskog paketa. Osim za sintetizirane spojeve, predviđena je i interakcija drugih derivata s aktivnim mjestom enzima, pa se na temelju dobivenih rezultata može ciljano ići u sintezu onih spojeva koji se prema računalnim predviđanjima čine potencijalno dobrim inhibitorima. Treba imati na umu da inhibicija može biti i nekompetitivna te će se pravi rezultati inhibicije ili reaktivacije kolinesteraza dobiti tek eksperimentalnim ispitivanjem.

## 2. OPĆI DIO

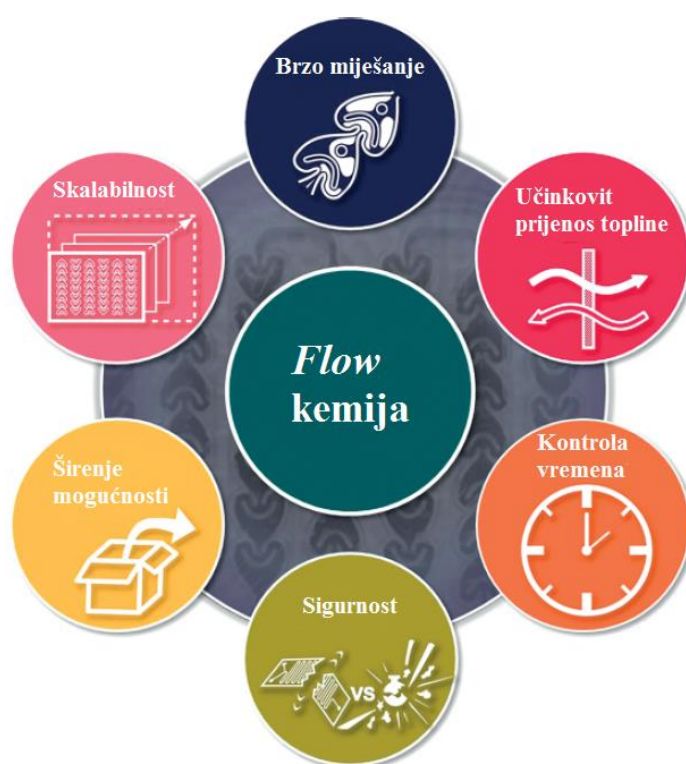
### 2.1. FLOW-KEMIJA

*Flow*-reakcije se provode kontinuirano i pokazale su se kao brže, učinkovitije i selektivnije od šaržnih (engl. *batch*) reakcija uz lakše optimiranje uvjeta koji se šaržno teško kontroliraju. *Flow*-reakcije se provode u reaktorima s malim volumenom pa je u usporedbi s konvencionalnim metodama, sigurnost značajno veća i mogu se provoditi reakcije koje su inače visokog sigurnosnog rizika.<sup>1</sup>

Jedan od glavnih problema konvencionalnih šaržnih procesa je *scale-up* uspješnih reakcija, osobito onih vrlo egzotermnih. Ovisno o procesu, prije korištenja pilotnog postrojenja pa zatim i industrijske proizvodnje uvjeti se moraju prilagoditi ili se mijenjaju sintetski putevi čime su povećani troškovi i uloženo vrijeme. Kod *flow*-procesu reaktorima se fleksibilno može prilagoditi veličina i volumen kako bi se omogućila proizvodnja na relevantnoj skali, no *flow*-pristup nije univerzalno rješenje za sve probleme šaržnih procesa.<sup>1</sup> Svaki *flow*-proces rezultat je niza eksperimenata optimiranja reaktorskih jedinica i reakcijskih uvjeta što zahtijeva razumijevanje kemijskih i inženjerskih aspekata. Neke konvencionalno trivijalne reakcije u *flow*-sustavu mogu zahtijevati specijalnu opremu ili potpuno novi pristup. Ne postoji *flow*-sustav pogodan za kontinuiranu provedbu svih reakcija, no modularni dizajn omogućuje prilagodbu reakcijskih uvjeta.<sup>2</sup> Prije provedbe mora se predvidjeti isplativost obzirom na uloženo vrijeme i opremu te rezultat investicije u vidu poboljšanja procesa.<sup>3</sup> Izazov predstavljaju vrlo viskozne kemikalije, suspenzije i krutine.<sup>4</sup>

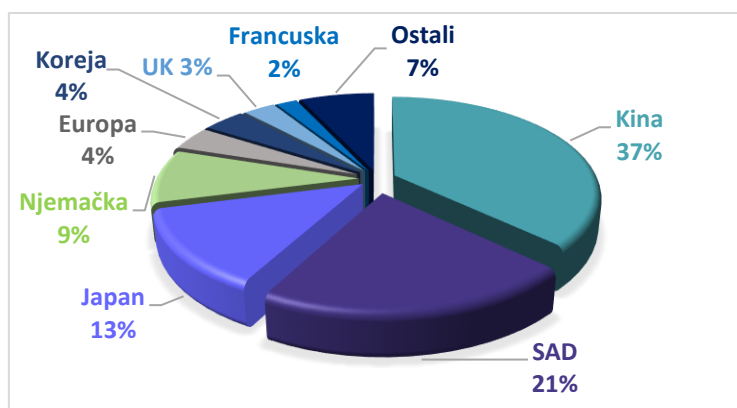
Glavna prednost *flow*-reaktora je precizna kontrola reakcijskih parametara koja je omogućena odličnim prijenosom mase i topline i predviđanjem uvjeta u *flow*-reaktorima s definiranim karakteristikama. Kod organske sinteze regulacija koncentracije i temperature je neophodna u cilju nastajanja određenog produkta, ali i zbog sigurnosti rada. Kod šaržne sinteze koncentracija produkta vremenom raste i neravnomjerno je raspoređena unutar tikvice, dok je kod *flow*-reaktora na ulazu najveća koncentracija reaktanata koja se putujući kanalima smanjuje do minimuma na izlazu gdje je najveća koncentracija produkta.<sup>2</sup> Fluktuacije u temperaturi pri *batch* uvjetima teško se popravljaju i vremenski su zahtjevne, a kod *flow*-sustava je moguće reagirati u vrlo kratkom vremenu i podesiti temperaturu. Povećanjem miješanja, a smanjenjem promjera kanala u reaktoru veliki je omjer površina/volumen što omogućuje brzi prijenos topline koja nastaje tijekom reakcije.<sup>1</sup>

Organski kemičari značajno doprinose održivom razvoju i često se susreću s raznim izazovima te je napredak organske sinteze ometan komplikacijama sintetskog puta i nedostatnom laboratorijskom opremom. Posljednjih desetljeća integriraju se nove tehnologije u laboratorijima organske kemije s ciljem ubrzanja reakcija, poboljšanja selektivnosti i čistoće, iskorištavanja alternativnih izvora energije, povećanja sigurnosti i istraživanja novih procesnih mogućnosti.<sup>4</sup> *Flow*-kemija donosi poboljšanja u mnogim aspektima kemije, kao što su učinkovito i brzo miješanje čak i nemješljivih faza, učinkovito upravljanje toplinom, precizna kontrola vremena zadržavanja, sigurnost i potencijalno besprijekorna skalabilnost (Slika 1).<sup>3</sup> Pravilnom kombinacijom moguće je smanjiti vrijeme reakcije i utjecaj kemijskih procesa na okoliš.<sup>5</sup>



**Slika 1.** Glavne prednosti *flow*-kemije u preparativnoj sintezi.<sup>4</sup>

U razdoblju od 2004. do 2015. godine broj patenata u području *flow*-kemije porastao je za 71 % na svjetskoj razini. Vodeća je Kina nakon koje slijede SAD, Japan i Njemačka (Slika 2). Kineska državna uprava za sigurnost u radu nadzire sigurnosne aspekte u industrijskim kemijskim postrojenjima te na temelju rezultata uvodi mjere za provedbu *flow*-kemijske sinteze kod opasnih procesa. Kinesko tržište *flow*-reaktora je u stalnom razvoju i obećava sve veću primjenu u industriji.<sup>4</sup>



**Slika 2.** Udio država kod zahtjeva za patentima 2004-2015. godine.<sup>4</sup>

U Tablici 1 prikazane su snage (engl. *strengths*, S), slabosti (engl. *weaknesses*, W), mogućnosti (engl. *opportunities*, O) i rizici (engl. *threats*, T) preparativne *flow*-organske kemije.<sup>4</sup>

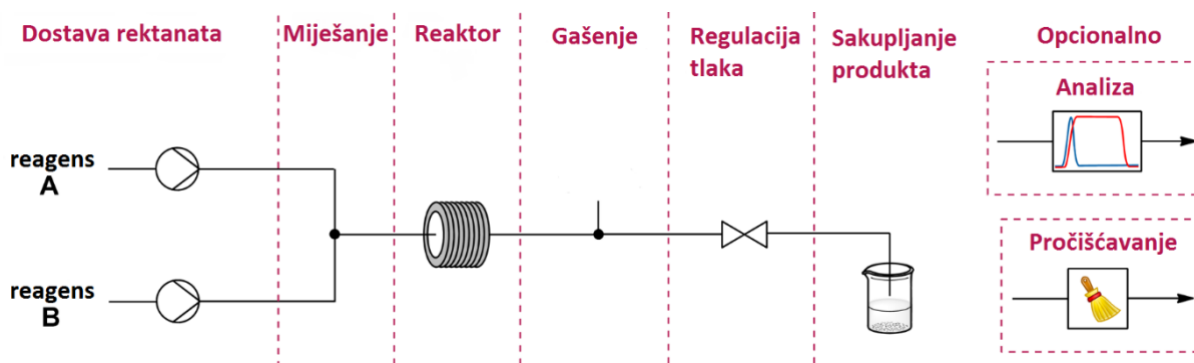
**Tablica 1.** SWOT analiza preparativne *flow*-organske kemije.

<i>Strengths</i>	<i>Weaknesses</i>
homogena proizvodnja, povećana sigurnost, brz napredak od R&D do proizvodnje, procesi neovisni o skali, decentralizirana proizvodnja, smanjeni utjecaj na okoliš (zelena kemija), mogući superkritični uvjeti (kraće vrijeme reakcije)	nova tehnologija s nepoznanicama, veliki početni troškovi, izazovna proizvodnja krutina, upitna sljedivost proizvoda
<i>Opportunities</i>	<i>Threats</i>
novi pristup, širenje kemijske proizvodnje proizvodnja specifičnih farmaceutika na određenim područjima, <sup>281</sup> prijenosne proizvodne jedinice	smanjena potreba za radnom snagom (moguća automatizacija procesa), proizvodnja velikih količina ilegalnih supstanci pomoću malih prijenosnih proizvodnih uređaja (droge, eksplozivi, kemijska oružja)



### 2.1.1. Sustav za sintezu

Tipični sustav za *flow*-kemijsku sintezu čini 8 osnovnih zona: dostava reaktanata, miješanje, reaktor, gašenje, regulacija tlaka, sakupljanje produkta i opcionalno analiza i pročišćavanje (Slika 3).<sup>2</sup>



Slika 3. Zone *flow*-sustava s dvije ulazne struje.<sup>2</sup>

Početne kemikalije se pomoću zasebnih pumpi uvode u cijevi koje vode do njihovog miješanja prije nego što nastupi reakcija u reaktoru. Točna kontrola *flow*-reakcije zahtijeva prigodno gašenje budući da većina reakcija u protivnom može nastaviti neželjeno teći, a produkt koji se sakuplja nije zadovoljavajuće kvalitete. Gašenje omogućava točnu kontrolu vremena zadržavanja. Ukoliko je protok idealan, ovisno o dužini puta, na određenom mjestu koncentracija reaktanta i produkta je konstantna pri stabilnim uvjetima. To mjesto se odražava u vremenu zadržavanja koje je vrijeme između inicijacije i terminacije kontinuirane pretvorbe i često neispravno uspoređivano s vremenom *batch* reakcije. Vrijeme zadržavanja je omjer dužine ili volumena puta i brzine protoka. Inicijacija se postiže miješanjem reaktanata ili fizikalnom aktivacijom zagrijavanjem ili zračenjem, a terminacija prigodnim tehnikama gašenja. Ovisno o tipu reakcije gašenje može biti termičko, kemijsko ili spontano kao što je kod fotokemijskih reakcija koje se gase trenutno nakon izlaska iz reaktora jer više nisu izložene određenom zračenju. Vrijeme zadržavanja jednostavno se određuje kod reakcija s jednom fazom jer su volumen reaktora i brzina protoka definirani od strane korisnika, a kod višefaznih reakcija doprinosi više čimbenika pa je najbolje vrijeme zadržavanja odrediti puštanjem obojane otopine kroz kanal mjereći vrijeme.<sup>2</sup>

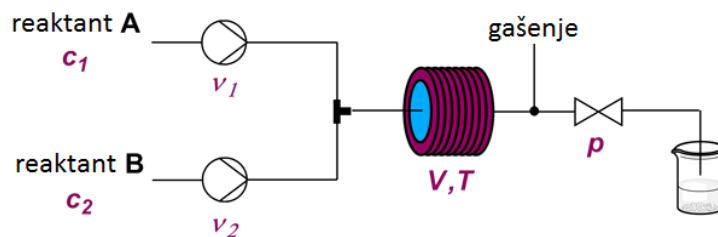
Osim što se regulacijom tlaka fluidi mogu zagrijati iznad temperature vrelišta, reguliranje je važno kod kontrole rada s hlapljivim i plinovitim reagensima ili intermedijerima.<sup>6</sup> Za točno mjerenje tlaka unutar sustava ugrađuju se senzori tlaka. Nakon smanjivanja tlaka u sustavu produkt izlazi i sakuplja se u određenu posudu. Kada se govori o iskorištenjima korisno je govoriti o produktivnosti (količina nastalog produkta u vremenu) i količini produkta nastalog po volumenu i vremenu kako bi se mogli usporediti različiti *flow* i *batch* pristupi.<sup>2</sup>

Tijekom sinteze uzorci reakcijske smjese se mogu ručno sakupljati i analizirati nekom metodom (npr. GC, HPLC, NMR itd.), no ukoliko se radi o optimizaciji reakcijskih parametara i kontroli kvalitete vrlo reaktivnih i toksičnih intermedijera pristupa se *on-line* ili *in-line* analizi.<sup>3</sup> *On-line* analizom se reakcijska smjesa periodički analizira automatskim uzorkovanjem i provedbom do analitičkog instrumenta. *In-line* analiza omogućuje analizu u realnom vremenu i moguća je samo ako je nedestruktivna (npr. FTIR, Raman, UV/Vis, NMR). U ovom slučaju analitička jedinica se može inkorporirati u *flow-proces*.<sup>7-10</sup>

Većinom se pročišćavanje provodi konvencionalnim putem nakon sakupljanja produkta, no kod sinteze aktivnih farmaceutskih sastojaka (*APIs*) koja je potpuno kontinuirana često je neophodno *in-line* pročišćavanje između određenih kemijskih reakcija.<sup>2</sup>

Oprema i postupak automatizacije *flow-procesa* preskupi su za uobičajenog korisnika i automatizacija se provodi kod vrlo specifičnih postupaka te zahtijeva napredniji inženjerski pristup.<sup>2</sup>

Parametri koji se mogu mijenjati u slučaju jednostavne i homogene reakcije s dva reaktanta su koncentracije ( $c_1$ ,  $c_2$ ), protoci ( $v_1$ ,  $v_2$ ), volumen reaktora ( $V$ ), temperatura ( $T$ ) i tlak unutar sustava ( $p$ ) (Slika 4). Promjena samo jednog parametra posljedično utječe i na ostale parametre. Na primjer, promjenom jednog protoka mijenja se stehiometrija, konačna koncentracija i vrijeme zadržavanja. Ponekad utjecaj nije potpuno razjašnjen i upitno je jesu li promjene željene ili neželjene što je bitno za optimizaciju.<sup>2</sup>



**Slika 4.** Pregled parametara koji se mogu mijenjati kod *flow-procesa* s dvije ulazne struje.<sup>2</sup>

Problemi i nereproducibilnost često su uzrokovani pumpom. Pri visokim tlakovima može doći do curenja iz sustava što može biti vrlo opasno pa se prije provedbe procesa obavezno moraju provjeriti svi spojevi.<sup>2</sup> Jedno od glavnih ograničenja *flow-sustava* je začepljenje koje se može dogoditi bilo gdje u uređaju.<sup>11</sup> Može doći do kristalizacije ili zamrzavanja, nakupljanja krutina na kanalima, taloženja tijekom reakcije ili korozije zbog čega je vrlo važno koristiti inertne materijale.<sup>12</sup>

## 2.1.2. Reaktori

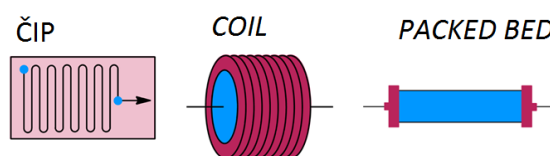
Kemijske reakcije u *flow*-sustavima provode se kontinuirano unutar uskih i dobro definiranih kanala mikro- ili mezoreaktora koji se razlikuju u dimenzijama.<sup>13,14</sup> Protokom kemikalija kroz kanale se može upravljati i reakcija se provodi pod strogo kontroliranim uvjetima.<sup>13</sup> *Flow*-kemija najviše se oslanja na svojstva odgovarajućih reaktora koja utječu na dinamiku fluida te prijenos mase i topline za vrijeme strujanja kemikalija.<sup>4</sup>

Pod pojmom *mikroreaktor* najčešće se smatra planarni uređaj s kanalima dimenzija od nekoliko stotina mikrometara koji može biti od raznih materijala (silikon, kvarc, staklo, metali, polimeri).<sup>1</sup> Materijal reaktora mora biti odgovarajući obzirom na kemikalije koje se za reakcije koriste, a najčešći materijal mikroreaktora je staklo, zatim silikon ili njihova mješavina.<sup>15</sup> Često se nazivaju *laboratorij-na-čipu* uređajima budući da su malih dimenzija i volumen kanala je od nanolitara do mikrolitara te se kao takvi najčešće koriste kod sinteza na maloj skali, ali i istraživanja i razvoja pa sve do proizvodnje. Mezoreaktori imaju kanale milimetarskih dimenzija i volumena od 1 do 20-ak mL, a najčešće su napravljeni od metala ili polimera.<sup>1</sup>

Što su dimenzije reaktora manje kraći je difuzijski put i omogućeno je brže miješanje<sup>16,17</sup> koje sprječava nastajanje nusprodukata te nastaju čišći produkti u odnosu na šaržne reakcije.<sup>18</sup> Osim prijenosa mase odličan je i prijenos topline.<sup>19</sup> Mali volumen reaktora omogućuje procjenu i optimiranje mnogih reakcijskih uvjeta uz malu potrošnju kemikalija. Optimiranje se provodi nizom reakcija s različitim vremenom zadržavanja (određeno brzinom protoka početnih reagenasa) i temperaturama kako bi se našli najoptimalniji uvjeti. Reakcije se mogu provoditi i pod povišenim tlakom čime se mogu postići temperature reakcijske smjese iznad temperature vrelišta otapala.<sup>1</sup>

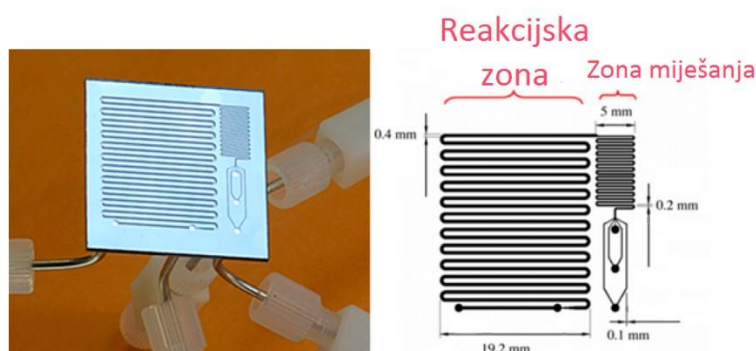
### Tipovi reaktora

Općenito postoje tri tipa reaktora; čip, namotaj (engl. *coil*) i horizontalni reaktor s nepokretnim slojem (engl. *packed bed*) (Slika 5). Tip i materijal reaktora ovise o tipu reakcije.<sup>2</sup> Fotokemijski reaktori moraju biti od materijala propusnih za zračenje (npr. staklo) i imati odgovarajući izvor svjetlosti.<sup>20</sup> Hlađenje ili zagrijavanje reaktora moguće je uranjanjem u određene kupelji ili posebnim pristupom kao što su kriogenske jedinice za hlađenje ili mikrovalno zračenje i induktivne jedinice za zagrijavanje.<sup>21</sup>



Slika 5. Tipovi reaktora u *flow*-kemiji.

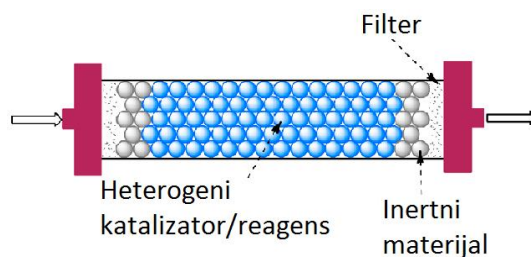
Kod čip-reaktora je najbolji prijenos topline zbog velikog omjera površina/volumen,<sup>22</sup> no lako se može začepiti. Za razliku od *coil*-reaktora često imaju ugrađen dio za miješanje prije ulaska u reakcijsku zonu (Slika 6).<sup>23</sup>



**Slika 6.** Silikonski čip-reaktor s jedinicom za miješanje.<sup>2</sup>

*Coil*-reaktori su jeftiniji i najčešća su alternativa čip-reaktorima te su široko zastupljeni u sintetskoj *flow*-kemiji. Najčešće su izrađeni od jednostavnih komercijalno dostupnih cijevi od inertnih fluorovih polimera (npr. PTFE, PFA, FEP) ili nehrđajućeg čelika.<sup>2</sup>

*Packed bed*-reaktori se koriste kod heterogenih reakcija kao što je heterogena kataliza.<sup>24,25</sup> Unutar reaktora se nalazi kolona ili uložak od stakla, polimera ili nehrđajućeg čelika gdje se nalazi kruti katalizator ili reagens, a tekuća faza ulazi u reaktor, reagira s krutinom i tekući produkt kroz filter izlazi van (Slika 7).<sup>2</sup> Najveća upotreba im je kod katalitičke hidrogenacije u trofaznim sustavima plinovito-tekuće-kruto.<sup>26</sup>

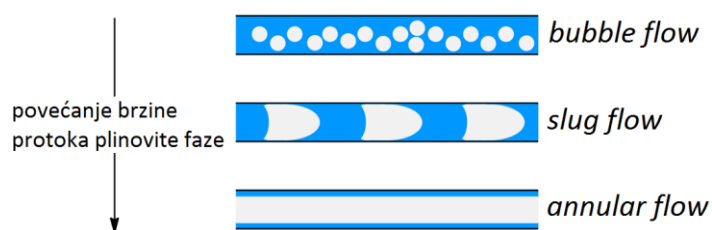


**Slika 7.** *Packed bed*-reaktor.<sup>2</sup>

### 2.1.3. Višefazne reakcije

U *flow*-reaktorima se mogu provoditi reakcije između više faza (tekuće-plinovito, tekuće-kruto, tekuće-tekuće, tekuće-kruto-plinovito). Dizajn reaktora važan je za učinkovito miješanje faza. Zbog male veličine kanala omjer površina/volumen je veliki čime je međufazna površina povećana što ima važnu ulogu u prijenosu između faza. Za svaki višefazni sustav različit je režim strujanja koji ovisi o protoku, viskoznosti i svojstvima kanala.<sup>2</sup>

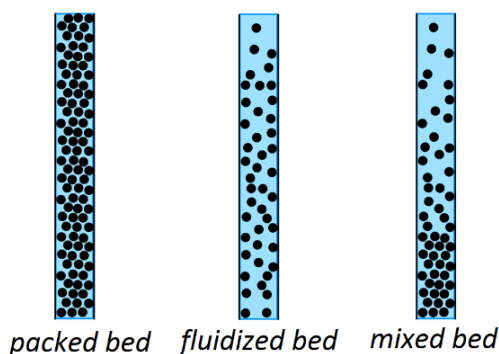
Kada je protok tekuće faze konstantan, kod reakcija **tekuće-plinovito** ovisno o protoku plina moguće je mjehuričasto (engl. *bubble*), čepoliko (engl. *slug*) i anularno (engl. *annular*) strujanje (Slika 8).<sup>2</sup>



**Slika 8.** Vrste strujanja kod reakcija tekuće-plinovito.<sup>2</sup>

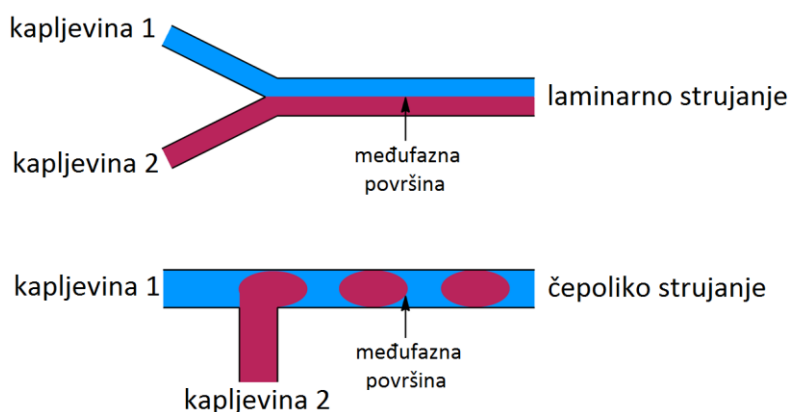
Zbog slabog miješanja na granici faza plinovite reaktante potrebno je koristiti u velikom stehiometrijskom suvišku, a važna je i topljivost plina koja je najčešće pri sobnoj temperaturi slaba. Kod fluidnih reaktora osigurano je bolje međupovršinsko miješanje i može se u sigurnim uvjetima primijeniti tlak što povećava topljivost plina.<sup>2</sup>

Kod reakcija **tekuće-kruto** kanal može biti gusto ispunjen krutinom s ograničenim kretanjem čestica (engl. *packed bed*), sa suspendiranim česticama koje su udaljenije (engl. *fluidized bed*) ili može biti kombinacija (engl. *mixed bed*) gdje je kretanje čestica pri dnu ograničeno, a u višim slojevima su suspendirane (Slika 9).<sup>2</sup> Ove reakcije su zanimljive zbog lake separacije nakon reakcije. Heterogena kataliza je vrlo važna i prisutna u industrijskim procesima.<sup>27,28</sup>



**Slika 9.** Vrste reaktora kod reakcija kruto-tekuće ovisno o gibanju čestica.<sup>2</sup>

Kod reakcija **tekuće-tekuće** strujanje je najčešće laminarno i čepoliko (Slika 10).<sup>2</sup> Kod laminarnog strujanja faze nisu međusobno ometane i Reynoldsov broj je manji od 2400.<sup>29</sup> Češće je čepoliko strujanje gdje su dvije faze okomite jedna na drugu. Kod manjih protoka (veće vrijeme zadržavanja) kod različitih gibanja fluida kroz reaktor prijenos mase bit će jednako učinkovit, dok je kod većih protoka bitna struktura reaktora i vrsta gibanja.<sup>2</sup> Postojanje prepreka u reaktoru kod gibanja fluida uzrokuje miješanje i povećava međupovršinu i prijenos mase.<sup>30</sup>



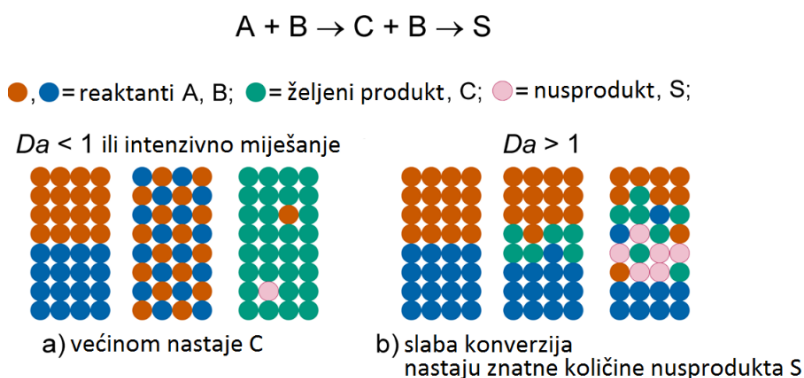
Slika 10. Vrste strujanja kod reakcija tekuće-tekuće.<sup>2</sup>

#### 2.1.4. Utjecaj miješanja i temperature

Kod *batch* i *flow*-reakcija različiti su mehanizmi miješanja i prije provedbe reakcije u *flow*-sustavu potrebno je odrediti koliko miješanje utječe na reakciju te definirati mehanizam i kinetičke parametre reakcije.<sup>2</sup>

Obzirom na Reynoldsov broj miješanje fluida može biti laminarno ( $Re < 2400$ ), prijelazno ili turbulentno. U *batch* tikvicama u laboratoriju miješanje je obično laminarno ili prijelazno.<sup>31</sup> Prijelazni režim prisutan je kada dolazi do odvajanja unutar reakcijske posude – turbulentno miješanje u blizini mješala, a laminarno na udaljenim dijelovima. Gibanje molekula unutar reakcijske posude ovisi o difuziji.<sup>32</sup> Manje posude imaju manje vrijeme difuzije, no to ne znači da je u potpunosti uklonjeno odvajanje režima miješanja.<sup>2</sup>

*Flow*-reaktori imaju puno manje vrijeme difuzije i brže miješanje. Ukoliko je bezdimenzijski *Damköhlerov broj*,  $Da$  manji od 1, miješanje s više od 95 % homogenosti postiže se prije no što reaktanti reagiraju. Kada je  $Da$  veći od 1, reagiranje je brže od prijenosa mase što uzrokuje koncentracijski gradijent unutar sustava i nastajanje nusprodukata (Slika 11).<sup>2</sup>

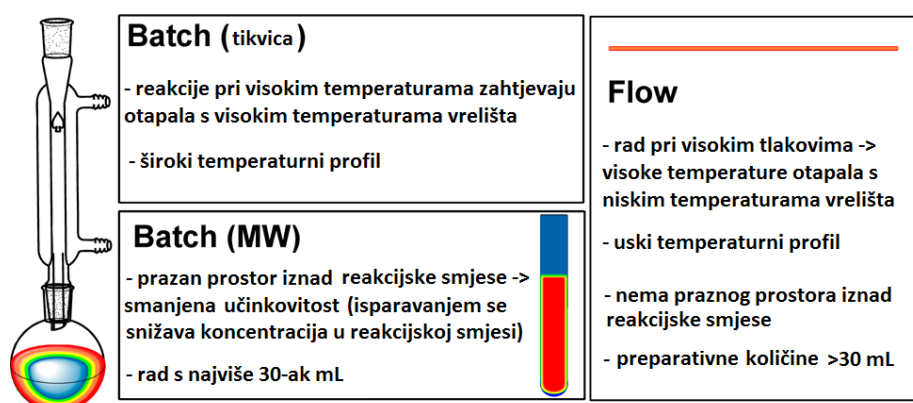


Slika 11. Utjecaj vrijednosti  $Da$  na nastanak produkta.<sup>31</sup>

Kada je *Da* veliki, nusprodukti se smanjuju upotrebom specijalnih mješača kojima se postiže brzo miješanje i homogenost unutar sustava. Za proizvodnju određenih finih kemikalija i farmaceutika zadovoljavajuće miješanje postiže se samo u *flow*-reaktorima.<sup>31</sup> *Flow*-kemija ne mijenja kemiju ili kinetiku reakcije,<sup>33</sup> već se njome smanjuju koncentracijski gradijenti koji mogu biti štetni kod brzih reakcija. Brzina reakcije i miješanje trebaju biti jedni od ključnih parametara koji su odlučujući za provođenje reakcije u *flow*-sustavu.<sup>2</sup>

Uvjeti u *flow*-sustavima nadmašuju one u *batch* reaktorima kod izrazito egzotermnih reakcija zbog boljeg miješanja, ali i boljeg prijenosa topline uslijed većeg omjera površina/volumen. Otpor prijenosu topline unutar reaktora linearno se povećava rastom veličine kanala.<sup>2</sup>

Kod *batch* reakcija koje traju manje od 48 h pri sobnoj temperaturi vjerojatno nema potrebe za *flow*-procesom budući da se zagrijavanjem do 80 °C značajno može skratiti vrijeme reakcije. Za reakcije koje pri sobnoj temperaturi idu duže od tjedan dana potrebne su veće temperature zagrijavanja što u *batch* uvjetima zahtijeva korištenje otapala s visokim vrelištima što dalje ograničava odabir otapala i otežava reakcijske uvjete i pročišćavanje. U zatvorenim sustavima otapala se mogu zagrijati iznad njihove temperature vrelišta.<sup>2</sup> Primjenom mikrovalnog zračenja mogu se postići temperature veće od 300 °C čime se vrijeme reakcije od mjesec dana smanjuje na sekunde.<sup>34</sup> U novije vrijeme se veće temperature postižu *flow*-kemijom umjesto mikrovalnim zračenjem<sup>35</sup> i reakcije s otapalima niske temperature vrelišta daju bolje rezultate u *flow*-reaktorima pod tlakom<sup>6,36</sup> (Slika 12).



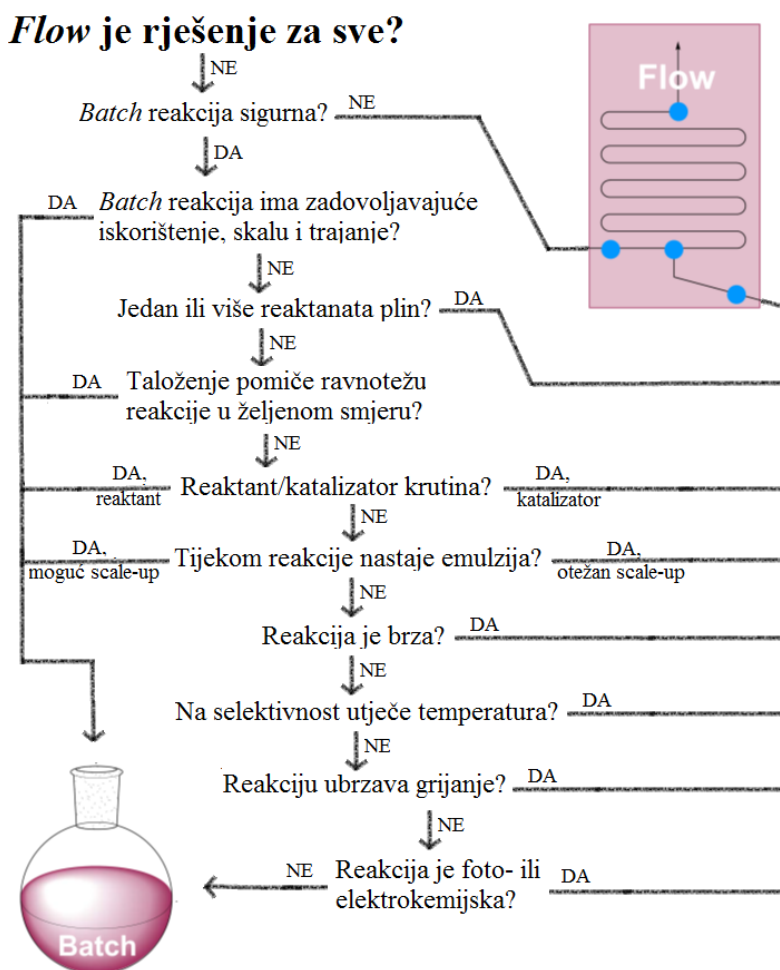
**Slika 12.** Nedostaci *batch* reakcija koji se mogu riješiti *flow*-pristupom.<sup>2</sup>

Kod *flow*-reakcija manji je temperaturni gradijent bilo da se radi o reakcijama pri visokim ili niskim temperaturama. Prijenos topline ovisi i o materijalu reaktora te ga treba birati tako da temperaturni gradijent između ulaza i izlaza reaktora bude što manji.<sup>2</sup>

## 2.2. FLOW VS BATCH

Iako mnoge reakcije u mikroskalama nadmašuju *batch* uvjete, *flow*-kemija nije rješenje za sve probleme i financijski i vremenski troškovi nekih procesa nadmašuju koristi koje *flow*-pristup nudi.<sup>2</sup>

Na Slici 13 prikazan je dijagram koji nudi generalizirani odgovor treba li koristiti *batch* ili *flow*-proces ovisno o svojstvima reakcije.<sup>2</sup>



**Slika 13.** Dijagram odluke za *flow*- odnosno *batch* reakciju.<sup>2</sup>

Kod sigurnosti se razmatraju opasne kemikalije, izmjena topline i visoki tlakovi gdje *flow*-pristup ima prednost zbog rada s malim količinama kemikalija i bolje kontrole reakcijskih uvjeta.<sup>2</sup>

Za nove reakcije bolje je započeti ispitivanja u šaržnim reaktorima, osim kada je početni reagens vrlo rijedak ili jako otrovan. U tom slučaju mali volumen reaktora omogućuje analizu velikog broja reakcija uz minimalnu potrošnju kemikalija.<sup>2</sup>

Optimizacija temperature i vremena je lakša u *flow*-reaktoru budući da se temperatura u reaktoru lako regulira i vrijeme je precizno kontrolirano putem namještenih protoka.<sup>2</sup>



*Flow*-reakcije nadmašuju one šaržne kada je jedan od reaktanata plin jer nema praznog prostora iznad otopine i povećana je topljivost plina primjenom tlaka. Kod reakcija s krutinama moguća su tri tipa reakcija. Kada je reakcija taložna treba izabrati *batch*-reaktor jer taloženje kod *flow*-reaktora dovodi do začepjenja pojedinih dijelova sustava. Postoje specijalizirani mješači, no kod nastupanja problema potrebna su naprednija inženjerska znanja. Kod suspenzija je također bolji *batch* pristup, dok su kod heterogene katalize preferirani *flow*-uvjeti. Kod reakcija u sustavima tekuće-tekuće snažno miješanje može dovesti do nastajanja emulzija i lakše je provesti reakciju šaržno, osim kada su zahtijevane homogene i visoko reproducibilne emulzije. Kod *flow*-reakcija emulzije su homogenije obzirom na veličinu kapljica.<sup>2</sup>

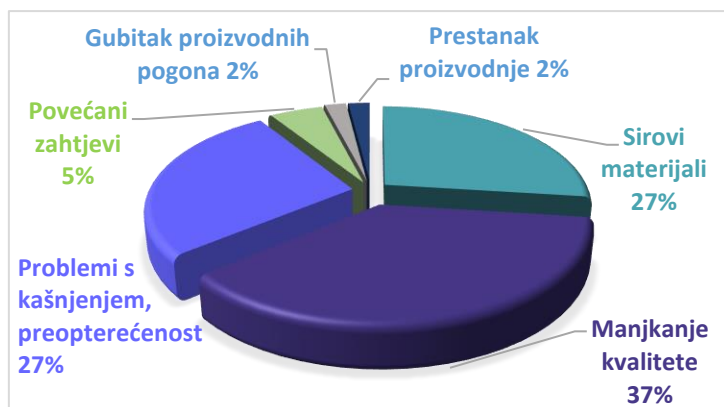
Kod jako brzih reakcija miješanje ima vrlo važnu ulogu. Kod šaržnih reakcija reaktanti se miješaju određeno vrijeme dok se ne postigne homogena reakcijska smjesa, nakon čega se namješta temperatura pri kojoj dolazi do reakcije. Za sintezu na maloj skali pogodna je *batch* sinteza, no za preparativne količine kod nekih reakcija dolazi do malog iskorištenja zbog lošeg miješanja i/ili prijenosa topline. Kod *flow*-reakcija, miješanje i prijenos topline su bolji pa su iskorištenja brzih egzotermnih reakcija veća. Poboljšana je i selektivnost zbog užeg temperaturnog profila pa se mogu eliminirati sporedne reakcije.<sup>2</sup>

Fotokemijske i elektrokemijske reakcije imaju više prednosti pri *flow*-uvjetima. Reakcijska smjesa je zbog malih dimenzija reaktora jednoličnije ozračena, a elektrokemijske reakcije se mogu provesti bez potpornih elektrolita čime su smanjeni troškovi i olakšano pročišćavanje. Kontinuirano izlaženje produkta i poboljšani prijenos mase doprinose kvaliteti reakcije.<sup>2</sup>

### **2.3. PRIMJENA FLOW-KEMIJE**

Budući da su *flow*-reaktori komercijalno dostupni, omogućeno je istraživanje njihove primjene u raznim područjima.<sup>1</sup> Primjena *flow*-reakcija omogućila je značajan napredak u raznim poljima kemije i tako poboljšala kvalitetu života, no osim pozitivnih učinaka moguća je i njihova zlouporaba kod proizvodnje raznih ilegalnih supstanci, droga ili terorističkih sredstava. Za razliku od geografski ovisnih droga (npr. heroin, kokain, kanabis), proizvodnja sintetičkih droga ne ovisi o tome i razvoj novih tehnologija može unaprijediti ilegalnu proizvodnju. Kod proizvodnje eksploziva reakcije nitriranja su ključni stupanj sinteze. Brojne reakcije nitriranja provedene su u *flow*-uvjetima budući da je sigurnost i kontrola reakcije značajno povećana.<sup>4</sup>

Posljednih godina poseban napredak zabilježen je kod sinteze aktivnih farmaceutika i *flow*-kemija se u kratkom periodu od sinteze u jednom koraku razvila do integriranih sinteza u više koraka s uključenim pročišćavanjem.<sup>37-39</sup> Veliki napredak *flow*-procesa kod aktivnih farmaceutika postignut je kod kombinacije lijekova za cističnu fibrozu 2015. godine (lumacaftor/ivacaftor, Orkambi, Vertex), a 2016. godine za antiretrovirusni lijek (darunavir, Prezista, Johnson & Johnson). Usprkos konzervativnoj prirodi farmaceutske industrije, utjecaj *flow*-kemije u različitim stadijima proizvodnje je sve veći – od istraživanja i razvoja lijeka pa do proizvodnje.<sup>40</sup> Ovakav pristup ima obećavajuće prognoze za rješavanje aktualnih i vrlo osjetljivih društvenih problema: nedostatak lijekova, dostupnost u udaljenim područjima, spori razvoj novih i slaba ulaganja u lijekove za rijetke bolesti te previsoki troškovi proizvodnje za zemlje u razvoju.<sup>40-45</sup> Nedostatku lijekova vode problemi vezani za proizvodnju (Slika 14), a najviše nedostaje antibiotika, kemoterapeutika, anestetika i kardiovaskularnih lijekova.<sup>4</sup>



**Slika 14.** Problemi kod proizvodnje koji vode nedostatku lijekova.<sup>46</sup>

Većina sadašnjih farmaceutskih procesa oslanja se na šaržnu sintezu, pročišćavanje i izolaciju sa slabom učinkovitosti i produktivnosti te nedostatkom kvalitete. Kontinuirana proizvodnja lančanim procesima od sinteze aktivnog sastojka do konačnog lijeka omogućuje pouzdaniji, reproducibilniji i učinkovitiji proizvodni proces, a fleksibilnost *flow*-procesa proizvodnju lijekova obzirom na potražnju.<sup>4</sup> Za zemlje u razvoju nedostatak nekih osnovnih lijekova može biti poguban i ozbiljno ugroziti lokalno stanovništvo. Od lijekova koji se konzumiraju u Africi samo 2 % se proizvodi na kontinentu.<sup>47</sup> Svjetska zdravstvena organizacija sastavlja listu lijekova koji su sigurni, isplativi i efikasni za osnovne potrebe ovisno o trenutnom stanju i potrebama u budućnosti.<sup>4</sup>

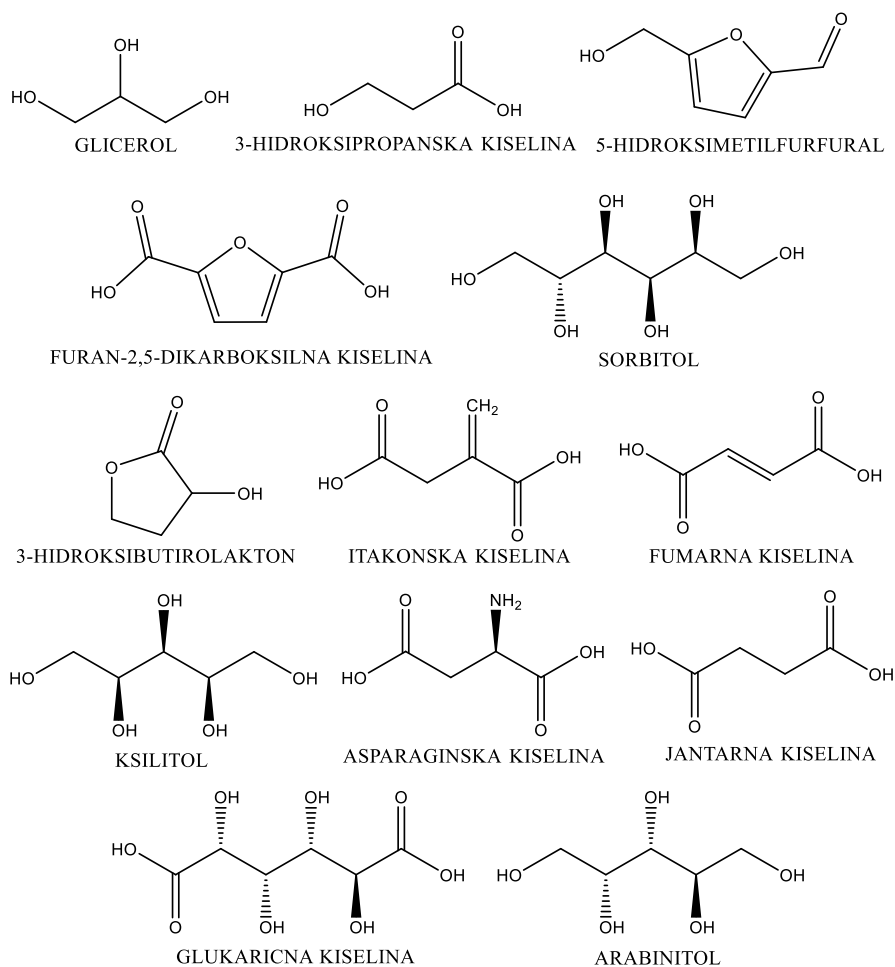
Peptidi su moćne mete za razvoj novih terapeutika, a već razvijeni lijekovi na bazi peptida su pokazali sigurnu i učinkovitu primjenu i predviđa im se rast u budućnosti. Na svjetskom tržištu je trenutno odobreno oko 70 lijekova,<sup>48</sup> a od prihvaćenih lijekova 2016. godine u SAD 10 % je bilo na bazi peptida.<sup>49</sup> Više od 500 raznih lijekova je na predkliničkim ispitivanjima, a više od 140 na

kliničkim.<sup>50</sup> Iako su obećavajući i razvijaju se, primjenom *flow*-kemije omogućio bi se brzi prijenos lijeka iz laboratorija na tržište i veće iskorištenje kompleksnih reakcija što čini *flow*-pristup potencijalno vrlo učinkovitim za korištenje u peptidnoj kemiji.<sup>4</sup> Haswell i suradnici<sup>51</sup> su 2011. godine po prvi put sintetizirali homogeni peptid u kapljevitoy fazi *flow*-reakcijom u staklenom mikroreaktoru. Iako su sintetizirani samo dipeptidi, ovo je bio veliki napredak i temelj za daljnji razvoj. Sinteza peptida u krutoj fazi kod šaržnih reakcija je dugotrajna i upotrebljavaju se velike količine reagensa. Upotrebom radijalnih mikrofluidnih sustava s više kanala omogućena je automatizirana i istovremena sinteza šest različitih peptida.<sup>4</sup> Fülöp i suradnici<sup>52</sup> su 2014. godine proveli iznimno učinkovitu i ekonomičnu *flow*-sintezu peptida u krutoj fazi s reduciranom količinom početnih aminokiselina i visokom konverzijom.

Upotreba mikroreaktora pokazala je moguću kontrolu prosječne molekulske mase polimera (Poly(Lis), 160) mijenjanjem brzina protoka ulaznih otopina. Prosječna molekulska masa ovako sintetiziranih polimera ima užu raspodjelu od onih sintetiziranih šaržno.<sup>4</sup>

U velikom broju radova *flow*-kemija je prikazana kao pogodna za održivi razvoj i zelenu kemiju.<sup>53-59</sup> Mnogi aspekti pomažu organskim i procesnim kemičarima u razvoju novih strategija za kemiju baziranu na prirodnim izvorima.<sup>60</sup> Stalni interes je prisutan kod istraživanja bioizvora za proizvodnju kemikalija koje se inače dobivaju iz sirove nafte i konvencionalnih petrokemijskih izvora.<sup>61</sup> Europskoj Uniji je cilj da do kraja 2020. godine 30 % kemijske industrije bude zasnovano na prirodnim izvorima.<sup>4</sup>

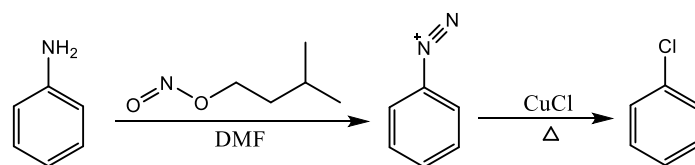
Američki odjel za energiju je 2004. godine iznio pregled pogodnih spojeva iz biomase (Slika 15) koji mogu biti izvor za pripravu olefina i drugih kemikalija koje su inače iz petrokemijskih izvora.<sup>62,63</sup> Podaci iz 2018. godine pokazuju da se većina istraživanja temeljila na polovici spomenutih spojeva sa Slike 15.<sup>4</sup> Većina *flow*-istraživanja odnosi se na upotrebu glicerola i 5-hidroksimetilfurfurala, a značajno manje na sukcinu, fumarinsku i itakonsku kiselinu.<sup>4</sup> 5-hidroksimetilfurfural nije bio na listi iz 2004. godine, no privlači pozornost i zanimanje.<sup>64</sup>



**Slika 15.** Najkorisnije molekule iz bioizvora prema US Department of Energy (2004).<sup>62</sup>

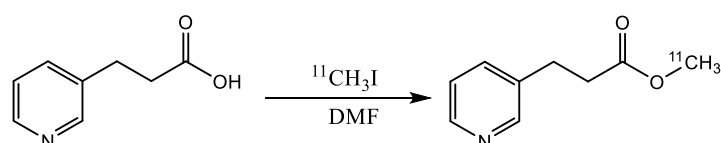
## 2.4. PRIMJERI *FLOW*-REAKCIJA

Kemija diazonijevih soli je jedno od područja sintetske kemije s opasnim kemikalijama budući da su pomenute soli osjetljive na svjetlo i toplinu što može dovesti do nekontrolirane dekompozicije uz eksploziju. Obzirom da je sinteza korisna i primjenjuje se kod azo-boja, hidroksiarena i klorarena, nužna je rigorozna kontrola reakcijskih uvjeta prilikom sinteze na većoj skali.<sup>1</sup> Fortt i suradnici<sup>65</sup> su istraživali sintezu klorarena u staklenom mikroreaktoru (dimnezije kanala: 150 μm × 50 μm × 3,6 cm) koja je prikazana na Shemi 1. Kod pripreme diazonijeve soli vrlo opasan je izopentilni nitrit koji se razgrađuje i u hladnjaku tako da je njegova upotreba u industrijskoj skali limitirana. Istraživanje je pokazalo da je konverzija porasla na 71 % u odnosu na 40 % kod sinteze u tikvici.



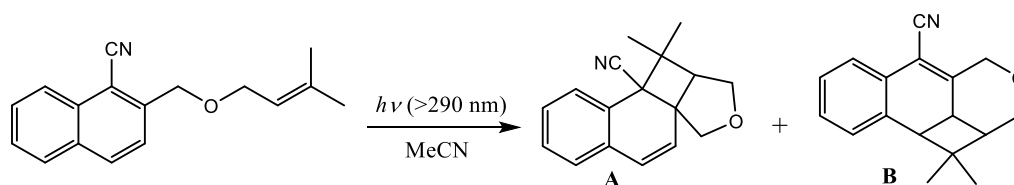
**Shema 1.** Sinteza i reakcija diazonijevih soli.

Lu i suradnici<sup>66</sup> su proveli brzu radiokemijsku reakciju (Shema 2) kod koje je općenito kratko vrijeme poluživota nekih izotopa ograničavajući faktor. Reakcija je provedena u staklenom mikroreaktoru (dimenzije kanala: 220  $\mu\text{m}$   $\times$  60  $\mu\text{m}$   $\times$  1,4 cm).



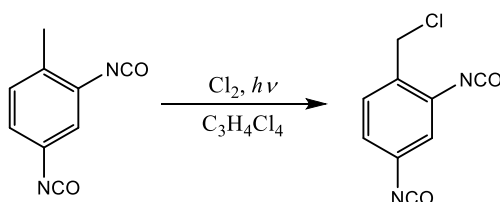
**Shema 2.** Metiliranje 3-piridin-3-il-propanske kiseline.

Fotokemijske reakcije predstavljaju zeleni pristup sintezi kompleksnih molekula, no *scale-up* je ograničen jačinom izvora zračenja. Budući da su stakleni mikroreaktori prozirni, idealni su za istraživanje fotokemijskih procesa.<sup>1</sup> Mizuno i suradnici<sup>67</sup> su prikazali povećanje učinkovitosti i regioselektivnosti provođenjem intramolekulske fotocikloadicije 1-cijanonaftalenskog derivata u prozirnem mikroreaktoru (Shema 3). *Batch* sintezom osvjetljavanjem ksenonskom lampom ( $\lambda > 290$  nm) dobiveni su fotocikloadukti **A** (56 %) i **B** (17 %). Provedbom reakcije u mikroreaktoru tijekom samo 3-4 minute željeni spoj **A** je dobiven u iskorištenju od 59 %, a **B** od 9 %.



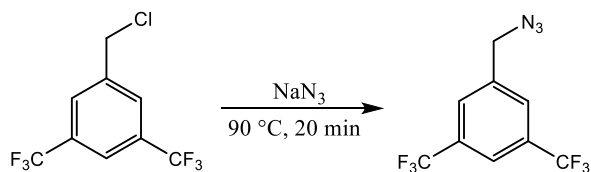
**Shema 3.** Fotocikloadicija 1-cijanonaftalenskog derivata.

Fotokemijska reakcija u mikroreaktoru može se provesti i s plinovima, na primjer s molekulom klora kao što je prikazano na Shemi 4 u reakciji kloriranja toluen-2,4-diizocijanata.<sup>68</sup>



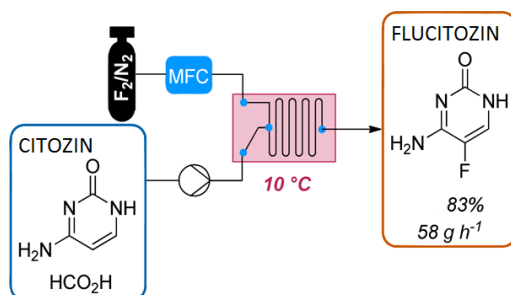
**Shema 4.** Fotokemijsko kloriranje toluen-2,4-diizocijanata.

Azidi su skupina spojeva korisna kod sintetičkih procesa, no zbog opasne pripreve upotreba im je ograničena.<sup>1</sup> Kopach i suradnici<sup>69</sup> su razvili *flow*-reaktor primjeren za sintezu azida iz klorida (Shema 5). Koristeći reaktor s kanalima od nehrđajućeg čelika (dimenzije kanala: 1,59 mm (vanjski promjer) × 0,64 mm (unutarnji promjer) × 63,1 m (dužina)) volumena 20 mL istraživali su reakciju pri različitim temperaturama. Zaključili su da su optimalni uvjeti od 90 °C s vremenom zadržavanja od 20 minuta čime je dobiven azid s konverzijom od 97 %. Kontinuiranom sintezom tijekom 2,8 sati dobiveno je 25 g azida u iskorištenju od 94 % nakon ekstrakcije.



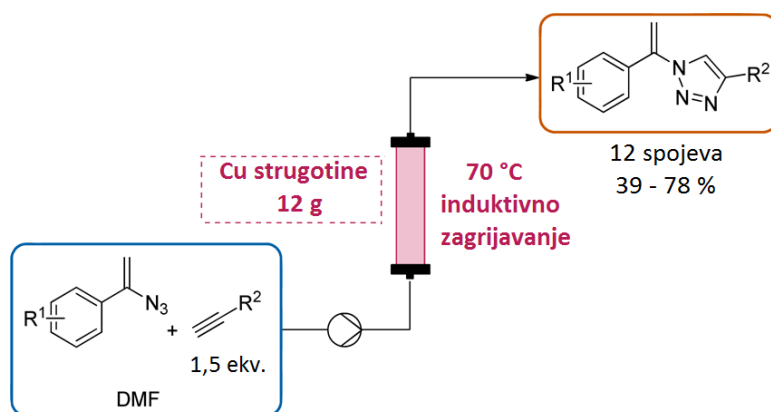
**Shema 5.** Sinteza azida.

Nakon optimiranja uvjeta za sintezu flucitozina u *coil*-reaktoru, Harsanyi i suradnici<sup>70</sup> su proveli *scale-up* u čip-reaktoru i sintetizirali flucitozin iz otopine citozina u mravljoj kiselini i smjese fluora s 10 % dušika (Slika 16). Reakcija je provedena pri 10 °C i atmosferskom tlaku s iskorištenjem od 83 %.



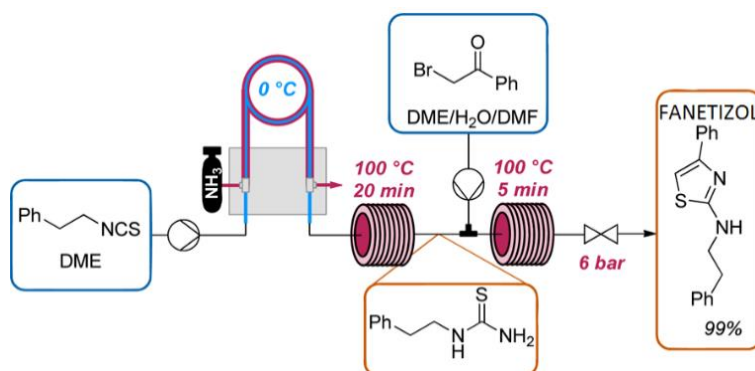
**Slika 16.** Sinteza flucitozina iz citozina.

Kirschning i suradnici<sup>71</sup> proveli su Huisgenovu cikloadiciju vinilnog azida i alkina u *packed bed*-reaktoru sa strugotinama bakra kao katalizatorom (Slika 17). Sintetizirano je 12 različitih 1,4-disupstituiranih-1,2,3-triazola u iskorištenjima od 39-78 %.



**Slika 17.** Huisgenova cikloadicija vinilnog azida i alkina s Cu-katalizatorom.

Na Slici 18 prikazana je višestupnjevita sinteza fanetizola u *coil*-reaktorima. Otopljeni 2-feniletil-izotiocijanat se uvodi u ohlađenu cijev u koju se uvodi i amonijak. Amonijak se otapa i reakcijska smjesa se uvodi u *coil*-reaktor te zagrijava 20 minuta na 100 °C. Nastaje derivat tiouree kao intermedijer i u sustav se uvodi otopina 2-bromacetofenona. Nova reakcijska smjesa ulazi u novi *coil*-reaktor i zagrijava 5 minuta na 100 °C te nastaje produkt fanetizol u iskorištenju od 99 %.<sup>72</sup>

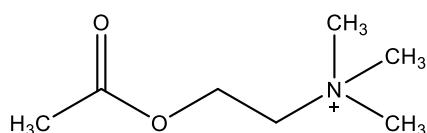


**Slika 18.** Višestupnjevita sinteza fanetizola.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. UVOD

Acetilholin (ACh) strukture kao na Slici 1 je prvi otkriveni i jedan od glavnih prijenosnika živčanih impulsa koji djeluje na širokom području.<sup>73</sup> Tijekom neurotransmisije acetilholin se ispušta iz sinaptičkog mjehurića presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu i veže se na acetilkolinске receptore na postsinaptičkoj membrani neurona.<sup>73,74</sup> Vežanje ACh na receptore rezultira depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom živčanog impulsa. Enzim acetilkolinesteraza (AChE) hidrolizira ACh čime se ponovno uspostavlja polarizacija membrane i prestaje prijenos signala.<sup>74</sup> Produkt hidrolize, kolin vraća se u presinaptički neuron i s acetyl-CoA stvara novi acetilholin.<sup>73</sup> Hidroliza ACh je neophodan proces kod zdravih ljudi budući da njegovo nakupljanje dovodi do prekomjerne stimulacije i poremećaja živčanih impulsa te pojave ataksije, respiratorne paralize, napadaja, kome te na kraju i smrti.<sup>75</sup>



**Slika 1.** Struktura acetilkolina.

Butirilholinesteraza (BChE) je enzim analogan AChE koji preferirano hidrolizira veće supstrate od acetilkolina, no kada je AChE potrošena ima ulogu koregulatora kolinergične transmisije i hidrolizira ACh.<sup>76,77</sup> Nalazi se u centralnom nervnom sustavu (CNS), no većina je u plazmi pa je BChE *sakupljač* raznih štetnih tvari (organofosfati, karbamati...) prije no što dođu do AChE i uzrokuju njenu inhibiciju.<sup>78,79</sup> Kolinesteraze mogu biti inhibirane reverzibilnim inhibitorima koji imaju terapijski učinak i djeluju samo određeno vrijeme dok se enzim ne reaktivira spontano ili ireverzibilnim inhibitorima koji se vežu kovalentno i toksični su.<sup>73</sup>

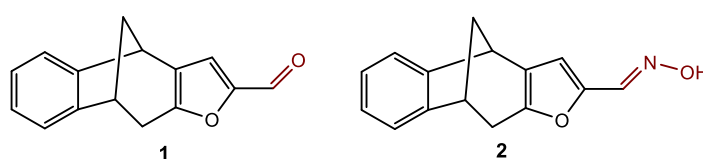
Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je progresivni i degenerativni poremećaj mozga te najčešći oblik demencije kod starijih osoba. Bolest je povezana s disfunkcijom kolinergičnog sustava i smanjenom razinom acetilkolina u mozgu što uzrokuje probleme s učenjem, pamćenjem i izvođenjem svakodnevnih aktivnosti.<sup>80-83</sup> AD se ne može izliječiti, no postoje terapijski koji usporavaju njezin napredak i olakšavaju simptome.<sup>84-86</sup> Trenutno odobreni lijekovi uključuju inhibitore kolinesteraza, osobito reverzibilne inhibitore acetilkolinesteraze (AChE).<sup>86,87</sup> Utvrđeno je da kod AD aktivnost AChE opada, dok aktivnost BChE ostaje nepromijenjena ili se



povećava što govori da značaj BChE kod hidrolize ACh tijekom bolesti raste i BChE ima značajnu ulogu kod razvoja bolesti.<sup>77</sup>

Kvaterni oksimi pokazali su se kao dobri reaktivatori AChE inhibirane organofosfatnim živčanim otrovima cijepanjem veze između fosfilne skupine i enzima.<sup>88</sup> Oksimi osim AChE mogu reaktivirati i BChE), ali i inhibirati aktivnost oba enzima. Vrlo važni su kod reaktivacije AChE u nikotinskoj sinapsi i obnovi neuromuskularne funkcije te reverzibilne paralize skeletnih mišića.<sup>89</sup> *O*- i *N*-alkilni derivati oksima pokazali su fiziološku i biološku aktivnost kao antibiotici i antihistaminici.<sup>90-93</sup> Ovi spojevi korisni su kao polazni materijali u konstantno rastućoj farmaceutskoj industriji i istraživano je alkiliranje aldoksima i ketoksima s alkil halogenidima.<sup>94,95</sup>

Benzobicyklo[3.2.1]oktadieni pokazali su se kao potencijalni lijekovi CNS. Prethodno sintetizirani derivati benzobicyklo[3.2.1]oktadiena preliminarno su testirani kao inhibitori kolinesteraza i rezultati su u procesu publiciranja. Budući da su rezultati inhibicije obećavajući, istraživanja je daljnja funkcionalizacija osnovnog skeleta. Cilj je sintetizirati knjižnicu spojeva posebno novih oksima i oksimskih etera. Kao početni supstrat izabran je formil-benzobicyklo[3.2.1]oktadien **1** (Slika 2) koji se prevodi u oksim **2** kao intermedijer do oksimskih etera. Prema predviđanju ADME svojstava putem Pass (*in silico*) programskog paketa [<http://www.way2drug.com/PASSOnline/>], oksimski derivati pokazali su dobru permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru i optimalnu lipofilnost prema kojima bi ovi spojevi trebali imati dobre predispozicije da postanu lijekovi za CNS.

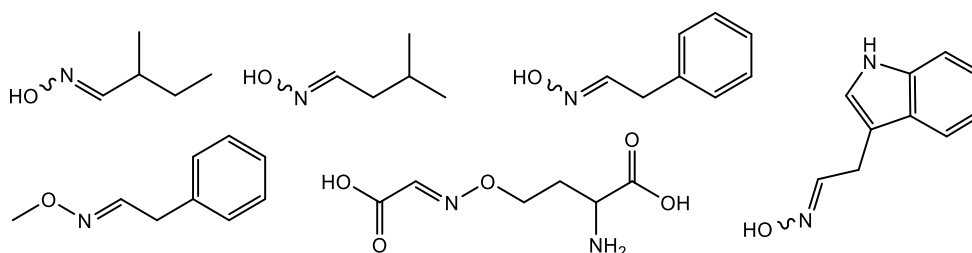


**Slika 2.** Struktura formil-benzobicyklo[3.2.1]oktadiena **1** i odgovarajućeg oksima **2**.

### 3.2. OKSIMI I OKSIMSKI DERIVATI

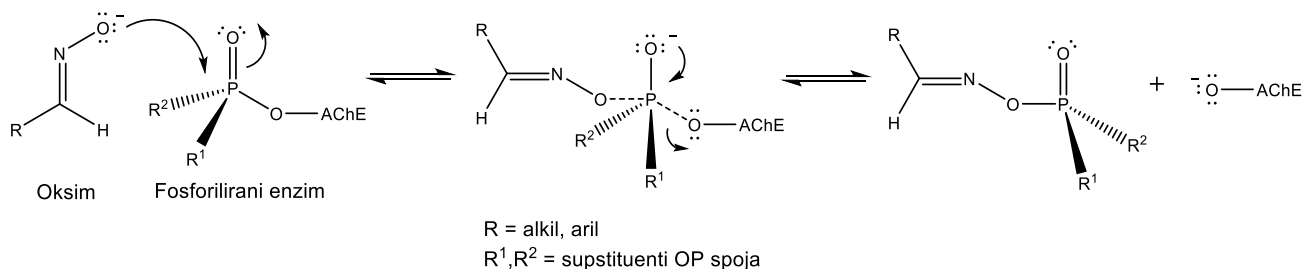
Oksimi i njihovi derivati su od širokog interesa kao biološki aktivne molekule sa širokim spektrom djelovanja.<sup>96</sup> Oksimski eteri pokazali su antiprotozoarnu, antibakterijsku, antienterovirusnu, antifungalnu, antineoplastičnu, antikonvulzivnu i antimikrobiološku aktivnost.<sup>97-102</sup> Primjenjuju se i kao nesteroidni protuupalni lijekovi,<sup>98</sup> beta adrenergički lijekovi,<sup>99</sup> inhibitori plijesni<sup>100</sup> i regulatori

staničnog rasta.<sup>102</sup> Razni oksimski derivati pokazali su i antikolinergičnu, insekticidalnu i akaricidnu aktivnost.<sup>103-105</sup> Oksimi djeluju kod neurodegenerativnih bolesti poticanjem ekspresije proteina toplinskog šoka i poticanjem normalnog smatanja proteina, a degradaciju krivo smotanih.<sup>106</sup> Oksimski derivati pokazuju i dobra svojstva kod ateroskleroze inhibicijom enzima lipoprotein-vezana fosfolipaza A2 (Lp-PLA2) koja je povezana s prevencijom i liječenjem ateroskleroze.<sup>107</sup> Oksimi i njihovi derivati imaju važnu ulogu kod biljaka u regulaciji rasta, obrane, privlačenja za oprašivanje i komunikaciji s okolinom u obliku hlapljivih organskih spojeva.<sup>108,109</sup> Većina izoliranih oksima i oksimskih etera iz biljaka jednostavni su derivati aminokiselina, dok su kompleksniji rijetko prisutni (Slika 3).<sup>110</sup>



**Slika 3.** Strukture nekih oksima i oksimskih etera izoliranih iz biljaka.

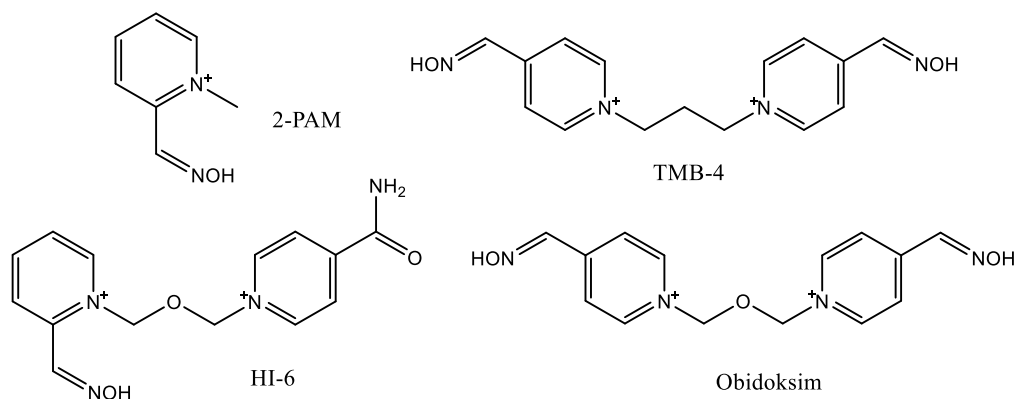
Najučestalija primjena oksima je u terapiji trovanja organofosfatima do kojeg može doći izlaganjem pesticidima ili živčanim bojnim otrovima. Oksimi odgovarajuće strukture reaktiviraju organofosfatima inhibiranu AChE u zadovoljenim uvjetima (pKa, pH, temperatura, tlak...).<sup>111-114</sup> Za sada su oksimi najbolji nukleofili koji pri fiziološkom pH mogu pocijepati vezu enzim-organofosfat.<sup>115</sup> Oksim napada elektrofilni fosforov atom čime se cijepa veza fosfor-serin i nastaje slobodan enzim i fosfilirani oksim (Shema 1).<sup>116</sup> Odabrani oksim ne smije imati afinitet za reinhibicijom budući da fosfilirani oksim može reinhibirati AChE jače od početne inhibicije.<sup>117</sup>



**Shema 1.** Mehanizam oksimske reaktivacije fosforilirane AChE.

Za medicinsku upotrebu odobreni oksimi su pralidoksim (2-PAM), HI-6, obidoksim i trimedoksim (TMB-4) (Slika 4).<sup>116</sup> Iako se većina istraživanja i razvoja temelji na spojevima s pozitivnim *N* atomom piridinskog prstena, nabijeni oksimi slabo prolaze krvno-moždanu barijeru pa se sve više

istražuju nenabijeni alifatski oksimi.<sup>118-122</sup> Koncentracija nabijenih oksima u mozgu ne prelazi 10 % koncentracije u plazmi pa djeluju uglavnom na periferni živčani sustav i reaktiviraju tek mali dio inhibirane AChE u mozgu.<sup>123</sup> Danas se kao terapija pri trovanju organofosfatima primjenjuje kombinacija antikolinergika (atropin), oksima i antikonvulziva (diazepam)<sup>124,125</sup> koja se mora primijeniti u što kraćem roku.<sup>116</sup>

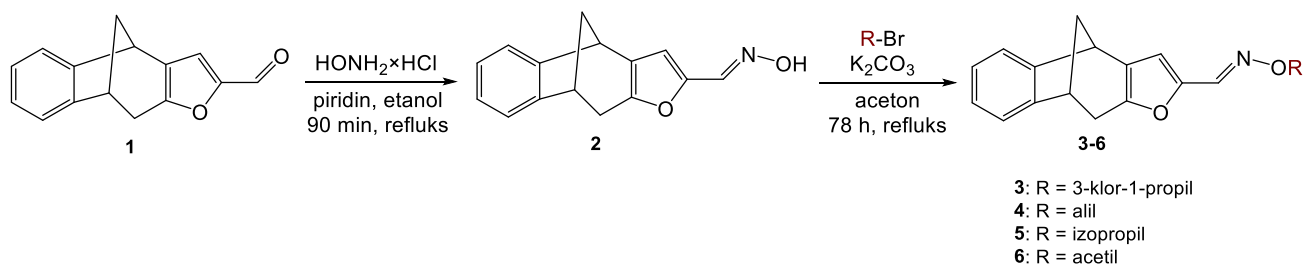


**Slika 4.** Strukture kliničkih oksima kao reaktivatora ChE.

Oksimi mogu biti toksični i interferirati s drugim lijekovima te još uvijek ne postoji univerzalni reaktivirajući oksim pa je sinteza novih oksima od stalnog interesa.<sup>126,127</sup> Trenutno dizajnirani oksimi su uglavnom reaktivatori AChE, a vrlo malo je onih za BChE koja je prirodni čistač organizma i učinkoviti reaktivator mogao bi koristiti za preventivne svrhe.<sup>116</sup> Budući da ulaze u aktivno mjesto enzima, oksimi mogu biti i reverzibilni inhibitori AChE i BChE što bi također koristilo za preventivnu primjenu, ali i kod smanjenja simptoma Alzheimerove bolesti budući da se inhibicijom enzima razina acetilkolina povećava, čiji nedostatak uzrokuje simptome.<sup>113</sup>

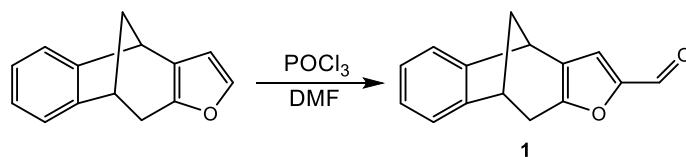
### 3.2.1. Sinteza oksima i oksimskih etera

Formilni derivat furo-benzobicyklo[3.2.1]oktadiena **1** prethodno je priređen u laboratoriju,<sup>128</sup> a u ovom radu služi kao početni spoj za sintezu bicikličkog oksima **2** koji se dalje prevodi u oksimske etere **3-6** (Shema 2), potencijalne inhibitore kolinesteraza.



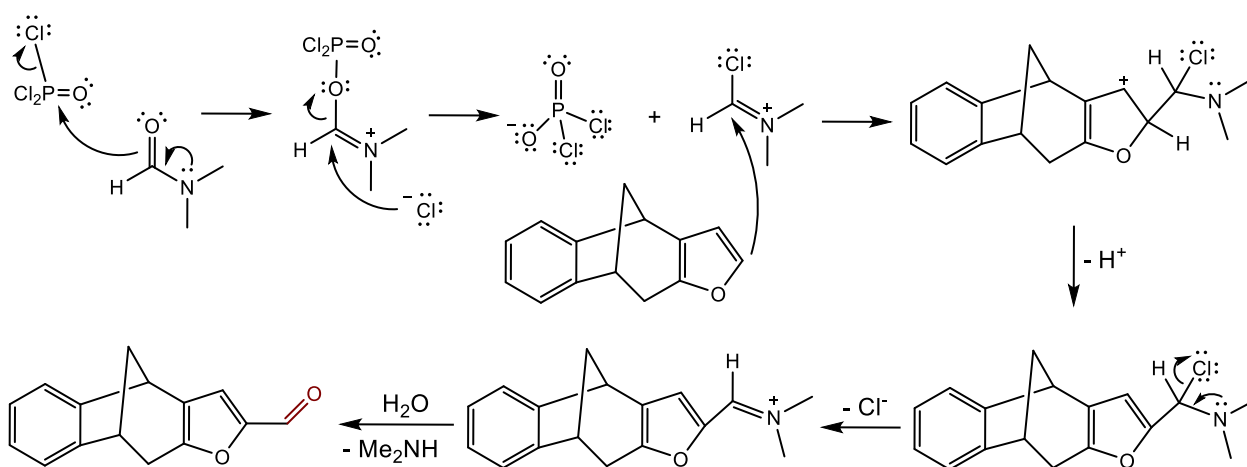
**Shema 2.** Sinteza oksima **2** i oksimskih etera **3-6**.

Na Shemi 3 prikazana je sinteza formil-benzobicyklo[3.2.1]oktadiena **1** Vilsmeierovom reakcijom formiliranja iz odgovarajućeg nesupstituiranog benzobicykličkog fotoprodukta.



**Shema 3.** Vilsmeierova sinteza formil-benzobicyklo[3.2.1]oktadiena **1**.

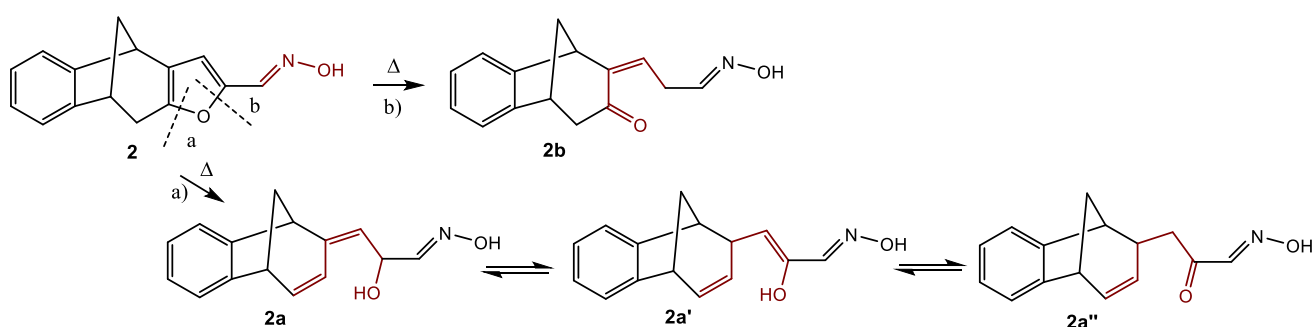
Reakcijom  $\text{POCl}_3$  i *N,N*-dimetilformamida (DMF) *in situ* nastaje Vilsmeierov kompleks za formiliranje koji s furo-benzobicyklo[3.2.1]oktadienom reagira u formilni derivat **1**. Na Shemi 4 prikazan je mehanizam reakcije.



**Shema 4.** Mehanizam Vilsmeierove reakcije formiliranja.

$\text{POCl}_3$  je prozirna dimeća tekućina oštrog mirisa koja nagrizava metale i tkivo. Otrovan je ako se udiše ili proguta. Jako iritira kožu i tkiva uzrokujući opekline sluznice usta i probavnog trakta što može biti smrtonosno. Burno i egzotermno reagira s vodom uz moguće prskanje pri čemu nastaju dimeća fosforna i klorovodična kiselina, a reagira i s vlagom iz zraka. Zagrijavanjem se oslobađaju otrovni, korozivni i iritantni plinovi fosforin oksida i klorida pa se dobivanje Vilsmeierovog kompleksa provodi pri sniženim temperaturama.  $\text{POCl}_3$  se dodaje tek kada je temperatura DMF manja od  $10\text{ }^\circ\text{C}$ .  $\text{POCl}_3$  može zapaliti druge zapaljive materijale kao što su drvo, ulje ili papir i može eksplozivno reagirati s acetonom ili drugim ketonima i diizopropil eterom ili drugim eterima u prisutnosti metalnih soli u tragovima, a s cinkovim prahom izaziva trenutno zapaljenje oslobađanjem fosfinskog plina.<sup>115</sup> Zbog navedenih svojstava  $\text{POCl}_3$  zahtijeva posebno oprezno rukovanje pa je prvi put provedena i *flow*-sinteza formil-benzobicyklo[3.2.1]oktadiena **1** u mikroreaktoru (Poglavlje 3.3. Mikro-*flow* formiliranje).

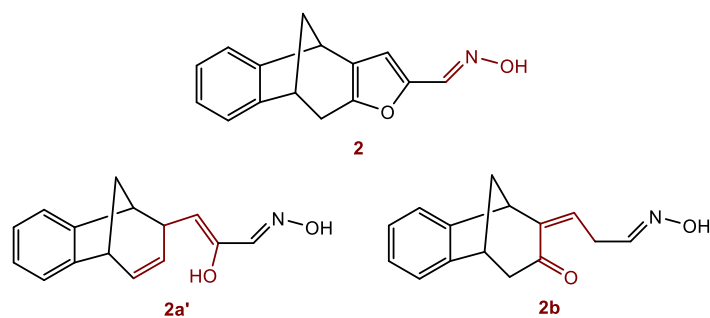
Prema Shemi 2 formilni derivat **1** s hidroksilamin-hidrokloridom reagira u odgovarajući biciklički oksim **2**, no tijekom reakcije uslijed zagrijavanja dolazi i do otvaranja furanskog prstena i nastanka različitih oksimskih derivata (Shema 5). Furanski prsten može se otvoriti u dva smjera. Kod orijentacije **a** furanski prsten cijepa se između kisika i bicikličkog alifatskog dijela molekule. U ovom slučaju kisik postaje supstituent alifnog dijela molekule u obliku hidroksilne ili karbonilne skupine. Spojevi **2a** i **2a'** imaju hidroksilnu skupinu, a razlikuju se po položaju dvostruke veze. Jedna dvostruka veza iz furanskog prstena ostaje kao dio bicikličkog ostatka u oba spoja, a druga može zauzeti dva položaja. Spoj **2a''** ima karbonilnu skupinu i dvostruku vezu od furanskog prstena samo kao dio bicikličkog ostatka molekule.



**Shema 5.** Dva načina otvaranja furanskog prstena kod oksima **2**.

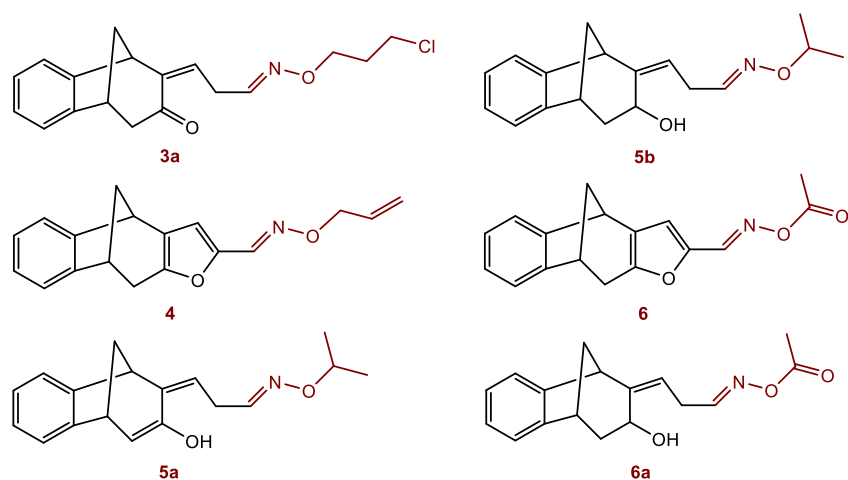
Na Slici 5 prikazane su strukture izoliranih oksima koji su okarakterizirani NMR spektroskopijom. Za zatvoreni oksim **2** u  $^1\text{H}$  NMR spektru karakterističan signal je singlet s pomakom na  $\sim 6$  ppm koji se odnosi na vodikov atom furanskog prstena što je potvrda da je oksim sa zatvorenim furanskim prstenom, za razliku od otvorenih oksima **2a'** i **2b** koji nemaju takav signal. Svi prikazani oksimi imaju signale karakteristične za četiri aromatska protona na  $\sim 7$  ppm koji se u spektru pojavljuju kao multipliciteti ili dubleti i dubleti-dubleta s aromatskom spregom  $\sim 7$  Hz. U aromatskom području vidi se i vodik na C atomu oksimske skupine, dok se hidroksilna skupina na N atomu ne vidi u spektru niti jednog prikazanog oksima. U  $^1\text{H}$  NMR spektru oksima **2** najmanji kemijski pomak imaju protoni metilenskog mosta i vide se kao multiplet na 2,40-2,37 ppm. Najodsjenjeniji proton bicikličkog dijela je vodik koji se nalazi između dva aromatska prstena i pojavljuje se kao dublet na 4,62 ppm. Proton koji se nalazi između benzenskog prstena i  $\text{CH}_2$  skupine je na 3,81 ppm kao dublet, dok se protoni  $\text{CH}_2$  skupine vide kao multiplet na 3,59-3,54 ppm. Kod oksima **2a'**, izuzevši aromatske protone i proton oksimske skupine, najodsjenjeniji je vodik vinilne skupine u alifatskom dijelu oksima i vidi se kao multiplet na 6,76-6,72 ppm, nakon kojeg slijede vinilni protoni cikličkog dijela kao zasebni signali na 6,37 ppm (dublet-tripleta) i 5,33 ppm (dublet-tripleta). Ostali protoni

biciklo-dijela slijede sličan trend kao oni kod oksima **2**: najodsjenjeniji je proton između dvije aromatske jezgre kao multiplet na 4,00-3,97 ppm, zatim protoni uz benzenski prsten i alifatski dio te protoni metilenskog mosta s najmanjim kemijskim pomakom. U  $^1\text{H}$  NMR spektru oksima **2b** nakon aromatskih i oksimskog protona najveći kemijski pomak ima vinilni proton koji se javlja kao multiplet na 5,38-5,33 ppm. Slijede protoni biciklo-dijela molekule s pomacima sličnog trenda kao kod prethodnih oksima, s time da se prije protona metilenskog mosta vide protoni  $\text{CH}_2$  skupine alifatskog dijela kao multiplet na 2,37-2,34 ppm.



**Slika 5.** Izolirani i okarakterizirani oksimi **2**, **2a'** i **2b**.

Tijekom sljedećeg stupnja sinteze (Shema 1), odnosno dobivanja oksimskih etera **3-6** dobiveni su spojevi prikazani na Slici 6 koji su izolirani i okarakterizirani NMR spektroskopijom. Navedeni oksimski eteri imaju zatvoreni ili otvoreni furanski prsten. U ovom trenutku se ne može potvrditi kada je prilikom sinteze došlo do otvaranja prstena. Zanimljivo je za uočiti kako je kod svih izoliranih etera s otvorenim furanskim prstenom kisikov atom, kao karbonilna ili hidroksilna skupina, ostao vezan za ciklički dio što dovodi do zaključka da oksimi koji imaju kisik vezan za ciklički dio lakše reagiraju u etere od oksima s kisikovim atomom vezanim za alifatski dio.



**Slika 6.** Izolirani i okarakterizirani oksimski eteri kao potencijalni inhibitori kolinesteraza.

Obzirom na prisutnost signala na ~6 ppm kao singleta u  $^1\text{H}$  NMR spektrima, zaključeno je radi li se o oksimskim eterima sa zatvorenim ili otvorenim furanskim prstenom. Zatvoreni oksimski eter **4** s

alilnom skupinom vezanom na kisik i **6** s acetilnom skupinom imaju analogne pomake kao kod zatvorenog oksima **2** s dodatnim signalima za alilnu skupinu na 7,37-7,01 ppm (multiplet) i 6,67 ppm (dublet) za vinilne protone te 2,40-2,28 ppm za protone CH<sub>2</sub> skupine spoja **4** te za acetilnu skupinu signal na 1,32 ppm (singlet) za metilne protone. Otvoreni oksimski eter **3a** jedini od izoliranih etera ima karbonilnu skupinu na cikličkom dijelu molekule i analogne je strukture oksimu **2b** s propilkloridnom skupinom vezanom za kisik. Karakteristični pomaci u <sup>1</sup>H NMR spektru su za O-CH<sub>2</sub> protone na 4,34 ppm kao triplet, za Cl-CH<sub>2</sub> protone na 4,32-4,36 ppm kao multiplet i CH<sub>2</sub> protone između na 3,66 ppm koji pokazuju triplet. Kod spoja **5a** nakon aromatskih i oksimskog protona najdosjenjeniji su vinilni protoni. U spektru se na 6,71-6,69 ppm (multiplet) nalazi vinilni proton cikličkog dijela, a na 6,25 ppm (dublet) vinilni proton alifatskog dijela molekule. Slijedi metinski proton kao multiplet na 4,34-4,29 ppm pa signal OH skupine na 4,27 ppm (dublet). Na 4,18 ppm kao multiplet vide se metilenski protoni, a zatim slijede protoni cikličkog dijela sa sličnim trendom pomaka kao kod prethodnih spojeva. Najzasjenjeniji su metilni protoni na 1,43 ppm (dublet). Oksimski eter **5b** se od **5a** razlikuje po nedostatku dvostruke veze u cikličkom dijelu pa više protona pokazuje signale u spektru. Najodsjenjeniji su aromatski, oksimski i vinilni protoni nakon kojih se u spektru na 5,01 ppm kao dublet vidi proton C atoma na koji je vezana OH skupina koja pokazuje signal na 3,65 ppm (singlet). Na 4,55-4,51 ppm kao multiplet vidi se signal za O-CH proton nakon kojeg slijedi multiplet na 4,35-4,27 ppm za metilenske protone alifatskog dijela i proton cikličkog dijela između benzenskog prstena i dvostruke veze. Slijede signali za ostale protone cikličkog dijela analognih pomaka kao i u prijašnjim slučajevima, a nazasjenjeniji su metilni protoni na 1,37 ppm (dublet). Spoj **6a** ima jednaki kostur kao **5b**, a razlika je u acetilnom supstituentu i karakterističan je signal metilnih protona uz karbonilni ugljik na 3,70 ppm (singlet).

### 3.3. MIKRO-FLOW FORMILIRANJE

Kao što je već detaljno opisano u općem dijelu, *flow*-kemija pokazuje niz prednosti kod sinteze s opasnim kemikalijama, ali i kod egzotermnih reakcija kakva je i reakcija Vilsmeierovog formiliranja. Provođenjem *flow*-sinteze umjesto šaržne, treba također biti vrlo oprezan jer je uvijek moguća greška u opremi, ali i ljudska, te treba dobro definirati uvjete pri kojima će se reakcija provoditi, no opasnosti su značajno smanjene boljom kontrolom reakcijskih parametara i činjenicom da se radi s manjom količinom opasnih kemikalija.

*Flow*-formiliranje u ovom radu provedeno je u čip-mikroreaktoru volumena 8,6  $\mu\text{L}$  u 3 različita eksperimenta s različitim protocima reaktanata (Poglavlje 4. Eksperimentalni dio; 4.3. Mikro-*flow* formiliranje). Prije provedenih eksperimenata, u laboratoriju je izveden eksperiment s protocima 20-100  $\mu\text{L min}^{-1}$  od kojih se prema UPLC-MS protok od 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  pokazao kao najbolji. Prikazani eksperimenti provodili su se od 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  prema manjim protocima. Ovakav tip sinteze prvi put je proveden u našem laboratoriju i budući da se pokazala kao siguran način dobivanja spoja koji je početni intermedijer za daljnje reakcije, cilj je u budućnosti nastaviti s optimiranjem uvjeta i dobiti još veća iskorištenja i količine spoja **1** koji će se koristiti u daljnjoj sintezi novih oksimskih i drugih derivata, potencijalno bioaktivnih spojeva.

U prvom eksperimentu (Poglavlje 4.3.1) u čip-reaktor pomoću dvije pumpe uvode se otopina furo-benzobicyklo[3.2.1]oktadiena u DMF i otopina  $\text{POCl}_3$  u DMF. Za svaki protok po tri puta je sakupljeno 100  $\mu\text{L}$  produkta i u svaki uzorak je dodano 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode za zaustavljanje reakcije. Prema TLC pločici razvijenoj u DCM konverzija je potpuna i nema početnog spoja (aldehid ostaje na startu TLC pločice). Čišćenje je provedeno na preparativnom HPLC-u i izolirano je 20 mg produkta (85 %). Od uzoraka je snimljen UPLC-MS koji pokazuje da je najveća količina produkta dobivena s protokom od 16  $\mu\text{L min}^{-1}$  pa od 14  $\mu\text{L min}^{-1}$  (Tablica 1). Iskorištenje se dobilo tako da je stavljeno cca 25 mg na preparativni HPLC i nakon čišćenja izolirano je 20 mg čistog spoja, tj. aldehida (preračunato je iz ukupnog volumena sakupljenog uzorka).

**Tablica 1.** Najbolji protoci prvog eksperimenta mikro-*flow* formiliranja prikazani s vremenom odbacivanja,  $4\tau$  i vremenom sakupljanja,  $t$ .

Protok ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	$4\tau$ (min)	$t$ (min)	Oznaka vijale
16	2,075	6,25	2A, 2B, 2C
14	2,37	7,14	3A, 3B, 3C

U drugom eksperimentu (Poglavlje 4.3.2) serijski su spojena dva čip-mikroreaktora, svaki s dva ulaza i jednim izlazom. U prvi mikroreaktor koji se hladi u ledenoj kupelji na 0-10  $^{\circ}\text{C}$  ulaze DMF i  $\text{POCl}_3$ , a izlaz s nastalim kompleksom za formiliranje spojen je s jednim ulazom u sljedeći mikroreaktor u koji još ulazi i furanski biciklički supstrat za formiliranje, otopljen u DMF. Za svaki protok sakuplja se 300  $\mu\text{L}$  izlaza (konačni produkt) po tri puta. Ovakva izvedba pokazala se kompliciranom budući da ulazi  $\text{POCl}_3$ , DMF i biciklo-spoja imaju različite protoke sa značajnom razlikom. U Tablici 2 prikazani su protoci pojedinih kemikalija. Kod slučaja gdje je protok  $\text{POCl}_3$



2  $\mu\text{L min}^{-1}$  procurio je klip pumpe i uzorci su odbačeni, no ponavljanjem je reakcija uspješno provedena. Prema TLC pločici produkt nastaje, ali ostaje početnog spoja.

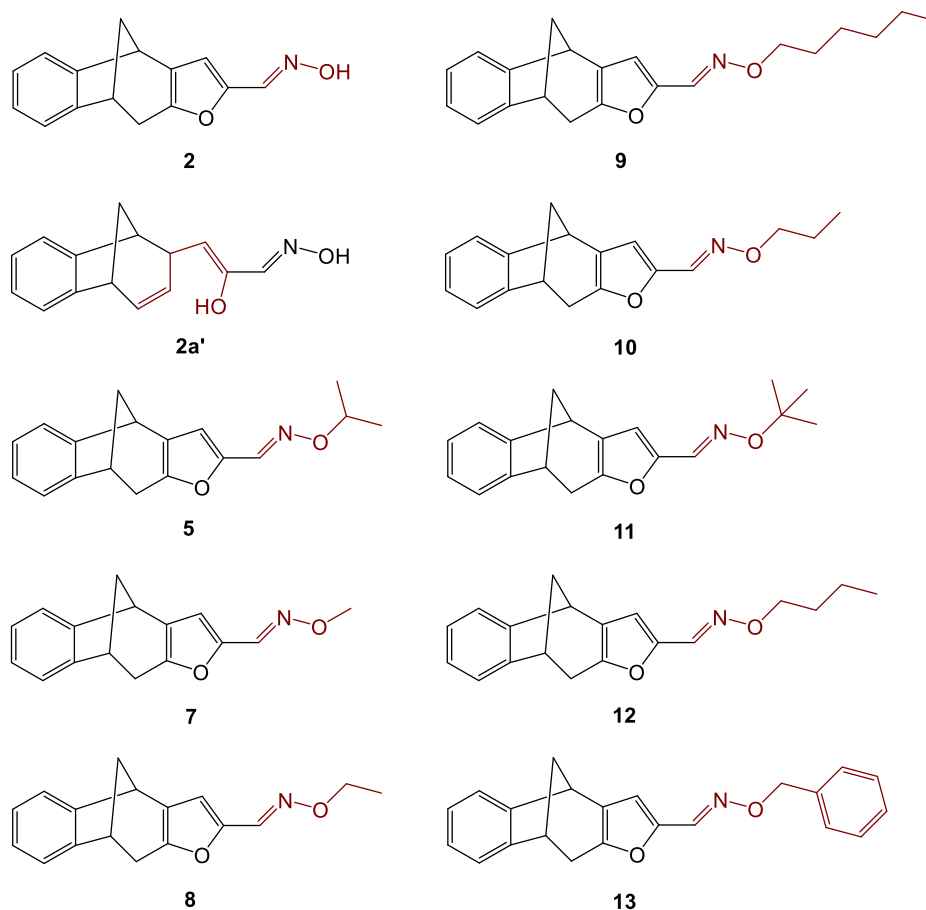
**Tablica 2.** Protoci u drugom eksperimentu mikro-*flow* formiliranja s dva serijski spojena mikroreaktora prikazani s vremenom odbacivanja,  $4\tau$  i vremenom sakupljanja,  $t$ .

Protok	$4\tau$ (min)	$t$ (min)	Oznaka vijale
1 $\mu\text{L min}^{-1}$ $\text{POCl}_3$ 16 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 16 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	2	9,5	8A, 8B, 8C
2 $\mu\text{L min}^{-1}$ $\text{POCl}_3$ 32 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 32 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	2 *procurio klip, odbaciti	5	10A, 10B, 10C

U trećem eksperimentu (Poglavlje 4.3.3) ponovljen je postupak kao u prvom eksperimentu, no s većim količinama i sakupljano je 500  $\mu\text{L}$  produkta. Ovim eksperimentom promatralo se utječe li na reakciju i ako se produkt sakuplja u suhu vijalu pa se dodaje voda ili ako se sakuplja u vijalu s 500  $\mu\text{L}$  vode. Pokazalo se da način sakupljanja ne utječe i reakcijske smjese imaju podjednaki sastav. Kao najbolji protoci su se ponovno pokazali oni od 16 i 14  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

### 3.4. PRIKAZ OKSIMA I OKSIMSKIH ETERA U AKTIVNOM MJESTU AChE I BChE POMOĆU SeeSAR PROGRAMSKOG PAKETA

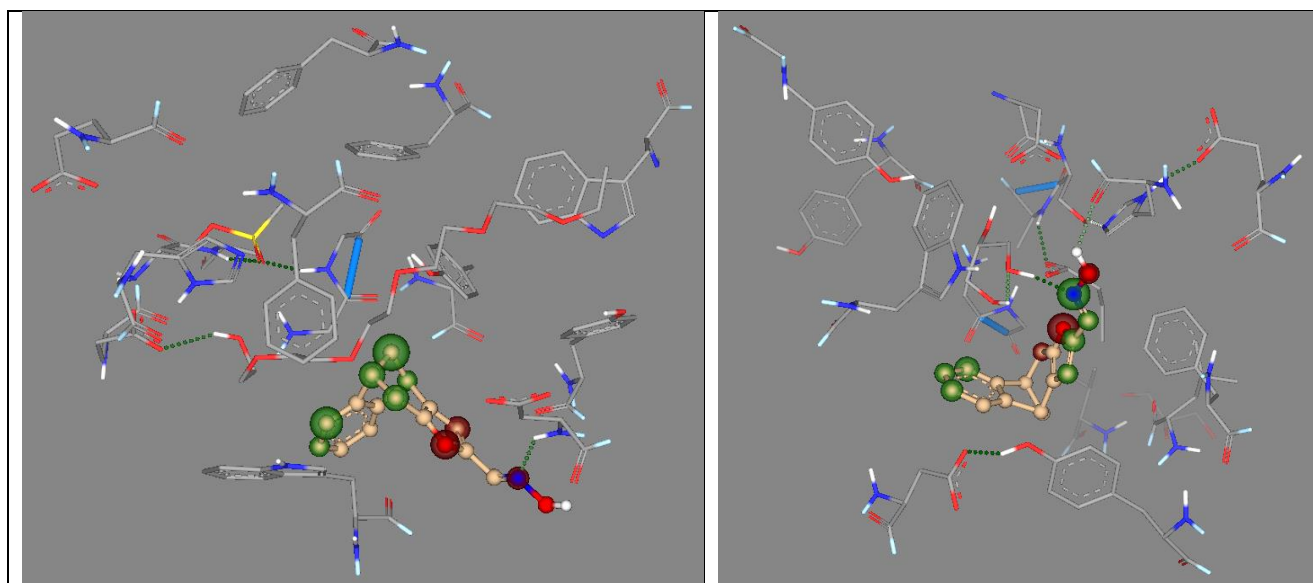
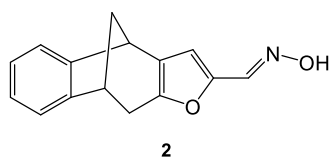
Na Slici 7 prikazane su strukture oksima i oksimskih etera kojima se pomoću SeeSAR programskog paketa procjenjivala konformacija koju kao inhibitori zauzimaju u aktivnom mjestu AChE i BChE te postoje li interakcije s aminokiselinama enzima u obliku vodikovih veza ili  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Osim kompetitivne inhibicije kojom se inhibitor natječe s prirodnim supstratom za aktivno mjesto, inhibicija može biti i nekompetitivna vezanjem na drugom položaju enzima što može uzrokovati promjenu aktivnog mjesta i da prirodni supstrat ne može ući. Stvarna inhibicija enzima određenim spojevima odredit će se eksperimentalno nakon sinteze, no pomoću SeeSAR programskog paketa može se usmjeriti sinteza pod pretpostavkom koji su spojevi najbolji inhibitori.



**Slika 7.** Oksimi i oksimski eteri čiji je smještaj u aktivno mjesto AChE i BChE analiziran u programskom paketu SeeSAR.

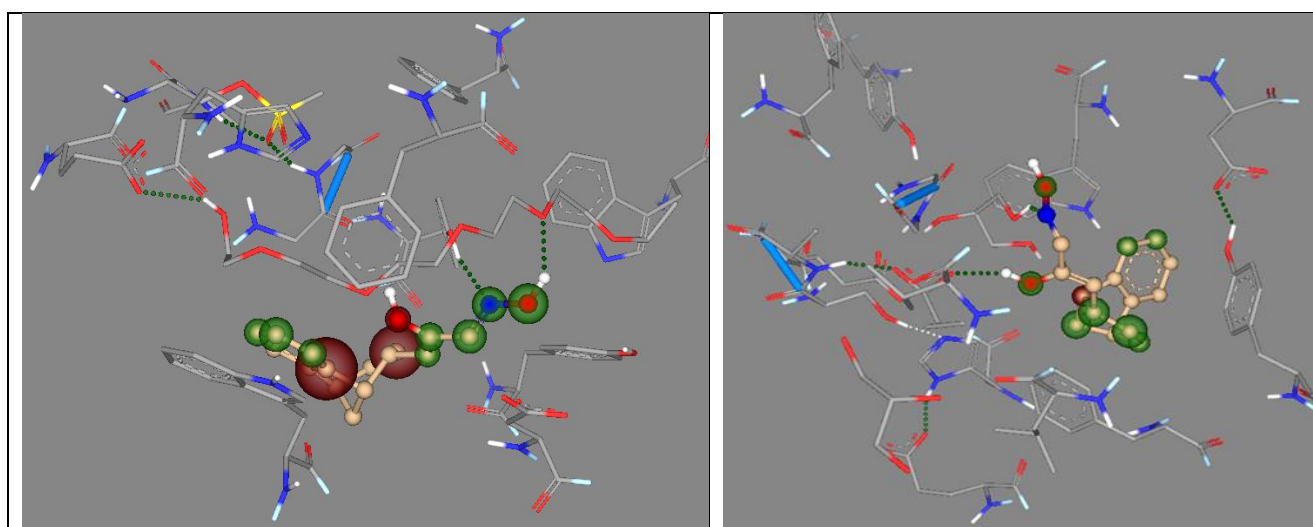
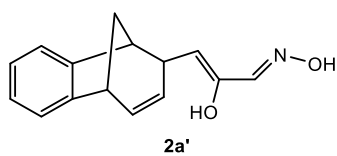
Na slikama koje slijede prikazane su konformacije određenih spojeva u aktivnom mjestu AChE (lijevo) i BChE (desno). Atomi koji su vrlo povoljni označeni su zelenom, a nepovoljni atomi smeđom bojom. Vodikove veze vidljive su kao zelene isprekidane linije.

Na Slici 8 u aktivnom mjestu AChE i BChE smješten je zatvoreni biciklo oksim **2** koji zauzima dobar položaj u aktivnom mjestu oba enzima. Kod AChE kao najpovoljniji se pokazuje biciklički dio molekule. *N* atom nije previše povoljan, no stvara vodikovu vezu s Asp72. Kod BChE važniji je lanac molekule i *N* atom je povoljniji stvarajući vodikovu vezu s aminokiselinskim ostatkom, a *H* atom oksimske skupine stvara vodikovu vezu s His438.



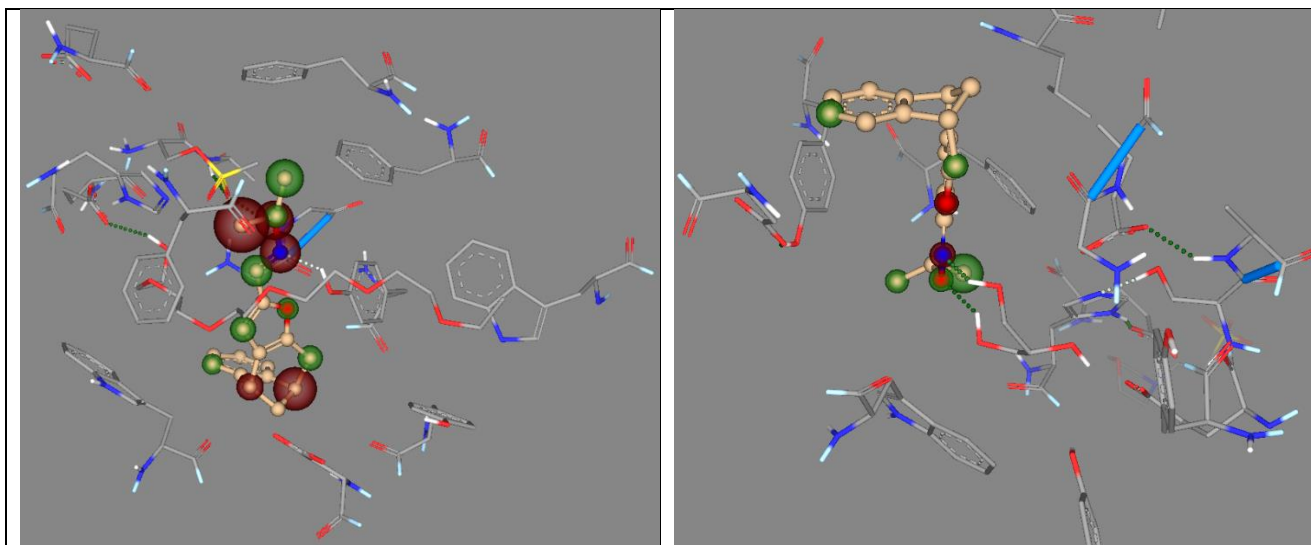
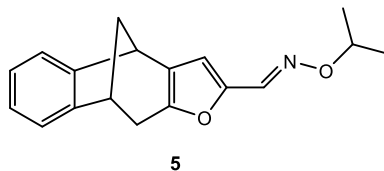
**Slika 8.** Oksim **2** u aktivnom mjestu AChE (lijevo) i BChE (desno).

Otvoreni oksim **2a'** u aktivnom mjestu AChE stvara vodikove veze između *N* atoma i Tyr121 te *H* atoma oksimske skupine i aminokiselinskog ostatka. Kao nepogodno mjesto u strukturi pokazuje se biciklički dio, koji puno bolje pristaje u aktivno mjesto BChE kod koje je također prisutna vodikova veza između *H* atoma oksimske skupine i aminokiselinskog ostatka (Slika 9).



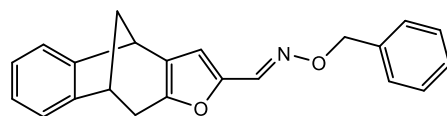
**Slika 9.** Otvoreni oksim **2a'** u aktivnom mjestu AChE (lijevo) i BChE (desno).

Izopropilni eter oksima **5** prema predviđanjima ne zauzima obećavajući položaj u aktivnom mjestu AChE. Dosta atoma ima nepovoljan položaj i niti jedan ne stvara vodikove veze. Kod BChE situacija je značajno bolja što se tiče položaja atoma i vodikovih veza koje stvaraju *N* i *O* atomi oksimske skupine (Slika 10).

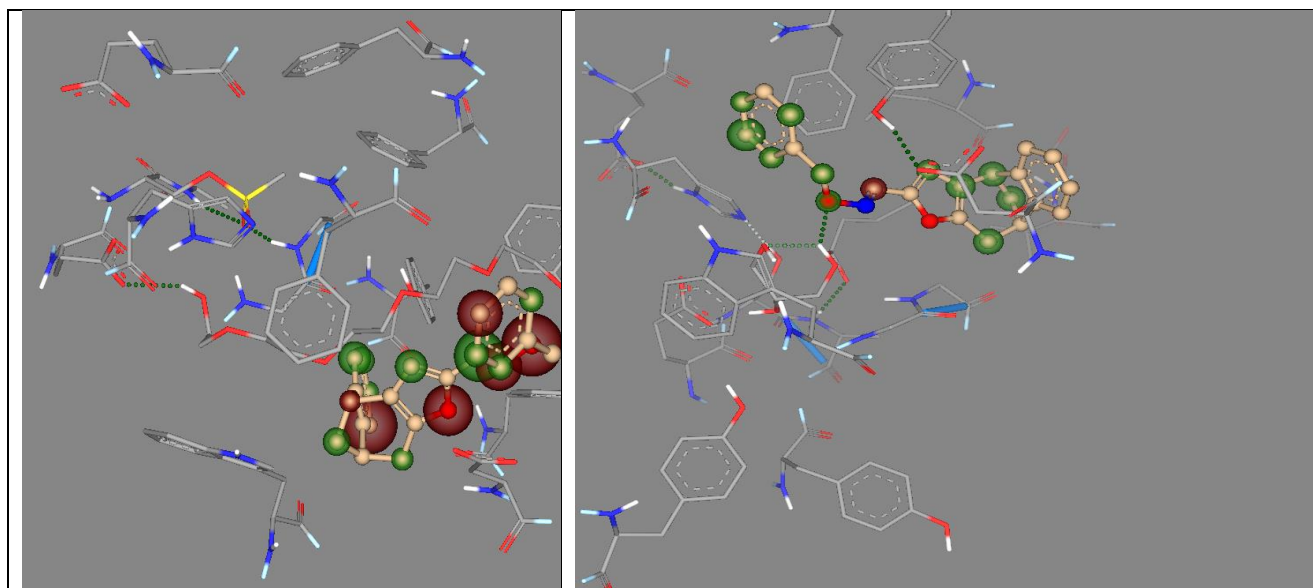


**Slika 10.** Izopropilni eter oksima **5** u aktivnom mjestu AChE (lijevo) i BChE (desno).

Benzilni eter oksima **13** pokazuje slabo pristajanje u aktivno mjesto AChE, dok je kod BChE situacija potpuno drugačija i jedini neodgovarajući atom je *C* oksimske skupine, no ne značajno. Pogoduje i vodikova veza koju stvara *O* atom oksimske skupine (Slika 11).



13



**Slika 11.** Benzilni eter oksima **13** u aktivnom mjestu AChE (lijevo) i BChE (desno).

Osim kod oksima **2** koji dobro ulazi u aktivno mjesto oba enzima, ostali prikazani potencijalni inhibitori očekivano bolje ulaze u aktivno mjesto BChE, budući da je ono veće. Eksperimentalno određivanje inhibicije dat će informacije o pravoj inhibiciji. U Prilogu na kraju rada nalaze se slike svih ostalih analiziranih spojeva u aktivnom mjestu enzima sa Slike 7 koji ovdje nisu prikazani.

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### Opće napomene

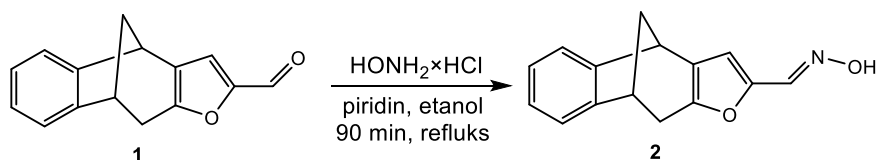
Kromatografska odjeljivanja su provedena na kolonama punjenim silikagelom (Fluka 0,063-0,2 nm) i na pločama presvučenim tankim slojem silikagela (0,2 mm, 60 F<sub>254</sub>, Merck).

Za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće korištena je nuklearna magnetska rezonancija (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR). Spektri <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR snimljeni su na instrumentima Varian Gemini 300 na 300 MHz (<sup>1</sup>H NMR), odnosno 75 MHz (<sup>13</sup>C NMR) te Bruker AV-600 na 600 MHz (<sup>1</sup>H NMR), odnosno 150 MHz (<sup>13</sup>C NMR). Spektri su snimani u CDCl<sub>3</sub> kao otapalu uz tetrametilsilan kao unutarnji standard. Za asignaciju signala korištene su dodatne tehnike: 2D-CH korelacija (HSQC), 2D-HH-COSY i NOESY. Korištene su kratice s - singlet, d - dublet, t - triplet, dd - dublet dubleta, ddd - dublet dubleta dubleta i m - multiplet.

Otapala su pročišćena destilacijom, a nakon provedbe reakcije uklonjena su s rotacionim uparivačem pod sniženim tlakom. Skraćenica DMF odnosi se na *N,N*-dimetilformamid, PE/DCM na smjesu petroleter/diklormetan, a DCM/E na diklormetan/dietileter.

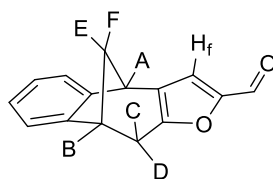
Početni spoj **1** priređen je u laboratoriju,<sup>128</sup> a reagensi korišteni kod sinteza su kupovne kemikalije.

### 4.1. SINTEZA OKSIMA



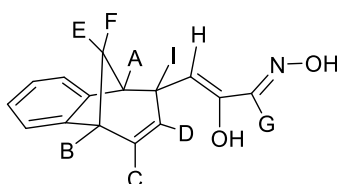
U tikvicu s okruglim dnom u kojoj se nalazi 50 mg aldehida **1** (0,223 mmol, 1 ekv) otopljenog u 1 mL apsolutno suhog etanola p.a. (3Å sita) dodano je 8 mg hidroksilamin hidroklorida (0,112 mmol, 0,5 ekv) i 0,05 mL piridina. Reakcija se miješa i zagrijava na magnetskoj mješalici u uljnoj kupelji do 78 °C i refluksira 1 h nakon čega se upari etanol do suha. Uzorak se nanese na silikagel i pročisti kolonskom kromatografijom s PE/DCM promjenjive polarnosti kao eluensom. Produkt je dodatno pročišćen tankoslojnom kromatografijom u DCM/E = 30:1. Izolirani produkt okarakteriziran je NMR spektroskopijom koja je pokazala da nije dobiven produkt sa Sheme 1, već se otvorio furanski prsten i dobiveno je 16 mg otvorenog oksima **2a'** (30 %).

**(4*R*,9*R*)-9,10-dihidro-4*H*-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-*b*]furan-2-karbaldehid (1)**



**1:** lit.<sup>128</sup> 50,0 %;  $R_f$  (petroleter / dietileter = 20 : 1) = 0,23; žuta krutina;  $t_f = 135$  °C; UV (EtOH)  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ): 308 (16794) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}/\text{cm}^{-1}$ : 1666 (C=O), 1504 (C=C);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 9,41 (s, 1H, CHO), 7,32 (dd, 1H,  $J = 7,2; 1,4$  Hz,  $\text{H}_{Ar}$ ), 7,16-7,08 (m, 4H,  $3\text{H}_{Ar}$ ,  $\text{H}_f$ ), 3,91 (d, 1H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{H}_A$ ), 3,66 (dt, 1H,  $J = 4,9; 0,5$  Hz,  $\text{H}_B$ ), 3,20 (dd, 1H,  $J = 17,8; 4,9$  Hz,  $\text{H}_C$ ), 2,72 (dd, 1H,  $J = 17,8; 0,5$  Hz,  $\text{H}_D$ ), 2,48 (ddd, 1H,  $J = 10,7; 4,9; 4,4$  Hz,  $\text{H}_E$ ), 2,4 (d, 1H,  $J = 10,7$  Hz,  $\text{H}_F$ );  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 176,6 (d), 156,0 (s), 151,3 (s), 150,6 (s), 144,1 (s), 128,5 (s), 126,9 (d), 126,9 (d), 124,1 (d), 121,0 (2\*d), 42,5 (t), 39,6 (d), 39,1 (d), 31,4 (t); MS  $m/z$  (EI) 224 ( $\text{M}^+$ , 100 %), 167 (23), 115 (10).

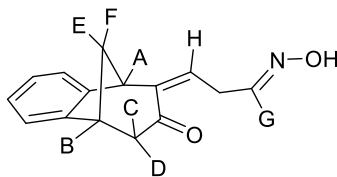
**(1*E*,2*Z*)-3-((5*S*,6*S*,9*R*)-6,9-dihidro-5*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-il)-2-hidroksiakril aldehid oksim (2a')**



**2a':** žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan) = 0,73;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,19 (m, 1H,  $\text{H}_G$ ), 7,13 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{Ar}$ ), 7,04 (dd, 1H,  $J = 7,5; 1,0$  Hz,  $\text{H}_{Ar}$ ), 6,81 (dd, 1H,  $J = 7,6; 1,0$  Hz,  $\text{H}_{Ar}$ ), 6,76-6,72 (m, 1H,  $\text{H}_H$ ), 6,37 (dt, 1H,  $J = 9,6; 2,5$  Hz,  $\text{H}_{C/D}$ ), 6,18 (d, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{H}_{Ar}$ ), 5,33 (dt, 1H,  $J = 9,6$  Hz,  $\text{H}_{C/D}$ ), 4,00-3,97 (m, 1H,  $\text{H}_A$ ), 3,39 (t, 1H,  $J = 5,2$  Hz,  $\text{H}_{B/I}$ ), 3,30 (dd, 1H,  $J = 5,2; 4,6$  Hz,  $\text{H}_{B/I}$ ), 2,54-2,51 (m, 1H,  $\text{H}_E$ ), 2,39 (d, 1H,  $J = 9,8$  Hz,  $\text{H}_F$ ).

Eksperiment je ponovljen sa 100 mg aldehida **1** (0,446 mmol, 1 ekv) u 2 mL apsolutno suhog etanola p.a. i sa 16 mg hidroksilamin-hidroklorida (0,223 mmol, 0,5 ekv) i 0,1 mL piridina. Uzorak se pročisti kolonskom kromatografijom s PE/DCM = 6:4 kao eluensom te dodatno tankoslojnom kromatografijom u DCM. NMR spektar izoliranog produkta pokazuje da se furanski prsten opet otvorio, no na drugačiji način te je dobiveno 8 mg (7,5 %) oksima **2b**.

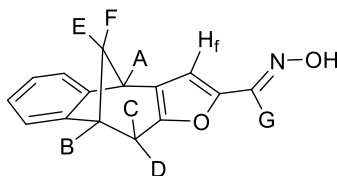
**(1E,3Z)-3-((5R,9R)-7-okso-5,7,8,9-tetrahydro-6H-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden) propanal oksim (2b)**



**2b:** blijedo žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan) = 0,6;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,74 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ,  $\text{H}_{\text{G}}$ ), 5,38-5,33 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{H}}$ ), 4,32-4,27 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{A}}$ ), 3,82 (d, 1H,  $J = 2,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{B}}$ ), 3,65 (t, 1H,  $J = 6,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 3,59-3,54 (t, 1H,  $J = 6,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 2,37-2,34 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,34-2,29 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{E}}$ ,  $\text{H}_{\text{F}}$ ).

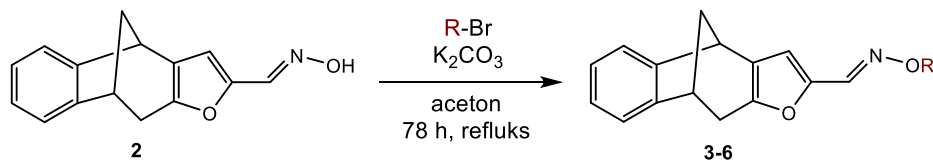
Željeni produkt **2** izoliran je kao neizreagirani reaktant (10 mg) kod sinteze oksimskog etera **4** (Poglavlje 4.2. Sinteza oksimskih etera).

**(E)-9,10-dihidro-4H-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]furan-2-karbaldehid oksim (2)**



**2:** blijedo žuto ulje,  $R_f$  (petroleter / diklormetan = 1 : 1) = 0,33;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,36 (d, 1H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{H}_{\text{G}}$ ), 7,18-7,05 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6,06 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{f}}$ ), 4,62 (d, 1H,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{A}}$ ), 3,81 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz,  $\text{H}_{\text{B}}$ ), 3,59-3,54 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{C,D}}$ ), 2,40-2,37 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{E,F}}$ ).

## 4.2. SINTEZA OKSIMSKIH ETERA



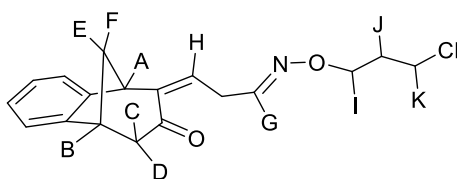
- 3: R = 3-klor-1-propil
- 4: R = alil
- 5: R = izopropil
- 6: R = acetil

U tikvicu s okruglim dnom u kojoj se nalazi 60 mg oksima (0,251 mmol, 1 ekv) otopljenog u 2 mL acetona dodano je 28  $\mu\text{L}$  1-brom-3-klorpropana (0,276 mmol, 1,1 ekv) i 51,96 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$



(0,376 mmol, 1,5 ekv). Reakcija se miješa i zagrijava na magnetskoj mješalici u uljnoj kupelji do 78 °C i refluksira 78 h nakon čega se upari aceton do suha. Uzorak se pročisti kolonskom kromatografijom s PE/DCM = 3:1 kao eluensom i dodatno tankoslojnom kromatografijom u DCM. Izolirani produkt okarakteriziran je NMR spektroskopijom koja je pokazala da je dobiveno 2 mg (2,5 %) oksimskog etera s otvorenim furanskim prstenom **3a**.

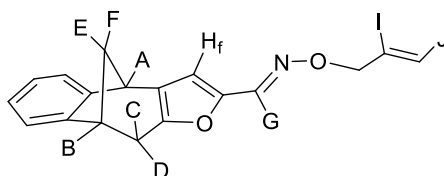
**(1E,3Z)-3-((5R,9R)-7-okso-5,7,8,9-tetrahidro-6H-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden) propanal O-(3-kloropropil) oksim (3a)**



**3a**: žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan) = 0,26;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,31 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,25 (d, 1H,  $J = 1,0$  Hz,  $\text{H}_G$ ), 7,16 (d, 1H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,04 (d, 1H,  $J = 1,0$  Hz,  $\text{H}_H$ ), 7,04-7,02 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar/G}}$ ), 4,34 (t, 2H,  $J = 5,9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4,32-4,26 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ ), 3,87 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz,  $\text{H}_A$ ), 3,66 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,66-3,63 (m, 1H,  $\text{H}_B$ ), 3,14 (dd, 1H,  $J = 17,1$ ; 5,0 Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 2,64 (dd, 1H,  $J = 17,1$ ; 1,2 Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 2,49-2,45 (m, 1H,  $\text{H}_E$ ), 2,22-2,17 (m, 2H,  $\text{H}_I$ ), 2,05 (d, 1H,  $\text{H}_F$ ).

Eksperiment je ponovljen s 30  $\mu\text{L}$  alil bromida (0,276 mmol, 1,1 ekv) kao alkilirajućim reagensom. Nakon kolonske kromatografije s PE/DCM = 1:1 kao eluensom i tankoslojne kromatografije u istoj smjesi otapala dobiveno je 10 mg spoja **4** (14 %).

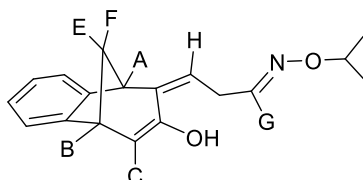
**(E)-9,10-dihidro-4H-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]furan-2-karbaldehid O-alil oksim (4)**



**4**: žuto ulje,  $R_f$  (petroleter / diklormetan = 1 : 1) = 0,80;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,37-7,01 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{Ar,G,I}}$ ), 6,67 (d, 2H,  $J = 15,5$  Hz,  $\text{H}_I$ ), 6,52 (s, 1H,  $\text{H}_f$ ), 3,87-3,85 (m, 1H,  $\text{H}_A$ ), 3,18 (dd, 1H,  $J = 17,4$ ; 5,3 Hz,  $\text{H}_B$ ), 2,97 (d, 1H,  $J = 16,8$  Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 2,68 (d, 1H,  $J = 16,8$  Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 2,48-2,43 (m, 1H,  $\text{H}_E$ ), 2,40-2,28 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,05 (d, 1H,  $J = 10,5$  Hz,  $\text{H}_F$ ).

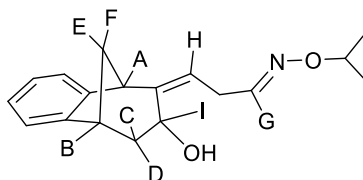
S izopropil-bromidom (0,191 mmol, 1,1 ekv) kao alkilirajućim reagensom nakon kolonske kromatografije s PE/DCM = 1:10 kao eluensom i tankoslojne kromatografije u PE/DCM = 40:1 izolirana su dva oksimska etera s otvorenim furanskim prstenom, **5a** (5 mg, 10 %) i **5b** (13 mg, 26 %).

**(1E,3Z)-3-((5R,9R)-7-hidroksi-5,9-dihidro-6H-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden) propanal O-izopropil oksim (5a)**



**5a**: žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan) = 0,60;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,33 (d, 1H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,15 (dd, 1H,  $J = 8,7; 7,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,07-7,02 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{Ar,G}}$ ), 6,71-6,69 (m, 1H,  $\text{H}_\text{C}$ ), 6,25 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz,  $\text{H}_\text{H}$ ), 4,34-4,29 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4,27 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{OH}$ ), 4,24-4,18 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,64 (dd, 1H,  $J = 6,0; 2,2$  Hz,  $\text{H}_\text{A}$ ), 3,55-3,52 (m, 1H,  $\text{H}_\text{B}$ ), 2,44 (d, 1H,  $J = 10,5$  Hz,  $\text{H}_\text{F}$ ), 2,37-2,31 (m, 1H,  $\text{H}_\text{E}$ ), 1,43 (d, 6H,  $J = 0,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

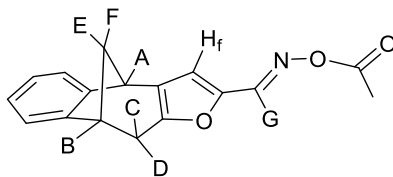
**(1E,3Z)-3-((5R,9R)-7-hidroksi-5,7,8,9-tetrahidro-6H-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden)propanal O-izopropil oksim (5b)**



**5b**: blijedo žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan / petroleter = 9 : 1) = 0,43;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,38-7,05 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{Ar,G}}$ ), 6,39 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz,  $\text{H}_\text{H}$ ), 5,01 (d, 1H,  $J = 4,6$  Hz, 1H,  $\text{H}_\text{I}$ ), 4,55-4,51 (m, 1H,  $\text{CH}$ ), 4,35-4,27 (m, 3H,  $\text{H}_\text{A}, \text{CH}_2$ ), 4,25-4,20 (m, 1H,  $\text{H}_\text{B}$ ), 4,05 (d, 1H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 3,88-3,84 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{C/D}}$ ), 3,65 (s, 1H,  $\text{OH}$ ), 2,56-2,52 (m, 1H,  $\text{H}_\text{E}$ ), 2,37 (d, 1H,  $J = 10,3$  Hz,  $\text{H}_\text{F}$ ), 1,37 (d, 6H,  $J = 6,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

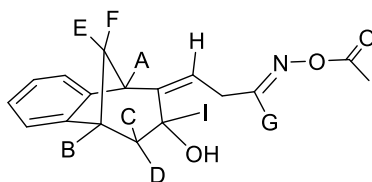
S acetil-bromidom (0,191 mmol, 1,1 ekv) kao alkilirajućim reagensom nakon uzastopnog kromatografskog pročišćavanja dobiveno je 5 mg (10,2 %) spoja **6** kao zatvorenog oksimskog etera te 5 mg (10 %) spoja **6a** kao otvorenog.

**(E)-9,10-dihidro-4H-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]furan-2-karbaldehid O-acetil oksim (6)**



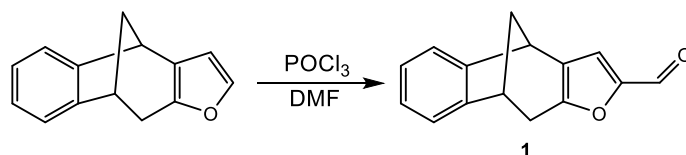
**6:** blijedo žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan) = 0,58;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,34 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,26 (s, 1H,  $\text{H}_G$ ), 7,14 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,10-7,04 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6,04 (s, 1H,  $\text{H}_f$ ), 4,21 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{H}_A$ ), 3,86-3,81 (m, 1H,  $\text{H}_B$ ), 3,78 (d, 1H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{H}_{C/D}$ ), 3,63 (dd, 1H,  $J = 4,4; 2,4$  Hz,  $\text{H}_{C/D}$ ), 2,45 (d, 1H,  $J = 10,6$  Hz,  $\text{H}_F$ ), 2,34-2,30 (m, 1H,  $\text{H}_E$ ), 1,32 (s, 1H,  $\text{CH}_3$ ).

**(1E,3Z)-3-((5R,9R)-7-hidroksi-5,7,8,9-tetrahidro-6H-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden)propanal O-acetil oksim (6a)**



**6a:** žuto ulje,  $R_f$  (diklormetan) = 0,64;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,29 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,14 (t, 1H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 7,12-7,04 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{Ar,G}}$ ), 6,04 (d, 1H,  $J = 1,7$  Hz,  $\text{H}_H$ ), 4,77 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz,  $\text{H}_I$ ), 4,20 (d, 1H,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{H}_A$ ), 4,00 (d, 1H,  $J = 12,4$  Hz,  $\text{H}_B$ ), 3,93-3,77 (m, 4H,  $\text{H}_{C,D}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,63 (dd, 1H,  $J = 5,5; 2,5$  Hz, OH), 2,56-2,52 (m, 1H,  $\text{H}_E$ ), 2,45 (d, 1H,  $J = 10,7$  Hz,  $\text{H}_F$ ).

### 4.3. MIKRO-FLOW FORMILIRANJE



**4.3.1.** U klip pumpe 1 mikroreaktora ulije se pripremljena otopina 300 mg furo-benzobicyclo[3.2.1]oktadiena u 3 mL suhog DMF, a u klip pumpe 2 otopina  $\text{POCl}_3$  (165  $\mu\text{L}$ , 1,1 ekv) u 3 mL suhog DMF koji je prethodno ohlađen u ledenoj kupelji ispod 10 °C.

Reakcija se provodi u mikoreaktoru volumena 8,3  $\mu\text{L}$  pri različitim protocima. Sakuplja se 100  $\mu\text{L}$  produkta po 3 ponavljanja za pojedini protok (Tablica 1).  $4\tau$  predstavlja izračunato vrijeme potrebno da se reaktanti iz dvije pumpe pomiješaju i količina sakupljena u tom vremenu se odbacuje. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode u sakupljeni produkt **1**. Prema TLC pločici razvijenoj u DCM nema početnog spoja (aldehid ostaje na startu pločice). Od uzoraka se snimi UPLC-MS.

**Tablica 1.** Provedeni protoci u prvom eksperimentu mikro-*flow* formiliranja s izračunatim vremenom odbacivanja,  $4\tau$  i vremenom sakupljanja,  $t$ .

Protok ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	$4\tau$ (min)	$t$ (min)	Oznaka vijale
20	1,66	8	1A, 1B, 1C
16	2,075	6,25	2A, 2B, 2C
14	2,37	7,14	3A, 3B, 3C
10	3,32	10	4A, 4B, 4C
6	5,53	16,60	5A, 5B, 5C
4	8,3	25	6A, 6B, 6C
2	16,6	50	7A, 7B, 7C

**4.3.2.** Kroz čip-mikoreaktor s dva ulaza i jednim izlazom koji se hladi u ledenoj kupelji na 0-10  $^{\circ}\text{C}$  prolaze DMF i  $\text{POCl}_3$  pri čemu nastaje kompleks za formiliranje. Izlaz s nastalim kompleksom spaja se na ulaz drugog mikoreaktora u koji ulazi i furanski biciklo spoj otopljen u DMF-u. Sakuplja se 300  $\mu\text{L}$  produkta **1** i dodaje 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode za zaustavljanje reakcije (Tablica 2).

**Tablica 2.** Provedeni protoci u drugom eksperimentu mikro-*flow* formiliranja s dva serijski spojena mikroreaktora s izračunatim vremenom odbacivanja,  $4\tau$  i vremenom sakupljanja,  $t$ .

Protok	$4\tau$ (min)	$t$ (min)	Oznaka vijale
1 $\mu\text{L min}^{-1}$ POCl <sub>3</sub> 16 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 16 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	2	9,5	8A, 8B, 8C
0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$ POCl <sub>3</sub> 8 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 8 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	3	19	9A, 9B, 9C
2 $\mu\text{L min}^{-1}$ POCl <sub>3</sub> 32 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 32 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	2 <i>*procurio klip, odbaciti</i>	5	10A, 10B, 10C
1 $\mu\text{L min}^{-1}$ POCl <sub>3</sub> 16 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 16 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	2	9,5	11A, 11B, 11C
2 $\mu\text{L min}^{-1}$ POCl <sub>3</sub> 32 $\mu\text{L min}^{-1}$ DMF 34 $\mu\text{L min}^{-1}$ spoj	2	5	12A, 12B, 12C

**4.3.3.** U 4 mL DMF otopi se 400 mg početnog biciklo-furanskog fotoproducta, a u novih 4 mL DMF doda se 206  $\mu\text{L}$  POCl<sub>3</sub> (1,1 ekv). Sakuplja se 500  $\mu\text{L}$  produkta **1** (Tablica 3). U vijale A prvo je sakupljen uzorak pa dodano 500  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O, dok je u vijale B i C uzorak sakupljan u 500  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O.

**Tablica 3.** Provedeni protoci u prvom eksperimentu mikro-*flow* formiliranja s izračunatim vremenom odbacivanja,  $4\tau$  i vremenom sakupljanja,  $t$ .

Protok ( $\mu\text{L/min}$ )	$4\tau$ (min)	$t$ (min)	Oznaka vijale
20	1,66	25	1A, 1B, 1C
16	2,08	31,25	2A, 2B, 2C
14	2,37	35,7	3A, 3B, 3C
12	2,76	41,67	4A, 4B, 4C
10	3,32	50	5A, 5B, 5C
8	4,15	62,50	6A, 6B, 6C

## 5. ZAKLJUČAK

*Flow*-sinteza formilnog benzobicyklo[3.2.1]oktadiena **1** pokazala se kao učinkovit, praktičan i sigurniji način sinteze u odnosu na konvencionalnu sintezu, budući da se spoj dobiva formiliranjem Vilsmeierovim kompleksom koji nastaje iz POCl<sub>3</sub> kategorizirane pod opasnu kemikaliju. Šaržno je spoj **1** dobiven u iskorištenju od 50 %, a *flow*-sintezom nakon čišćenja na preparativnom HPLC sustavu uz najbolji protok od 16 μL min<sup>-1</sup> u iskorištenju od 85 %. *Flow*-formiliranje probano je u jednom i s dva serijski spojena mikroreaktora. Boljom se pokazala sinteza u jednom čip-mikroreaktoru u koji ulazi početni biciklički supstrat na jednom ulazu, a na drugom otopina POCl<sub>3</sub> u DMF. Sinteza s dva serijski spojena čip-mikroreaktora, gdje se u prvom reaktoru miješaju POCl<sub>3</sub> i DMF pa ulaze u drugi reaktor s bicikličkim početnim spojem, ne funkcionira zbog prevelike razlike u protocima. Osim što je konverzija bila manja, došlo je i do curenja što ne doprinosi sigurnosti tijekom rada. Iako je *flow*-kemija sigurniji način sinteze, prilikom optimiranja uvjeta treba biti vrlo oprezan.

Spoj **1** koristi se kao početni spoj za sintezu potencijalno biološki vrlo korisnih oksima i oksimskih etera. Sintetizirani oksimski derivati **2-6a** izolirani su i spektroskopski okarakterizirani. Tijekom sinteze je osim predviđenih produkata došlo i do zanimljivog otvaranja furanskog prstena na bicikličkoj molekuli na dva načina. Trenutno se ne zna točno u kojem stupnju je došlo do otvaranja prstena, kod sinteze oksima ili oksimskih etera, no cilj je u budućnosti istraživanjem utvrditi točan mehanizam. Kod izoliranih oksimskih etera kisikov atom nalazi se kao karbonilna ili hidroksilna skupina na alifatskom cikličkom dijelu molekule na temelju čega se može pretpostaviti da oksimi s kisikovim atomom vezanim za ciklički dio lakše reagiraju u etere.

Oksimi i oksimski eteri ispitani u programskom paketu SeeSAR kao inhibitori AChE i BChE pokazali su se uglavnom kao dobri potencijalni inhibitori na temelju čega se mogu i ciljano sintetizirati i eksperimentalno ispitati. Budući da je aktivno mjesto BChE veće, očekivano svi prikazani spojevi bolje ulaze u aktivno mjesto BChE nego u aktivno mjesto AChE, no sam ulazak u aktivno mjesto ne mora biti i jedini pokazatelj potencijalne bioaktivnosti u promatranom smislu. U daljnjem radu cilj je sintetizirati i biološki ispitati oksime koji daju dobre SeeSAR rezultate, a spojevima koji se biološki pokažu kao dobri inhibitori ili reaktivatori optimirati reakcijske uvjete da se dobiju veća iskorištenja i količine.

## 6. ZAHVALE

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na ukazanom povjerenju, susretljivosti, srdačnosti, pomoći, stručnom vođenju i savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se Ani Ratković, mag. app. chem na susretljivosti, vođenju, motivaciji i nesebičnoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada te uvijek ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na pristupačnosti i ugodnoj radnoj atmosferi.*

## 7. LITERATURA

- [1] Watts, P., Wiles, C., *J. Chem. Res.*, (2012) 181–193.
- [2] Plutschack, M. B., Pieber, B., Gilmore, K., Seeberger, P. H., *Chem. Rev.*, **117** (2017) 11796–11893.
- [3] Hartman, R. L., McMullen, J. P., Jensen, K. F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** (2011) 7502–7519.; *Angew. Chem.*, **123** (2011) 7642.
- [4] Gerardy, R., Emmanuel, N., Toupay, T., Kassin, V-E., Ntumba Tshibalonza, N., Schmitz, M., Monbaliu, J-C. M., *Eur. J. Org. Chem.*, (2018) 2301–2351.
- [5] Hessel, V., Kralisch, D., Kockmann, N., Noël, T., Wang, Q., *ChemSusChem*, **6** (2013) 746–789.
- [6] Bedore, M. W., Zaborenko, N., Jensen, K. F., Jamison, T. F., *Org. Process Res. Dev.*, **14** (2010) 432–440.
- [7] Reizman, B. J., Jensen, K. F., *Acc. Chem. Res.*, **49** (2016) 1786–1796.
- [8] Yue, J., Schouten, J. C., Nijhuis, T. A., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **51** (2012) 14583–14609.
- [9] Fabry, D. C., Sugiono, E., Rueping, M., *React. Chem. Eng.*, **1** (2016) 129–133.
- [10] Sans, V., Cronin, L., *Chem. Soc. Rev.*, **45** (2016) 2032–2043.
- [11] Schoenitz, M., Grundemann, L., Augustin, W., Scholl, S., *Chem. Commun.*, **51** (2015) 8213–8228.
- [12] Epstein, N., *Heat Transfer Eng.*, **4** (1983) 43–56.
- [13] Plutschack, M. B., Pieber, B., Gilmore, K., Seeberger, P. H., *Chem. Rev.*, **117** (2017) 11796–11893.
- [14] Jensen, K. F., *AIChE J.*, **63** (2017) 858–869.
- [15] Wiles, C, Watts, P., *Chem. Commun.*, **47** (2011) 6512.
- [16] Nguyen, N.-T., Wu, Z., *J. Micromech. Microeng.*, **15** (2005) , R1.
- [17] Hessel, V., Lowe, H, Schonfeld, F., *Chem. Eng. Sci.*, **60** (2005) 2479.
- [18] Hornung, C. H., Mackley, M. R., *Chem. Eng. Sci.*, **64** (2009) 3889.
- [19] Luca Morini, G., *Int. J. Therm. Sci.*, **43** (2004) 631.
- [20] Cambié, D., Bottecchia, C., Straathof, N. J. W., Hessel, V., Noël, T., *Chem. Rev.*, **116** (2016) 10276–10341.
- [21] Ley, S. V., Fitzpatrick, D. E., Myers, R. M., Battilocchio, C., Ingham, R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54** (2015) 10122–10136.
- [22] Jensen, K. F., Reizman, B. J., Newman, S. G., *Lab Chip*, **14** (2014) 3206–3212.



- [23] Hessel, V., Schouten, J. C., Renken, A., *Micro Process Engineering: A Comprehensive Handbook*, Weinheim, John Wiley & Sons, 2009.
- [24] Frost, C. G., Mutton, L., *Green Chem.*, **12** (2010) 1687–1703.
- [25] Munirathinam, R., Huskens, J., Verboom, W., *Adv. Synth. Catal.*, **357** (2015) 1093–1123.
- [26] Irfan, M., Glasnov, T. N., Kappe, C. O., *ChemSusChem*, **4** (2011) 300–316.
- [27] Deutschmann, O., Knözinger, H., Kochloefl, K., Turek, T., Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts, 1. Fundamentals, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH, 2000.
- [28] Deutschmann, O., Knözinger, H., Kochloefl, K., Turek, T., Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts, 2. Development and Types of Solid Catalysts, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH, 2000.
- [29] Avila, K., Moxey, D., de Lozar, A., Avila, M., Barkley, D., Hof, B., *Science*, **333** (2011) 192–196.
- [30] Reichart, B., Kappe, C. O., Glasnov, T. N., *Synlett*, **24** (2013) 2393–2396.
- [31] Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A., Kresta, S. M., *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*, New Jersey, John Wiley & Sons, 2004.
- [32] Lamberto, D. J., Alvarez, M. M., Muzzio, F. J., *Chem. Eng. Sci.*, **54** (1999) 919–942.
- [33] Yoshida, J.-I., *Chem. Commun.*, (2005) 4509–4516.
- [34] Kappe, C. O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43** (2004) 6250–6284.
- [35] Glasnov, T. N., Kappe, C. O., *Chem. - Eur. J.*, **17** (2011) 11956–11968.
- [36] Zaborenko, N., Bedore, M. W., Jamison, T. F., Jensen, K. F., *Org. Process Res. Dev.*, **15** (2011) 131–139.
- [37] Adamo, A., Beingessner, R. L., Behnam, M., Chen, J., Jamison, T. F., Jensen, K. F., Monbaliu, J. C. M., Myerson, A. S., Revalor, E. M., Snead, D. R., Stelzer, T., Weeranoppanant, N., Yee Wong, S., Zhang, P., *Science*, **352** (2016) 61–67.
- [38] Zhang, P., Weeranoppanant, N., Thomas, D. A., Tahara, K., Stelzer, T., Russell, M. G., O'Mahony, M., Myerson, A. S., Lin, H., Kelly, L. P., Jensen, K. F., Jamison, T. F., Dai, C., Cui, Y., Briggs, N., Beingessner, R. L., Adamo, A., *Chem. Eur. J.*, **24** (2018) 2776–2784.
- [39] Cole, K. P., Groh, J. M., Johnson, M. D., Burcham C. L., Campbell, B. M., Diserod, W. D., Heller, M. R., Howell, J. R., Kallman, N. J., Koenig, T. M., May, S. A., Miller, R. D., Mitchell, D., Myers, D. P., Myers, S. S., Phillips, J. L., Polster, C. S., White, T. D., Cashman, J., Hurley, D., Moylan, R., Sheehan, P., Spencer, R. D., Desmond, K., Desmond, P., Gowran, O., *Science*, **356** (2017) 1144–1150.
- [40] May, S. A., *J. Flow Chem.*, **7** (2017) 137–145.

- [41] Bana, P., Örkényi, R., Lövei, K., Lakó, Á., Túrós, G. I., Éles, J., Faigl, F., Greiner, I., *Bioorg. Med. Chem.*, **25** (2017) 6180–6189.
- [42] Porta, R., Benaglia, M., Puglisi, A., *Org. Process Res. Dev.*, **20** (2016) 2–25.
- [43] Baumann, M., Baxendale, I. R., *Beilstein J. Org. Chem.*, **11** (2015) 1194–1219.
- [44] Gutmann, B., Cantillo, D., Kappe, C. O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54** (2015) 6688–6728.; *Angew. Chem.*, **127** (2015) 6788.
- [45] Malet-Sanz, L., Susanne, F., *J. Med. Chem.*, **55** (2012) 4062–4098.
- [46] <https://www.fda.gov/Drugs/Drug-Safety/DrugShortages/ucm441579.htm> (pristup 24. siječnja 2018.)
- [47] Check Hayden, E., *Nature*, **523** (2015) 146–148.
- [48] Lax, E. R., *Chem. Today*, **34** (2016) 20–25.
- [49] Jarvis, L. M., *Chem. Eng. News*, **94**(5) (2016) 12–17.
- [50] Fosgerau, K., Hoffmann, T., *Drug Discovery Today*, **20** (2015) 122–128.
- [51] Watts, P., Wiles, C., Haswell, S. J., Pombo-Villar, E., Styring, P., *Chem. Commun.*, (2001) 990–991.
- [52] Mándity, I. M., Olasz, B., Ötvös, S. B., Fülöp, F., *ChemSusChem*, **7** (2014) 3172–3176.
- [53] Gutmann, B., Kappe, C.O., *J. Flow Chem.*, **7** (2017) 65–71.
- [54] Dallinger, D., Kappe, C. O., *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **7** (2017) 6–12.
- [55] Yue, J., *Catal. Today*, **308** (2018) 3–19.
- [56] Hone, C. A., Roberge, D. M., Kappe, C. O., *ChemSusChem*, **10** (2017) 32–41.
- [57] Movsisyan, M., Delbeke, E. I. P., Berton, J. K. E. T., Battilocchio, C., Ley, S. V., Stevens, C. V., *Chem. Soc. Rev.*, **45** (2016) 4892–4928.
- [58] Vaccaro, L., Lanari, D., Marrocchi, A., Strappaveccia, G., *Green Chem.*, **16** (2014) 3680–3704.
- [59] Newman, S. G., Jensen, K. F., *Green Chem.*, **15** (2013) 1456–1472.
- [60] Serrano-Ruiz, J. C., Luque, R., Campelo, J. M., Romero, A. A., *Challenges*, **3** (2012) 114–132.
- [61] Venkata Mohan, S., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M. V., Kumar, A. N., Sarkar, O., *Bioresour. Technol.*, **215** (2016) 2–12.
- [62] <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf> (pristup 25. siječnja 2018.)
- [63] Bozell, J. J., Petersen, G. R., *Green Chem.*, **12** (2010) 539–554.
- [64] van Putten, R.-J., van der Waal, J. C., de Jong, E., Rasrendra, C. B., Heeres, H. J., de Vries, J. G., *Chem. Rev.*, **113** (2013) 1499–1597.
- [65] Fortt, R., Wootton, R.C.R., de Mello, A.J., *Org. Proc. Res. Dev.*, **7** (2003) 762.

- [66] Lu, S., Watts, P., Chin, F.T., Hong, J., Musachio, J.L., Briard, E., Pike, V.W., *Lab Chip*, **4** (2004) 1.
- [67] Maeda, H., Mukae, H., Mizuno, K., *Chem. Lett.*, **34** (2005) 66.
- [68] Ehrich, H., Linke, D., Morgenschweis, K., Baerns, M., Jahnisch, K., *Chimia*, **56** (2002) 647.
- [69] Kopach, M.E., Murray, M.M., Braden, T.M., Kobierski, M.E., Williams, O.L., *Org. Proc. Res. Dev.*, **13** (2009) 152.
- [70] Harsanyi, A., Conte, A., Pichon, L., Rabion, A., Grenier, S., Sandford, G., *Org. Process Res. Dev.*, **21** (2017) 273.
- [71] Kupracz, L., Hartwig, J., Wegner, J., Ceylan, S., Kirschning, A., *Beilstein J. Org. Chem.*, **7** (2011) 1441–1448.
- [72] Pastre, J. C., Browne, D. L., O' Brien, M., Ley, S. V., *Org. Process Res. Dev.*, **17** (2013) 1183–1191.
- [73] B. Čolović, M., Z. Krstić, D., D. Lazarević-Pašti, T., M. Bondžić, A., M. Vasić, V., *Current Neuropharmacology*, **11** (2013) 315-335.
- [74] Bosak, A., Atalinić, M., Kovarik, Z., *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **62** (2011) 175-190.
- [75] Budryn, G., Grzelczyk, J., Jaśkiewicz, A., Żyżelewicz, D., Pérez-Sánchez, H., Cerón-Carrasco, J.P., *Food Research Int.*, **109** (2018) 268-277.
- [76] Maraković, N., Knežević, A., Vinković, V., Kovarik, Z., Šinko, G., *Chem. Biol. Interact.*, **259**(Part B) (2016) 122-132.
- [77] Andrisano, V., Naldi, M., De Simone, A., Bartolini, M., *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **28**(6) (2018) 455-465.
- [78] Holas, O., Musilek, K., Pohanka, M., Kuca, K., *Expert Opin. Drug Disc.*, **7** (2012) 1207-1223.
- [79] Ribeiro, T. S., Prates, A., Alves, S. R., Oliveira-Silva, J. J., Riehlcand, C. A. S., Figueroa-Villar, J. D., *J. Braz. Chem.*, **23** (2012) 1216-1225.
- [80] Güler, E., Sen, N., Sirit, A., Kurbanov, S., Mirzaoglu, R., *Org. Prep. Proced. Int.*, **30** (1998) 195-202.
- [81] Anand, P., Singh, B., Singh, N., *Bioorg. Med. Chem.*, **20** (2012) 1175–1180.
- [82] McGleenon, B. M., Dynan, K. B., Passmore, A. P., *J. Clin. Pharmacol.*, **48** (1999) 471-480.
- [83] Wiemann, J., Loesche, A., Csuk, R., *Bioorganic Chemistry*, **74** (2017) 145–157.
- [84] Giacobini, E., *Molecular Neurobiology*, **9** (1994) 115-118.

- [85] Zec, R. F., Burkett, N. R., *NeuroRehabilitation*, **23** (2008) 425-38.
- [86] Lane, R. M., Potkin, S. G., Enz, A., *Int. J. Neuropsychoph.*, **9** (2006) 101-124.
- [87] Giacobini, E., *Pharmacol. Res.*, **50** (2004) 433-440.
- [88] Santoni, G., de Sousa, J., de la Mora, E., Dias, J., Jean, L., Sussman, J. L., Silman, I., Renard, P. Y., Brown R. C. D., Weik, M., Baati, R., Nachon, F., *J. Med. Chem.*, **61** (2018) 7630-7639.
- [89] Zueva, I. V., Lushchekina, S.V., Masson, P., *Biosci Rep.*, **38** (2018) 1-10.
- [90] Polonowski, R., Marta, M., *Acta Pol. Pharm.*, **34** (1977) 383.
- [91] Georges, W. C., *British Patent 1474316* (1977)
- [92] Nikolous, B. J., *Helv. Chim. Acta*, **45** (1962) 358.
- [93] Leclerc, G., Andre, M., *J. Med. Chem.*, **20** (1977) 1657.
- [94] Markova, Y. W., *Zh. Org. Khim.*, **2** (1966) 239.
- [95] Markova, Y. W., *Chem. Pharm. J.*, **3** (1969) 13.
- [96] Kirilmis, C., Koca, M., çukurovali, A., Ahmedzade, M., Kazaz, C., *Molecules*, **10** (2005) 1399-1408.
- [97] Bergman, J., Egestad, B., Rajapaksa, D., *Acta Chem. Scand. Ser. B-Org. Chem. Biochem.*, **33** (1979) 405-409.
- [98] Dijk, J.V., Zwagemakers, J. M. A., *J. Med. Chem.*, **20** (1977) 1199-1206.
- [99] Fravolini A., Schiaffella, F., Orzalesi, G., Selleri, R., Volpato, I., *Eur. J. Med. Chem.*, **13** (1978) 347-350.
- [100] Burditt, S.J., Hamilton, P.B., *Poultry Sci.*, **62** (1983) 2183-2186.
- [101] Delmas, F., Gasquet, M., Timondavid, P., Madadi, N., Vanelle, P., Vaille, A., Maldonado, J., *Eur. J. Med. Chem.*, **28** (1993) 23-27.
- [102] Chowdhury, H., Saxeian, V.S., *J. Agr. Food Chem.*, **46** (1998) 731-736.
- [103] Prabhu, V. A., Brown, R. G., Delgado, J. N., *J. Pharm. Sci.*, **70** (1981) 558.
- [104] Toshio, N., Akira, M., Masato, M., Nobushige, I., Isamu, N., Masanori, H., *Chem. Abstr.*, **92** (1980) 198103b.
- [105] George, H., Wynona, M. P. J., Kurt, R., Christopher, T.V., *Chem. Abstr.*, **101** (1984) 210639v.
- [106] Zhang, A., Fu, P., Zhang, Z., Chen, H., Yu, P., *J. Pharm. Biomed. Sci.*, **6** (1) (2016) 31-38.
- [107] Jeong, H.J., Park, J-D., Park, H-J., Jeong, Y., Jeonga, T-S., Leea, W.S., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **16** (2006) 5576–5579.
- [108] Knudsen, J.T., Tollsten, L., *Bot. J. Linn. Soc.*, **113** (1993) 263–284.

- [109] Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J., Ståhl, B., *Bot. Rev.*, **71** (2006) 1–120.
- [110] Sørensen, M., Neilson, E.H.J., Møller, B.L., *Mol. Plant.*, **11**(1) (2018) 95-117.
- [111] Wong, L., Radić, Z., Brüggemann, R.J., Hosea, N., Berman, H.A., Taylor, P., *Biochemistry*, **39** (2000) 5750-5757.
- [112] Kovarik, Z., Radić, Z., Berman, H. A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P., *Biochemistry*, **43** (2004) 3222-3229.
- [113] Kovarik, Z., Katalinić, M., Bosak, A., Šinko, G., *Current Bioactive Compounds*, **6** (2010) 9-15.
- [114] Zueva1a, I.V., Lushchekina, S.V., Masson, P., *Biosci Rep*, **38** (2018) 1-16.
- [115] Kuca, K., Juna, D., Musilek, K., *Mini reviews in medicinal chemistry*, **6** (2006) 269-277.
- [116] Maček Hrvat, N., *Kolinesteraze kao pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
- [117] Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radic, Z., Taylor, P., Doctor, B. P., *Biochemistry*, **38** (1999) 9937-9947.
- [118] Rajapurkar, M. V., Koelle, G. B., Smart, P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **123** (1958) 247.
- [119] Cohen, E.M., Wiersinga, H., *Acta Physiol. Pharmacol. Neerlandica*, **8** (1959) 40.
- [120] Fleisher, J.H., Harris, L.W., Berkowitz, P.T., *Biochem. Pharmacol.*, **19** (1970) 421.
- [121] Ecobichon, D.J., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **54** (1976) 86.
- [122] Srivastava, A.K., Malik, J. K., *Indian. Vet. Med. J.*, **25** (2001) 49.
- [123] Lorke, D. E., Kalasz, H., Petroianu, G. A., Tekes, K., *Curr. Med. Chem.*, **15** (2008) 743-753.
- [124] Bajgar, J., *Adv. Clin. Chem.*, **38** (2004) 151–216.
- [125] Bosak, A., *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **57** (2006) 445-457.
- [126] Delfino, R. T., Ribeiro, T. S., Figueroa-Villar, J. D., *Braz. Chem. Soc.*, **20** (2009) 407-428.
- [127] Jokanović, M., Stojiljković, M.P., *Eur. J. Pharmacol.*, **533** (2006) 10-17
- [128] Kikaš, I., Škorić, I., Marinić, Ž., Šindler-Kulyk, M., *Tetrahedron*, **66** (2010) 9405-9414.
- [129] <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/4241> (pristup 26. ožujka 2019.)

## SAŽETAK

U cilju proučavanja *flow*-sinteze kod reakcija koje koriste opasne kemikalije sintetiziran je formilni derivat benzobiciklo[3.2.1]oktadiena **1** reakcijom Vilsmeierovog formiliranja. Za sintezu spoja **1** koristi se Vilsmeierov kompleks koji nastaje reakcijom DMF i opasnog, vrlo nagrizajućeg  $\text{POCl}_3$ . Reakcija se provodila u mikroreaktoru volumena 18,3  $\mu\text{L}$  te su ispitivani različiti protoci. Protokom od 16  $\mu\text{L min}^{-1}$  dobiven je spoj **1** u iskorištenju od 85 %. Spoj **1** početni je reaktant za sintezu novih potencijalno biološki vrlo korisnih oksima i oksimskih etera. Spojevi iz skupine oksima su od prije poznati dobri reaktivatori fosforiliranih kolinesteraza, kao i njihovi inhibitori. U cilju dobivanja novih i do sada literaturno nepoznatih oksima i oksimskih etera sintetizirani su, izolirani i spektroskopski okarakterizirani spojevi **2-6a**. Prilikom sinteze, osim predviđenih produkata dobiveni su i srodni derivati u kojima se otvorio furanski prsten bicikličkog kostura na dva različita načina. Određenim proučavanjima sintetiziranim i nesintetiziranim oksimima i oksimskim eterima predviđena je interakcija s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima acetil- i butirilkolinesteraze pomoću programskog paketa SeeSAR s ciljem predviđanja njihove inhibicije.

**Ključne riječi:** *flow*-sinteza, Vilsmeierovo formiliranje, oksimi, kolinesteraze, SeeSAR

## SUMMARY

### **Synthesis of the oxime derivatives as potential cholinesterase inhibitors using microreactor system**

In order to study the flow synthesis for the reactions with hazardous chemicals, formyl benzobicyclo[3.2.1] octadiene **1** was synthesized. For the synthesis of aldehyde **1** Vilsmeier's complex was used which is formed by reaction of DMF and poisonous and highly corrosive  $\text{POCl}_3$ . The reaction was carried out in a microreactor of 18.3  $\mu\text{L}$  volume with different flow rates. At a flow rate of 16  $\mu\text{L min}^{-1}$ , compound **1** was obtained in 85 % yield. Compound **1** is an initial reactant for the synthesis of a library of new potentially biologically very useful oximes and oxime ethers. The compounds with oxime functional group are well known being good reactivators of phosphorylated cholinesterases, as well as inhibitors. In order to obtain new and so far unknown oximes and oxime ethers, compounds **2-6a** were synthesized, isolated and spectroscopically characterized. In the synthesis, apart from the foreseen products, the compounds with opened furan ring at the cyclic part of the molecule were obtained. In order to predict inhibition of cholinesterases, entry of certain synthesized and unsynthesized oximes and oxime ethers in active site of acetyl and butyrylcholinesterase are shown using SeeSAR softwer.

**Key words:** flow synthesis, Vilsmeier formilation, oximes, cholinesterases, SeeSAR

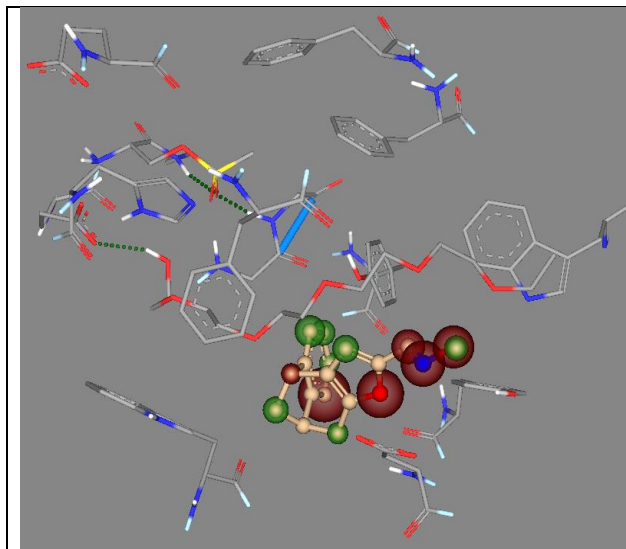
## **ŽIVOTOPIS**

**Kristina Pavlović**, rođena 31. ožujka 1996., maturirala je 2014. u Gimnaziji Karlovac, opći smjer. Iste godine upisala je preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija stručnu praksu odradila je u Zavodu za javno zdravstvo Karlovačke županije, Odjel za zdravstvenu ekologiju. Završni rad odradila je u Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić. Nakon završetka preddiplomskog studija 2017. godine upisala je diplomski studij na istom fakultetu, modul Primijenjena organska kemija tijekom kojeg je radila kao demonstrator na vježbama iz kolegija Organska kemija I i Organska kemija II.

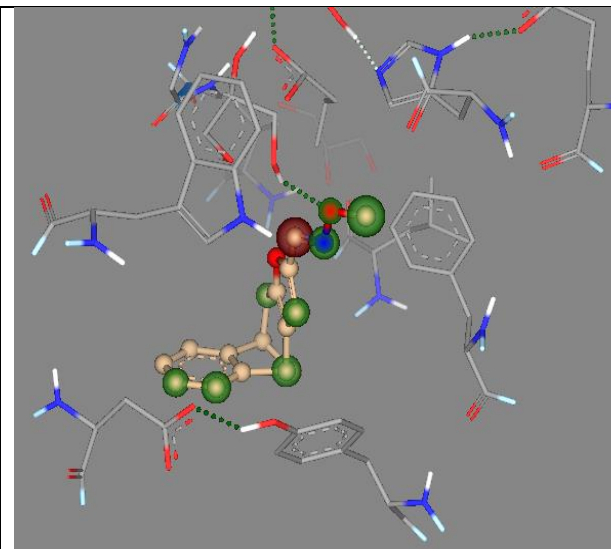


# PRILOZI

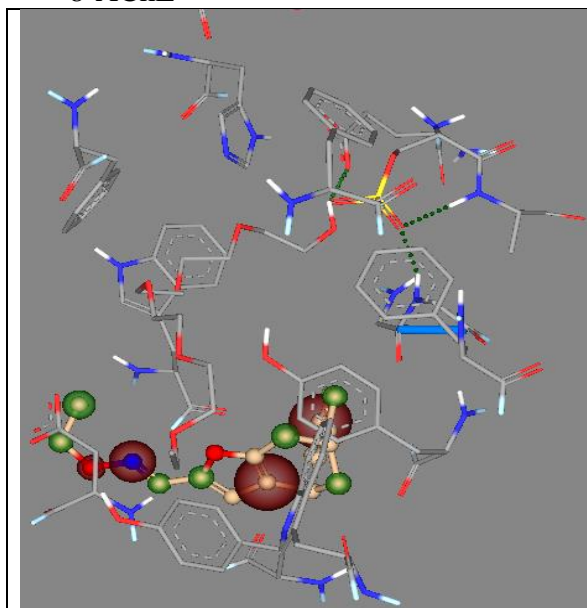
7-AChE



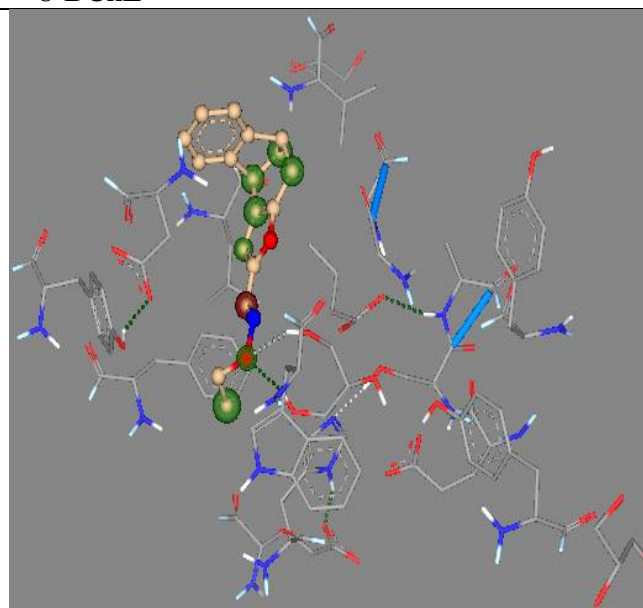
7-BChE



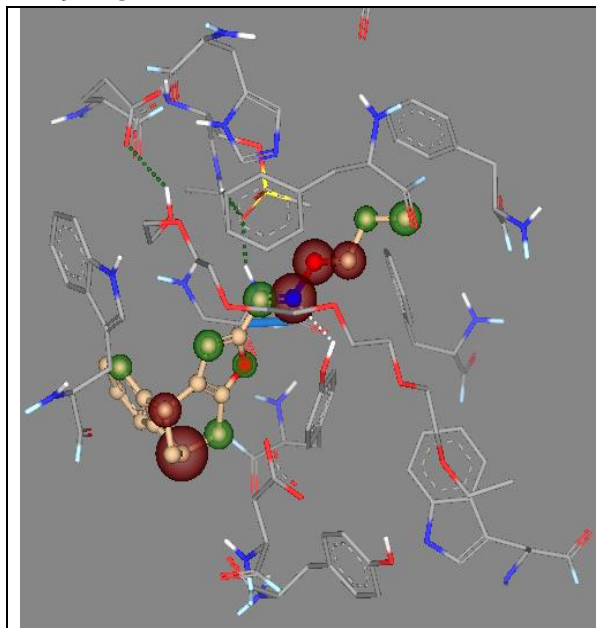
8-AChE



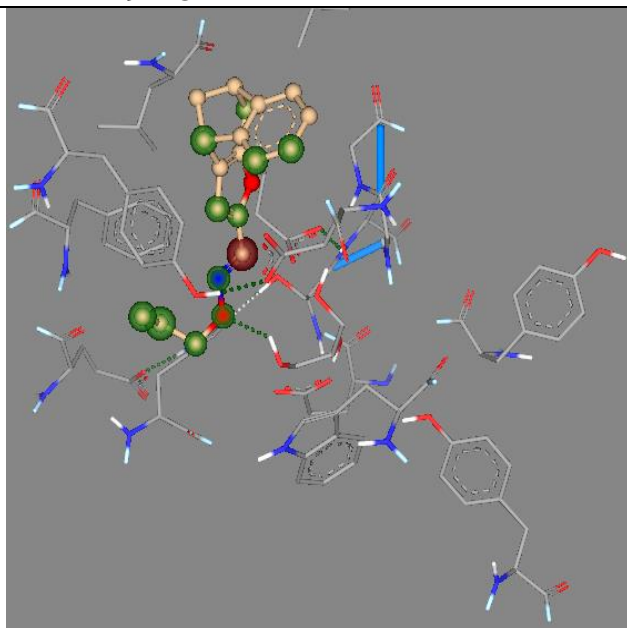
8-BChE



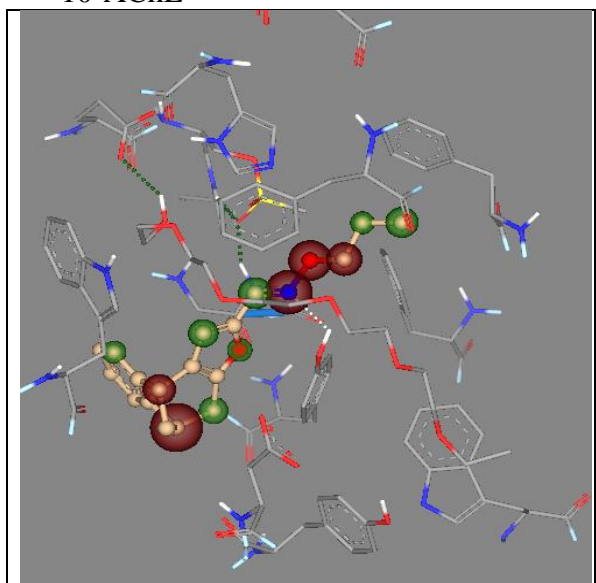
9-AChE



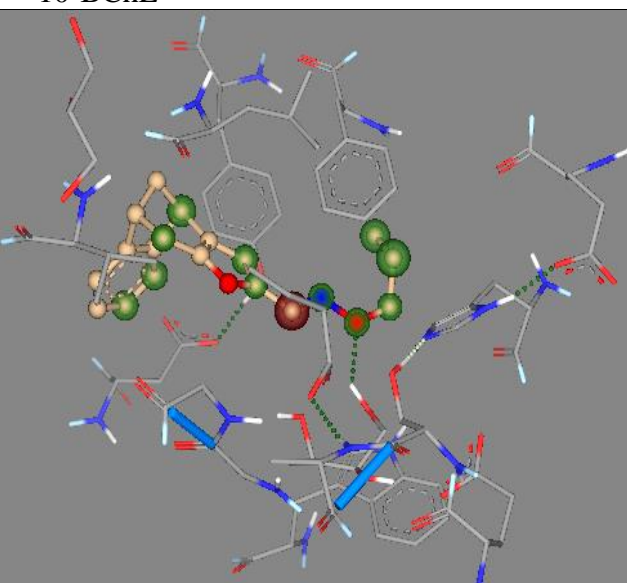
9-BChE



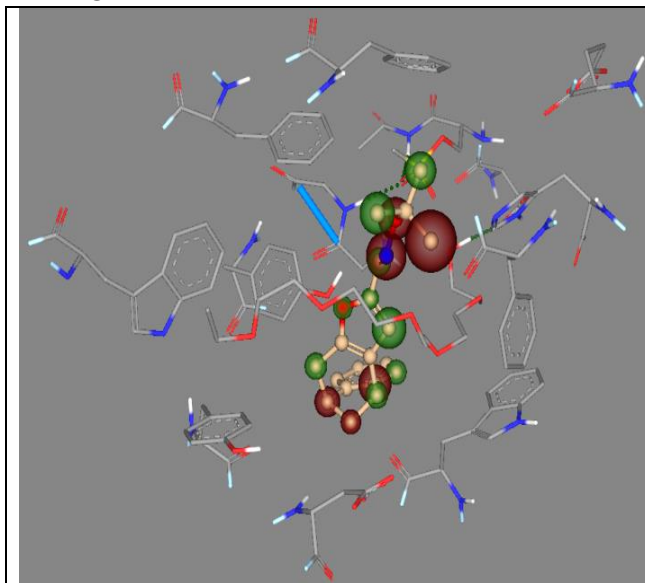
10-AChE



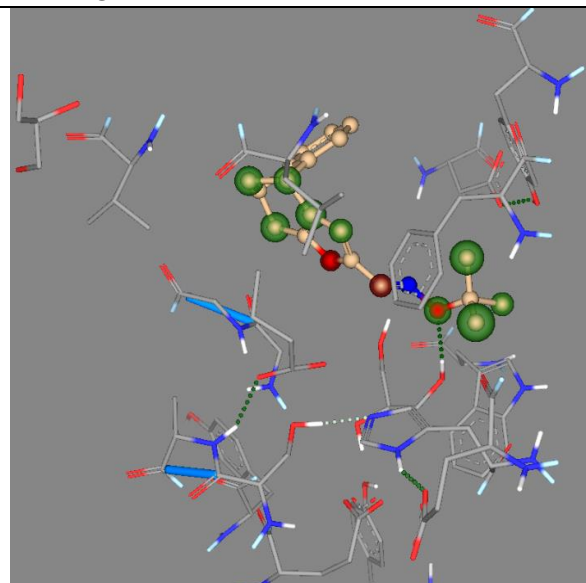
10-BChE



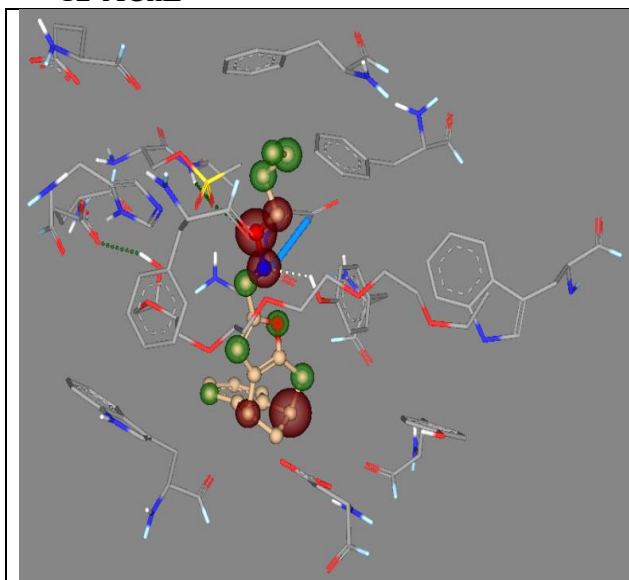
11-AChE



11-BChE



12-AChE



12-BChE

