

Primjena protočnih mili- i mikroreaktora u sintezi heterocikličkih analoga rezveratrola

Rajič, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:009219>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilišni diplomski studij

Lucija Rajič

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Lucija Rajič**

Predala je izraden diplomski rad dana: 08. lipnja 2022.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Anita Šalić, znan. sur., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Sandra Babić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 13. lipnja 2022.

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilišni diplomski studij

Lucija Rajič

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2022.

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilišni diplomski studij

Lucija Rajič

**PRIMJENA PROTOČNIH MILI- I
MIKROREAKTORA U SINTEZI
HETEROCIKLIČKIH ANALOGA
REZVERATROLA**

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Neposredni voditelji rada: Milena Mlakić, mag. appl. chem., dr. sc.

Vitomir Vušak, Anabela Ljubić, mag. ing. cheming.

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

doc. dr. sc. Anita Šalić

Zagreb, lipanj 2022.

SAŽETAK

Rezveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) je bioaktivni neflavonoidni polifenol koji ima sposobnost zaštite od kardiovaskularnih bolesti i raznih karcinoma, a također ima zaštitnu ulogu kod neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Postoji u geometrijskim izomernim oblicima kao *cis*- i *trans*-izomer. *trans*-izomer je stabilniji i povezan je s biološkim svojstvima i zdravstvenim dobrobitima, ali ovaj oblik izomerizira u *cis*-izomer kada je izložen vidljivom svjetlu ili UV zračenju. Iz tog razloga postoji stalna potraga za novim heterocikličkim analogima rezveratrola koji imaju ista bioaktivna svojstva kao *trans*-rezveratrol, ali su manje osjetljivi na svjetlost.

U ovom radu je Wittigova reakcija odabrana kao sintetski put za proizvodnju poželjnih analoga rezveratrola. Sintetizirana su četiri različita tienilna analoga (s metoksi ili hidroksi skupinom/skupinama, a utvrđeno je da oni s hidroksi skupinom/skupinama pokazuju učinkovitu aktivnost uklanjanja radikala. Reakcije su provedene u šaržnom reaktoru i intenzificirane u mili- i mikroreaktoru. Rezultati su uspoređeni na temelju konverzije, prinosa, produktivnosti i *trans/cis* omjera. Slični prinosi i pretvorbe postignuti su u svim reakcijskim sustavima, ali u mnogo kraćem vremenu na mili- i mikroskali u odnosu na šaržni reaktor. S druge strane, najveća produktivnost dobivena je u milireaktoru, što ga čini najboljim sustavom za predložene reakcije za sintezu novih heterocikličkih analoga rezveratrola.

Ključne riječi: kontinuirani protok, analozi rezveratrola, mili- i mikroreaktor, intenzifikacija procesa

SUMMARY

Application of flow milli- and microreactors in the synthesis of heterocyclic resveratrol analogues

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a bioactive non-flavonoid polyphenol that has the ability to protect against cardiovascular disease and various cancers, and also plays a protective role in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. It exists in geometric isomeric forms as *cis*- and *trans*-isomers. The *trans*-form is more stable and has been associated with biological properties and health benefits, but this form isomerizes to the *cis*-form when exposed to visible light or UV irradiation. For this reason, there is a constant search for new heterocyclic resveratrol analogues that have the same bioactive properties as *trans*-resveratrol but are less sensitive to light.

In this work, the Wittig reaction was chosen as the synthetic route for production of desirable resveratrol analogues. Four different thienyl analogues (with methoxy or hydroxy group(s)) were synthesised and it those with hydroxy group(s) were found to have exhibited effective radical scavenging activity. The reactions were carried out in a batch reactor and intensified in milli- and microreactor. The results were compared based on conversion, yield, productivity and *trans/cis* ratio. Similar yields and conversions were obtained in all reaction systems, but in much shorter time in the milli- and microscale compared to the batch reactor. On the other hand, the highest productivity was obtained in millireactor, making it the best system for the proposed reactions for the synthesis of new heterocyclic resveratrol analogues.

Keywords: continuous flow, resveratrol analogues, milli – and microreactor, process intensification

Zahvala

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, profesorici Ireni Škorić na mentorstvu pri izradi rada, na svim udijeljenim savjetima, pomoći i brizi te na ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem neposrednoj voditeljici, asistentici Mileni Mlakić na velikoj pomoći u laboratoriju, strpljenju, ugodnom društvu, savjetima i prijateljskim razgovorima.

Zahvaljujem neposrednim voditeljima i kolegama Vitomiru Vušak i Anabeli Ljubić na pomoći i odgovorima na nebrojena pitanja prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada u Plivi.

Zahvala docentici Aniti Šalić na vodstvu drugog dijela eksperimentalnog rada, na svim savjetima i pomoći.

Zahvaljujem svojim roditeljima koji su me naučili najbitnijim životnim vrijednostima i sve mi omogućili, bez vas nikada ne bih bila tu gdje jesam.

Zahvala mom zaručniku na bezuvjetnoj podršci i osloncu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. PROTOČNA KEMIJA.....	3
2.1.1 ANATOMIJA PROTOČNIH PROCESA.....	4
2.1.2. PROTOČNI REAKTORI.....	12
2.1.3 USPOREDBA PROTOČNIH I ŠARŽNIH REAKTORA.....	14
2.2. WITTIGOVA REAKCIJA.....	16
2.2.1. APLIKACIJE WITTIGOVE REAKCIJE U PROTOČNIM KONTINUIRANIM PROCESIMA.....	18
2.3. REZVERATROL.....	21
2.3.1. SVOJSTVA REZVERATROLA.....	22
2.3.2. SINTEZA DERIVATA REZVERATROLA U PROTOČNOM REAKTORU.....	24
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. MATERIJALI.....	27
3.1.1. Kemikalije.....	27
3.2. EKSPERIMENTALNI POSTUPAK ZA WITTIGOVU REAKCIJU I EPOKSIDACIJU U ŠARŽNOM REAKTORU.....	27
3.3. MILI- I MIKROREKTORSKI EKSPERIMENTI.....	29
3.3.1. <i>Eksperimenti s milireaktorom</i>	29
3.3.2. Eksperimenti u mikroreaktorima.....	31
3.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST NOVIH HIBRIDA REZVERATROLA.....	33
3.5. ANALITIKA.....	Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. SINTEZA HETEROCIKLIČKIH ANALOGA REZVERATROLA U ŠARŽNOM REAKTORU.....	35
4.2. SINTEZA HETEROCIKLIČKIH ANALOGA REZVERATROLA U MILI I MIKRO REAKTORIMA.....	39
4.3. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE NOVIH ANALOGA REZVERATROLA.....	45
5. ZAKLJUČAK	48
6. LITERATURA	49
7. PRILOZI	52
7.1. Proučavanje spektralnih promjena pod UV svjetlom.....	52
7.2. Spektroskopski podaci sintetiziranih derivata rezveratrola 1-6.....	53
7.3. Kromatogrami novih spojeva 1-6.....	56
8. ŽIVOTOPIS	60

1. UVOD

U današnje vrijeme ubrzani način života često ostavlja traga na ljudskom zdravlju, a posebno su osjetljivi kardiovaskularni i neurološki sustav. Stoga se neprestano traže novi pristupi njihovoj zaštiti. Rezveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) je bioaktivni neflavonoidni polifenol koji pripada skupini trans-stilbenskih derivata¹. To je monomerni stilben koji sadrži dva aromatična prstena funkcionalizirana s tri hidroksi skupine. Rezveratrol postoji u geometrijskim izomernim oblicima kao *cis*- i *trans*-izomer. *trans*-Izomer je stabilniji i povezan je s biološkim svojstvima i zdravstvenim prednostima. Može štiti od kardiovaskularnih bolesti i raznih karcinoma, a također igra ulogu u neurodegenerativnim bolestima poput Alzheimerove (AD) i Parkinsonove bolesti². Zbog širokog spektra fizioloških i farmakoloških svojstava privukao je interes farmaceutske industrije, industrije dodataka prehrani, nutriceutike i kozmetičke industrije. U literaturi postoje ograničeni dokazi o interakcijama UV svjetla s *trans*-rezveratrolom^{3,4}. Nažalost, *trans*-oblik izomerizira u *cis*-oblik pod utjecajem vidljivog ili UV zračenja⁵, koji je manje stabilan i ne može se komercijalno upotrebljavati. Iz tog razloga postoji stalna potraga za novim heterocikličkim analogima rezveratrola koji imaju ista bioaktivna svojstva kao *trans*-rezveratrol, ali su manje osjetljivi na svjetlost. Rezveratrol, ali i njegov derivat pterostilben, štite od sindroma demencije kao što je AD⁶. Pterostilben (*trans*-3,5-dimetoksi-4-hidroksistilben) je prirodni spoj koji se prvenstveno nalazi u borovnicama i u *Pterocarpus marsupium* (PM)⁷. Pri njihovoj usporedbi, utvrđeno je da je pterostilben učinkovitiji u borbi protiv promjena u mozgu uzrokovanih starenjem jer ima bolja farmakokinetička svojstva u usporedbi s rezveratrolom. Pterostilben je lipofilniji od rezveratrola jer u svojoj strukturi ima dvije metoksi-skupine umjesto hidroksilnih skupina (kao u slučaju rezveratrola). Dodatno, oba su spoja poznata po svom antioksidativnom djelovanju⁸.

Neki od prirodnih izvora rezveratrola su ljubičasto grožđe, crno vino, borovnice, murve, rabarbara, kikiriki, brusnice, čokolada, borovi i kikiriki. *Trans*-rezveratrol se nalazi u kožici grožđa, kikirikiju, soji, čaju i drugim biljkama. U ljudsku prehranu se uglavnom unosi konzumacijom vina u kojem se nalaze i *trans*- i *cis*-izomeri⁹. Nažalost, količine rezveratrola u tim biljkama su male, a na njegovu sintezu utječu klima i geografski položaj. Stoga je kemijska sinteza još uvijek glavni način dobivanja ovog vrijednog spoja. Jedan od načina je primjena Wittigove reakcije i njezinih modifikacija. Ova reakcija je jedna od najvažnijih i najraznovrsnijih reakcija u organskoj kemiji za sintezu alkena s nedvosmislenim

pozicioniranjem dvostruke veze. Kada se aldehid i Wittigova sol uvedu u reaktor, oni reagiraju obradom s vodenom otopinom natrijevog hidroksida kako bi nastao odgovarajući nezasićeni Wittigov produkt. Omjer *trans/cis*-izomera ovisi o supstituentima koji stabiliziraju međuprodukt. U slučaju spojeva sličnih rezveratrolu, cilj je stvoriti visoki *trans/cis* omjer izomera željenog stilbenskog kostura tijekom sinteze. Koliko nam je poznato, ovo je prvi primjer Wittigove reakcije primijenjene za sintezu analoga rezveratrola.

Dodatno, radi intenziviranja procesa, sve se više pažnje posvećuje sintezi u mili- (1000 μm – nekoliko mm unutarnji promjer u.p.) i mikro-protočnim (10 - 1000 μm u.p.) sustavima (kemija protoka) u organskoj kemiji. Ovaj pristup ima brojne prednosti u odnosu na šaržnu sintezu, kao što su veća učinkovitost, kontrolirano miješanje (i brzo i sporo), ekološka prihvatljivost i sigurnost, precizna kontrola parametara reakcije i prednost rukovanja toksičnim i korozivnim reagensima u zatvorenom sustavu. Sustavi su vrlo povoljni za izvođenje egzotermnih reakcija, visokoreaktivnih reagensa i nestabilnih međuprodukta. Skraćivanje vremena reakcije također izbjegava stvaranje nepoželjnih nusproizvoda. I premda je početna veličina mili- i mikroprotočnih sustava manja u usporedbi s klasičnim šaržnim reaktorima, oni mogu proizvesti više proizvoda u danom vremenu nego analogni šaržni reaktor pod optimalnim uvjetima¹⁰.

U ovom radu će se provesti niz reakcija za sintezu novih heterocikličkih analoga rezveratrola šaržnom sintezom, te u mili- i mikroreaktorima, u kojima će se mijenjati reakcijski uvjeti radi povećanja učinkovitosti i produktivnosti procesa.

2. OPĆI DIO

2.1. PROTOČNA KEMIJA

Uloga organske sinteze u današnje vrijeme sve više dobiva na važnosti radi pojave novih materijala i novih ljekovitih sredstava te je, potaknuta boljim razumijevanjem čimbenika koji upravljaju organskim reakcijama i sve moćnijim instrumentima i analitičkim alatima, proširena na gotovo sva područja znanosti.

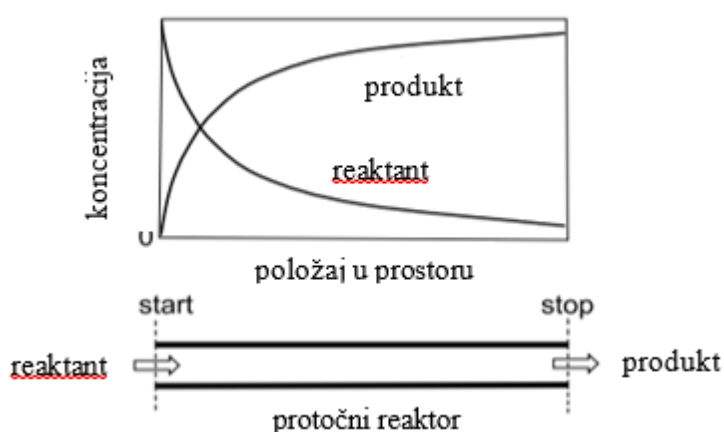
Organska sinteza u laboratoriju se odvija u standardiziranom laboratorijskom posuđu te se laboratorijska oprema u principu nije promijenila još od vremena Justusa Liebiga¹¹. Uobičajeno se kemijske reakcije provode u šaržnim reaktorima kao što su tikvice, vjerojatno zato što je tim šaržnim reaktorima lako rukovati i lako je zamisliti kako se reakcija u njima odvija. Otopini polaznog materijala doda se reagens ili katalizator te započinje reakcija. Ponekad se smjesa i zagrijava kako bi potaknula početak reakcije. Većina poznatih sintetskih reakcija razvijena je upravo u tikvici. Međutim, postoje i drugi tipovi reaktora, kao što su reaktori s kontinuiranim protokom ili protočni (*flow*) reaktori. Ovakva kemija podrazumijeva korištenje cijevi ili kanala pri provođenju reakcija u kontinuiranom toku umjesto u tikvici, a polazni materijali i reagensi se pumpanjem dovode do ulaza u reaktor i prolaze kroz reaktor do mjesta sakupljanja¹².

Nekoliko je osnovnih razlika između šaržnih i protočnih procesa. U šaržnim procesima vrijeme reakcije određuje se time koliko dugo je tikvica (reaktor) držana na određenoj temperaturi, dok su kod protočnih procesa volumen reaktora i brzina protoka reagensa glavni parametri pri određivanju vremena reakcije. U protočnim je procesima stehiometrija definirana koncentracijom reagensa i omjerom njihovih protoka, dok je u šaržnim procesima definirana koncentracijom reagensa i njihovim volumnim omjerom¹¹. Reakcije koje se odvijaju u više koraka ili stupnjeva u protočnim procesima se provode na potpuno drugačiji način u odnosu na šaržni proces, korištenjem nekoliko linearno raspoređenih protočnih reaktora. Reagensi se mogu uvesti u struju reaktanata bilo gdje u protočnom sustavu u točno određenom vremenu potrebnom za određenu reakciju. Također, protočni procesi važni su i za provođenje fotokemijskih reakcija ili za primjerice sintezu kod koje se koriste opasni plinovi kao što su ozon, ugljikov monoksid ili dušikov monoksid kao reagensi. Uvećanje određene reakcije (*scale-up*) u protočnim procesima se može brzo postići uz malo ili ponekad nimalo rada na razvoju procesa; promjenom volumena reaktora ili paralelnim pokretanjem nekoliko protočnih reakcija (pod uvjetom da se ponovno izračunaju protoci kako bi se postiglo isto vrijeme zadržavanja)¹¹.

Protočna kemija, kontinuirani proces, kontinuirana proizvodnja – samo su neka od imena koja se koriste za protočne procese čija se upotreba u sintetskoj kemiji tijekom posljednjih deset godina rapidno širi. Ideja kontinuiranog unosa početnih materijala povezanog s kontinuiranim uklanjanjem produkta iz procesa nije novi koncept, niti je ograničena samo na kemijsku proizvodnju. Još 1913. godine je izvorni Haber-Boschov proces (proces sinteze amonijaka) bio kontinuiran¹³. Ipak, današnja definicija protočne kemije je doista nova i čvrsto je ukorijenjena u 21. stoljeću. Rane protočne reaktore inženjeri su konstruirali i često su to bile složene modularne jedinice ili silicijski čipovi. Današnji protočni reaktori sastoje se od jednostavnih cijevi i konektora ili integriranih komercijalnih sustava. Mnogi atraktivni atributi protočnih reaktora mogu se postići s običnim jeftinim cijevima i spojevima.

2.1.1 ANATOMIJA PROTOČNIH PROCESA

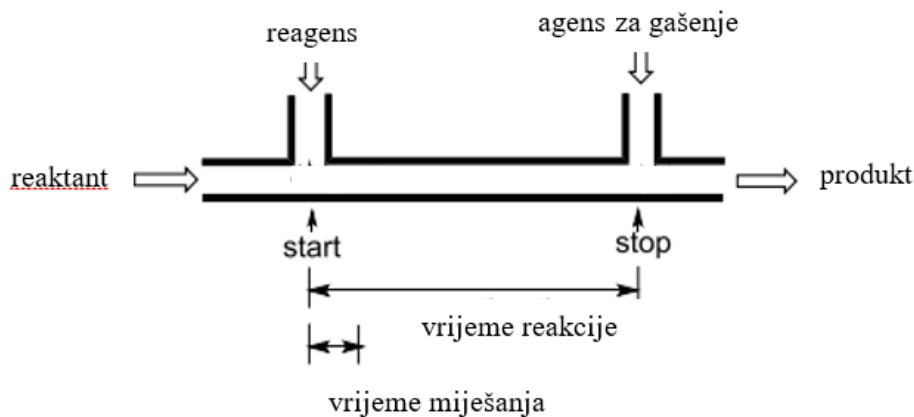
U protočnim reaktorima reakcija se odvija putovanjem reaktanata kroz reaktor. Stoga se koncentracija reaktanata smanjuje povećanjem udaljenosti od ulaza u reaktor, dok koncentracija produkta raste i doseže maksimum na izlazu iz reaktora (ako ne dođe do prekomjerne reakcije ili razgradnje produkta). U stacionarnom stanju se koncentracije reaktanata i produkata ne mijenjaju tijekom vremena. Stoga, vrijeme reakcije u protočnom reaktoru korelira s položajem u prostoru unutar reaktora. To znači da se vrijeme reakcije može kontrolirati prilagođavanjem duljine protočnog reaktora, a može se mijenjati i brzinom protoka reaktanata¹².



Slika 1. Profil reakcije u protočnom reaktoru¹².

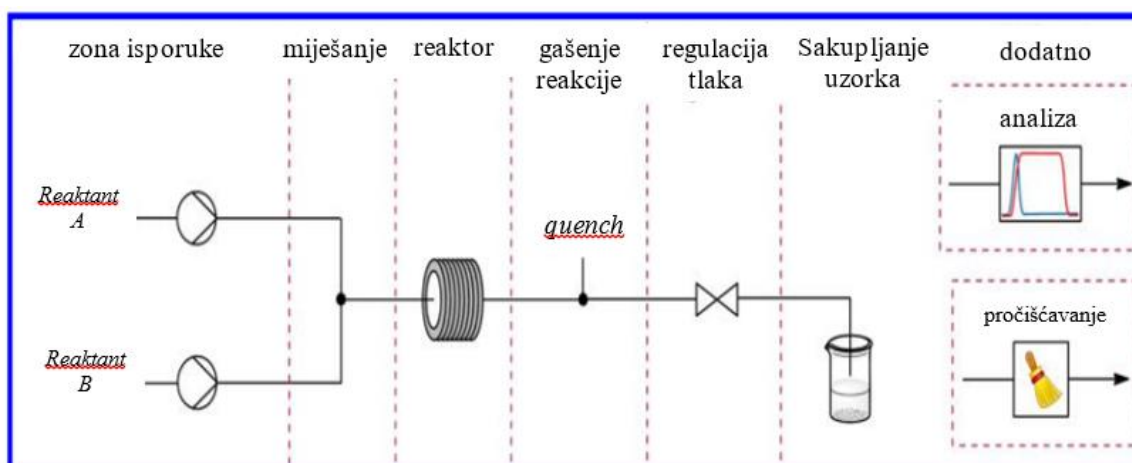
Vrijeme koje otopina provede u reaktoru naziva se vremenom zadržavanja. Vrijeme reakcije može se precizno kontrolirati vremenom zadržavanja, podešavanjem duljine cijevi i brzine

protoka što je jedna od najpovoljnijih značajki protočnih reaktora. Reakcije često započinju miješanjem dviju reagirajućih komponenti, a zaustavljaju se dodavanjem reagensa za gašenje reakcije (*quench*). Vrijeme reakcije definira se kao vrijeme između početka miješanja reaktanata i miješanja reakcijske smjese s reagensom za gašenje. Može se reći i da je vrijeme reakcije definirano kao vrijeme zadržavanja između položaja ulaza reaktanata i položaja ulaza reagensa za gašenje, a može se precizno kontrolirati podešavanjem duljine cijevi između ova dva položaja¹².



Slika 2. Kontrola vremena reakcije podešavanjem vremena zadržavanja između ulaza reaktanata i reagensa za gašenje reakcije¹².

Tipičan kontinuirani proces korišten za sintetičke primjene može se raščlaniti na osam osnovnih zona; zona isporuke tekućina i reagensa, zona miješanja, reaktor, zona gašenja reakcije, regulacija tlaka, zona sakupljanja uzorka, te analiza i pročišćavanje (slika 3)¹⁴.



Slika 3. Zone standardne postave kontinuiranog procesa s dva dovoda¹⁴.

Za početak, sustav za isporuku tekućina i reagensa je nužan za precizno dovođenje odgovarajućih supstanci u protočni sustav. Ove supstance udružene su u sljedećem modulu

pomoću namjenskog uređaja za miješanje, prije ulaska u reaktorsku jedinicu gdje se događa kemijska reakcija. Reaktorska je jedinica direktno povezana s modulom za gašenje reakcije, kojim se postiže precizna kontrola vremena zadržavanja. Regulator tlaka omogućava provođenje režima povišenog tlaka, a obično je smješten direktno ispred zone sakupljanja produkta. Osim toga, dodatno mogu biti implementirani različiti alati za analizu kao i kontinuirani moduli za pročišćavanje. Bitno je napomenuti da se svi ovi pojedinačni dijelovi mogu međusobno izmjenjivati i ponavljati, što može rezultirati beskonačnim brojem mogućih modifikacija i kreiranjem različitih višestupanjskih sekvenci koje se onda mogu primijeniti na sintezu prirodnih proizvoda ili proizvodnju lijekova¹⁴.

2.1.1.1. Isporuka tekućina i reagensa

Precizna kontrola kretanja iznimno je važna za protočne procese jer ne samo da regulira vrijeme zadržavanja, već također utječe na stehiometriju ako se dva ili više tokova reagensa kombiniraju u naknadnoj jedinici za miješanje. Kontrola kretanja se u većini slučajeva postiže primjenom tehnika povišenog tlaka, tj. hidrodinamičkim pumpanjem, gdje se stvara razlika tlaka između ulaza i izlaza iz reaktorske jedinice¹⁵. Drugim riječima, sustav isporuke tekućina treba biti sposoban premašiti tlak postavljen modulom za regulaciju tlaka. Dostupne su različite metode za isporuku homogenih i heterogenih otopina. Ovisno o brzini protoka, tlaku u sustavu i samoj prirodi tekuće faze, obično se koriste tri različite vrste pumpi: HPLC pumpe, pumpe sa špicama (jednostruke i dvostruke, *syringe*) te peristaltičke pumpe. HPLC pumpe često se koriste s niskim do visokim tlakovima i protocima većim od 0.1 mL/min¹⁴. Kod korištenja HPLC pumpe mogu se pojaviti problemi s pumpanjem ako se koriste hlapljiva otapala, kao što je primjerice metilen-klorid. To se može izbjeći degaziranjem (otplinjavanjem) i/ili predtlakom otapala. Pretežno se koriste pri višim protocima i dugotrajnijim procesima, ali su njihove brtve osjetljive i podložne oštećenjima uzrokovanim mjehurićima zraka ili česticama¹⁵. Niži protoci mogu se precizno pumpati jednostavnim jednostrukim pumpama sa špicama. Ove pumpe doziraju unaprijed definiranu količinu tekućine, a to ograničava vrijeme i opseg rada. Nedostatak pumpi sa špicama je što ne mogu raditi na povišenim tlakovima. Naprednije verzije ovih pumpi sastoje se od dvije neovisne šprice u kojima jedna isporučuje otopinu u protočni sustav dok se druga istovremeno puni. Nakon što se prva isprazni, uloga im se mijenja te sada druga šprica (koja je napunjena) isporučuje otopinu u protočni sustav dok se prva šprica puni. Time se omogućuje njihov kontinuirani rad. Još jedan nedostatak kod ovih pumpi je ograničena količina punjenja¹⁵. I kod HPLC pumpi i kod pumpi sa špicama tekućina je u izravnim kontaktu s brtvom pumpe te može doći do onečišćenja, oštećenja ili taloženja čestica

polaznih materijala te posljedično blokiranja i štopanja pumpi. Kako bi se izbjegli ovi problemi koriste se peristaltičke pumpe koje su sposobne pumpati i suspenzije, a njihovo pumpanje se temelji na pomicanju središnjeg rotora koji pritišće fleksibilnu cijev¹⁵.

2.1.1.2. Povezivanje procesa

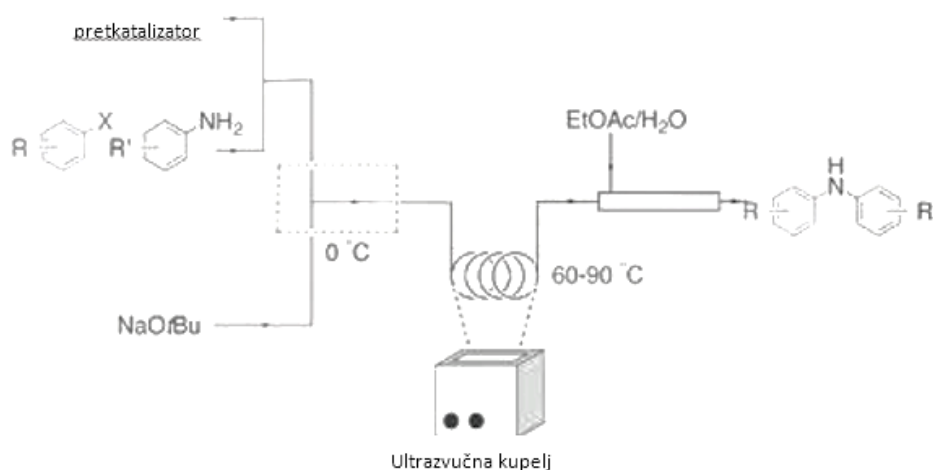
Veze između različitih zona protočnog procesa sastoje se od cijevi i dijelova kao što su matice i ferule koje se koriste za sigurno pričvršćivanje cijevi na svaku odgovarajuću jedinicu. U većini slučajeva, sve komponente potrebne za spajanje modula identične su onima koje se koriste u standardnim HPLC uređajima i stoga su lako dostupne¹⁵. Dimenzije i materijal od kojih su cijevi proizvedene su izrazito važni jer su u izravnom kontaktu sa strujom reaktanata i reakcijskom smjesom. Pri odabiru cijevi moraju se uzeti u obzir fizički parametri poput željenog tlaka i temperature u sustavu i kemijske kompatibilnosti. Primjerice, za reakcije i procese koji se provode pri niskom i srednjem tlaku (< 30 bara) prikladni su i najčešće se koriste inertni perfluorirani polimeri kao što su PTFE, PFA, PEEK i FEP¹⁴. Visokotlačni procesi (na primjer, reakcije koje se provode na temperaturi daleko iznad vrelišta reakcijskog medija ili reakcije provedene korištenjem superkritičnih otapala) zahtijevaju robusnije materijale kao što su nehrđajući čelik ili posebne legure¹⁵. Za neke specifične primjene, a posebno u slučaju mikrofluidnih reaktorskih jedinica, vjerojatno će biti potrebna sofisticiranija sučelja.

2.1.1.3. Miješanje

Miješanje se u kontinuiranim procesima može podijeliti na aktivno i pasivno miješanje. Aktivno miješanje odnosi se na metode gdje je uključen vanjski izvor energije, kao što je ultrazvuk, kako bi se poboljšalo miješanje u reaktoru. S druge strane, pasivno miješanje se događa brzinom proporcionalnom svojstvima tekućine, brzini pumpanja i fizičkom putu kroz odgovarajuću jedinicu za miješanje. U brojnim slučajevima se koriste jednostavni konektori kao što su T ili Y oblikovani konektori za spajanje dvije ili više struja reagensa u protočnim procesima¹⁴. Ako je potrebno iznimno brzo miješanje u procesu, kao na primjer u reakcijama koje uključuju vrlo reaktivne tvari, koriste se jedinice koje smanjuju vrijeme miješanja. Primjer jednostavnog načina postizanja brzog miješanja može uključivati T-mikser sa vrlo malim unutarnjim promjerom u kombinaciji sa velikim protocima. Potrebno je biti svjestan kinetike svake dane reakcije kako bi se pravilno dizajnirala prikladna postava procesa.



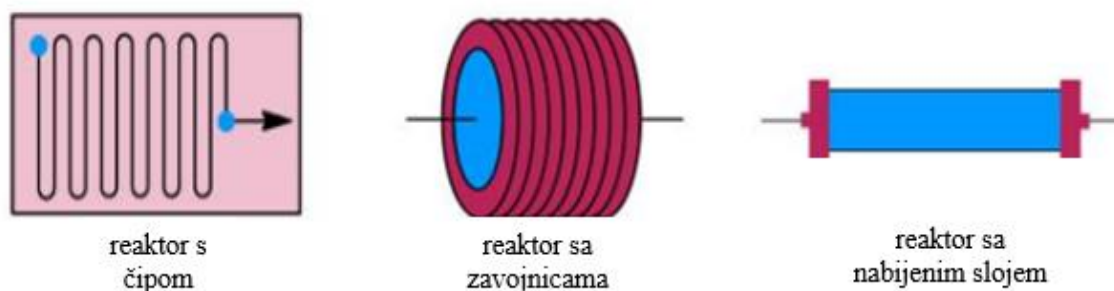
Slika 4. Pasivno miješanje moguće je pomoću a) Y miksera, b) T miksera.



Slika 5. Shema procesa provedenog uz aktivno miješanje uz pomoć ultrazvučne kupelji¹⁶.

2.1.1.4. Reaktor

Ova zona predstavlja jezgru, odnosno kostur svakog protočnog sustava u kojem dolazi do kemijske reakcije. Reaktori se općenito mogu podijeliti na tri glavne vrste: reaktori s čipom, reaktori sa zavojnicama i reaktori s nabijenim slojem¹⁴.



Slika 6. Tipovi reaktora korištenih u kontinuiranim procesima¹⁴.

Priroda reakcije (egzo- ili endotermna, elektrokemijska, fotokemijska, višefazna,..) određuje tip reaktora koji će biti korišten. U pravilu, grijanje ili hlađenje reaktora postiže se

konvencionalnim načinima kao što su uranjanje reaktora u grijanu ili hladenu kupelj, ili korištenjem specijaliziranih tehnologija kao što su jedinice za kriogeno hlađenje, mikrovalno zračenje ili induktivnim grijanjem. Fotokemijske reakcije zahtijevaju svjetlosno prozirnu reaktorsku jedinicu i poseban izvor svjetlosti. Reaktori s čipom omogućavaju najbolji prijenos topline zbog iznimno visokih omjera površine i volumena. Obično se proizvode specijaliziranim tehnikama od silicija, stakla, keramike ili nehrđajućeg čelika⁴. Reaktori sa zavojnicama poprilično su jeftini u odnosu na reaktore sa čipovima te su najčešće korišteni u sintetskim protočnim procesima. Uobičajeno se sastoje od jednostavnih, komercijalno dostupnih cijevi najčešće napravljenih od inertnih fluoropolimera kao što su PTFE, PFA ili FEP ili nehrđajućeg čelika (SST)¹⁵. Često su vanjskog promjera 1/8" ili 1/16" i različitih unutarnjih promjera (0.01", 0.02", 0.03", 0.04", 1/16", itd.) Izbor materijala i dimenzija ovisi o primjeni i uvjetima procesa.

Tablica 1. Raspon primjene najčešćih materijala koji se koriste pri izradi protočnih reaktora¹⁴.

uvjeti	PTFE	PFA	FEP	SST
niski T / p (<50°C, <5 bar)	*	*	*	*
visoki T / p (<150°C, <20 bar)	o	o	o	*
vrlo visoki T / p (>150°C, >20 bar)	x	x	x	*
UV – Vis	o	o	*	x
korozivni reagensi	*	*	*	o

*= može se koristiti; o = postoje neki nedostaci; x = nije izvedivo.

Temperaturna i tlačna stabilnost fluoropolimera ovisi o debljini stijenke (vanjski promjer - unutarnji promjer). Za UV/Vis zračenje, FEP se pokazao idealnim radi njegovih odličnih transmisijskih svojstava¹⁴. Nehrđajući čelik se izabire kod visokotemperaturnih reakcija i reakcija pri visokom tlaku, ali otpor prema visoko korozivnim reagensima i uvjetima mu je limitiran. Reaktori s nabijenim slojem koriste se kod heterogenih katalizatora ili reagensa. Uobičajeni reaktori s nabijenim slojem uključuju kolone izrađene od stakla, polimernih materijala ili nehrđajućeg čelika s namjenskim završnim dijelovima koji se mogu ponovno

zatvoriti i sadrže filtarsku jedinicu. Najpopularnija primjena ovog tipa reaktora je kod katalitičke hidrogenacije u trofaznom sustavu (plin/kapljevina/krutina)¹⁵.

2.1.1.5. Regulacija tlaka

Regulatori protutlaka (*back pressure regulators*, u daljnjem tekstu *BPR*) su posebni ventili koji se dodaju u sustav da rade pri konstantnom uzvodnom tlaku sustava. Rad pri povišenim tlakovima ne samo da dozvoljava provedbu procesa iznad temperatura vrelišta reakcijske smjese, već također omogućava superiornu kontrolu i povećanje protoka kada se koriste hlapljivi i plinoviti reagensi ili međuprodukti. Nužni su za reproduktivnost u reakcijama gdje dolazi do oslobađanja plinova, budući da povišenje tlaka može zadržati plinove u otopini što smanjuje mogućnost remećenja vremena zadržavanja. Dva tipa regulatora su najčešće korišteni u protočnim procesima. Unaprijed postavljeni (*preset*) regulatori djeluju na unaprijed definiranim vrijednostima tlaka te im nisu potrebni dodatni senzori tlaka. Često su to mali uređaji u kojima tekućina pritišće klip s oprugom dok ne postigne unaprijed postavljeni tlak kada dolazi do otvaranja i propuštanja tekućine koja teče kroz regulator sve dok tlak ostaje iznad zadane vrijednosti. Prilagodljivija, iako skuplja verzija regulatora je regulator sposoban prilagoditi tlak u sustavu bez prekidanja procesa. U ovim se sustavima koristi referentni tlak prema dijafragmi za precizno postavljanje tlaka sustava preko mehaničkih sila ili tlaka plina. Oba modela obično pokrivaju širok raspon tlaka (do 70 bara) i mogu se koristiti kod provedbi jednofaznih i dvofaznih (plin/tekućina, tekućina/tekućina) reakcija.

2.1.1.6. Sakupljanje uzorka

Nakon smanjenja tlaka reakcijske struje što slijedi nakon regulatora tlaka, reakcijska smjesa (odnosno produkt) se obično skuplja u tikvicu ili vialu. Mogu se instalirati i sakupljači frakcija.

2.1.1.7. Dodatne zone

Analiza

Analiza reakcijske smjese može se provoditi na tri različita načina tijekom kontinuirane sinteze. Za pokuse laboratorijske skale najčešće se koristi *offline* analiza. Reakcijske smjese su ručno sakupljene i pripremljene za analizu (primjerice GC, HPLC, NMR i sl.). Ovakav pristup je najčešće dovoljan pri provedbi projekata⁴. Ipak, u nekim slučajevima su interesantne i *online* ili *inline* tehnike analize. *Online* analiza podrazumijeva da je reakcijska smjesa povremeno periodično analizirana bez ručnog transfera preko sustava koji automatski uzorkuju alikvotne i prebacuju ih u odgovarajući analitički instrument¹⁴. Moguće je uvođenje različitih analitičkih

tehnika kao što su HPLC, GC, masena spektroskopija, rendgenska spektroskopija i sl. Također, ako je analitička metoda nedestruktivna i dozvoljava analizu u realnom vremenu (kao što su FTIR, UV-Vis ili NMR spektroskopija) izvediva je integracija i takve jedinice za analizu u protočni proces (*inline*)¹⁴.

Pročišćavanje

Slično kao kod analitičkih procedura, većina koraka pročišćavanja se oslanjaju na konvencionalne metoda te slijede nakon skupljanja reakcijske smjese iz protočnog sustava¹⁵. Ipak, ako bi kompleksne ciljane molekule kao što su aktivne farmaceutske tvari (*API – active pharmaceutical ingredients*) trebale biti potpuno kontinuirano sintetizirane, potrebno je provoditi *inline* pročišćavanje između kemijskih reakcija. Najčešće korištena tehnika je ekstrakcija tekuće/tekuće koja se provodi tehnikama na bazi membrane. Ekstrakcijsko otapalo je dodano u reakcijsku struju pomoću miksera te smjesa prolazi kroz jedinicu u kojoj se zadržava određeno vrijeme radi ekstrakcije. Smjesa zatim ulazi u jedinicu u kojoj se nalazi membrana koja se obično sastoji od PTFE membrane smještene između dva protočna kanala. Organska faza može proći kroz hidrofobnu membranu te dolazi do razdvajanja nakon kojeg se obje faze mogu koristiti u daljnjem toku procesa¹⁴.

2.1.2. PROTOČNI REAKTORI

Za izvođenje željene reakcije ključan je odabir optimalnog reaktora, a to zahtijeva usklađivanje njegovih karakteristika sa kinetikom reakcije. Tijekom posljednja dva desetljeća, tehnologija protočnih reaktora je sazrela od ranih uređaja i koncepata do raznovrsne komercijalne opreme i aplikacija. Rani protočni reaktori su se uobičajeno proizvodili od stakla, silikonskog stakla, keramike ili nehrđajućeg čelika kako bi postigli specifične reakcijske uvjete (kao što su primjerice visoki tlakovi ili temperatura), ali njihova je proizvodnja bila skupa i nisu bili dovoljno fleksibilni. Primjeri aplikacije tih ranih reaktora su najčešće uključivali neke relativno jednostavne kemijske reakcije dizajnirane kako bi se istaknule određene prednosti kontinuiranih procesa na maloj (mili- ili mikro-) skali. Razvoj jeftinijih reaktora, često baziranih na perfluoriranim polimerima ili nehrđajućim cijevima, doveo je do prihvaćanja kontinuiranih procesa od strane zajednice organskih kemičara, sa brzim razvojem novih tipova provedenih reakcija i aplikacija¹⁷.

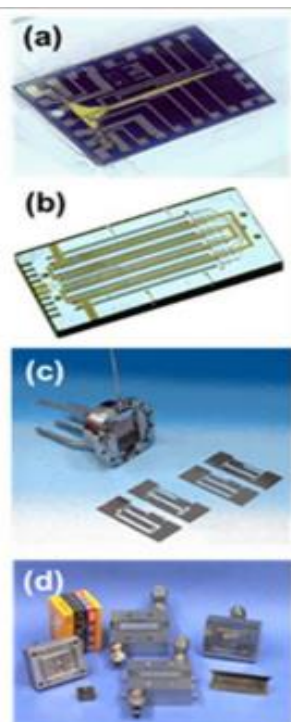
Postoji vrlo široki raspon različitih protočnih reaktora, od kojih neki imaju vrlo specifičan dizajn primjeren za njihovu upotrebu. Najčešće korišteni protočni reaktori korišteni u laboratorijima za organsku sintezu mogu se svrstati u dvije grupe; mikroreaktori i milireaktori (prema veličini)¹⁷.

2.1.2.1. Mikroreaktori

U principu, mikroreaktori su uređaji sastavljeni od uskih cijevi (širina <1 mm), povezanih preko ulaza/izlaza, u kojima se reakcija odvija kontinuiranim procesom pod strogo kontroliranim uvjetima. Polazni reagensi ili materijali su kontinuirano pumpani u mikroreaktorski sustav kako bi reagirali pod kontroliranim uvjetima tijekom određenog vremena (vrijeme zadržavanja) te je produkt kontinuirano prikupljan pri optimiziranim uvjetima. Mikroreaktorska tehnologija pruža jedinstven način provođenja raznovrsnih kemijskih reakcija brzo i na siguran način pritom zadovoljavajući standarde zelene kemije¹⁷.

Mikroreaktori nude izvrsne uvjete miješanja, obično uzrokovane zavojima u cjevčicama gdje dolazi do stvaranja vrtloga koji osiguravaju stabilno stanje u procesu i generiraju daljnje miješanje duž reaktora. Prednost mikroreaktora je upotreba vrlo malih volumena polaznih materijala, što ih čini idealnima za sintezu skupih i dragocjenih materijala. Njihova upotreba omogućava izvanrednu kontrolu dinamike fluida, te je tako moguće i precizno konstruiranje oblika kao što su sferične čestice ili pjena. Mogu se koristiti u monofaznim protočnim

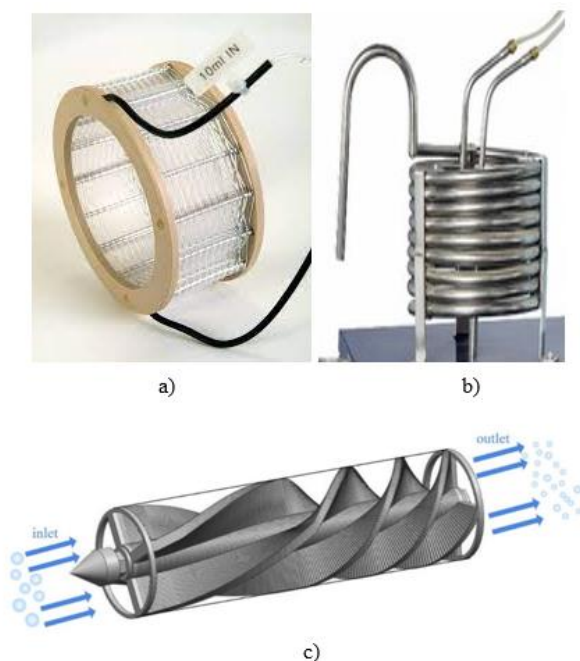
procesima gdje postoji samo jedna struja reagensa ili u segmentiranim protočnim procesima gdje postoji dvije ili više faza (tekuće/tekuće, plin/tekuće, itd.)¹⁸.



Slika 7. Neke komercijalizirane vrste mikroreaktora; a) tankoslojni silicijski mikroreaktor, b) minijaturni staklo-silicij reaktor s nabijenim slojem, c) mikroreaktor od nehrđajućeg čelika, d) mikroreaktor s mjehurastim stupcem, od nehrđajućeg čelika¹⁵.

2.1.1.2. Milireaktori

Milireaktori su sastavljeni od nešto širih cijevi nego mikroreaktori (> 1 mm). Milireaktori imaju široki spektar različitih dizajna za slične aplikacije te su upravo zbog toga često korišteni u laboratorijskoj sintezi. Izvrsno miješanje koje je prisutno kod mikroreaktora, kod milireaktora slabi povećanjem širine cijevi¹⁷. Stoga su istraživana i u konačnici i razvijena različita rješenja kako bi se to izjednačilo i kako bi se u konačnici dobila homogena reakcijska smjesa. Primjerice, često se u sustav ugrađuju statični mikseri (*static mixer*) u kojima su ugrađeni zavoji radi kojih dolazi do boljeg razmješavanja reakcijske smjese te se cjelokupno miješanje reakcijske smjese poboljšava. Milireaktori su primjenjiviji za povećanje proizvodnje (scale up) finih čestica i kristalizaciju čestica nekompatibilnih sa mikroreaktorima¹⁸.



Slika 8. a) milireaktor od PFA cijevi, b) milireaktor od nehrđajućeg čelika, c) unutarnji prikaz statičkog miksera.

2.1.3 USPOREDBA PROTOČNIH I ŠARŽNIH REAKTORA

Tijekom ranog razvoja protočnih reaktora veći dio rada bio je posvećen prevođenju dobro poznate šaržne kemije u protočnu. Daljnji razvoj odvijao se tako da je sve više sintetskih kemičara počelo prihvaćati temeljne principe protočne kemije te koristiti stečena znanja i pomoću njih razvijati nove metode protočnih procesa od samog početka bez posredovanja šaržnih procesa. Neke od tih novorazvijenih reakcija mogu se provesti samo u protočnom procesu³. Stoga je neizbježno pitati se koje su prednosti protočne kemije i zašto se neke metode mogu učinkovito izvesti samo protočnim procesom?

Popriličan je broj prednosti kontinuirane protočne sinteze u usporedbi sa šaržnom sintezom. Kontinuirani procesi općenito su prikladniji za automatizaciju od šaržnih procesa. Budući da se otopine polaznih materijala pumpaju pumpama, uključivanje/isključivanje protoka i brzina protoka se mogu lako mijenjati i programirati, a moguće je isprogramirati i uzastopne reakcije različitih kombinacija supstrata i reagensa. Protočni procesi omogućuju sigurniju upotrebu opasnih kemikalija, a i opasne reakcije se mogu provoditi na kontroliran način u kontinuiranim procesima. Protočni sustavi su poprilično učinkoviti pri preciznoj kontroli reakcije na vremenskim skalama od 1 sekunde ili manje. Ova značajka precizne i kratke kontrole vremena reakcije iznimno je korisna u kontroliranju reakcija koje uključuju nestabilne, kratkotrajne

reaktivne međuprodukte. Ovo svojstvo također je korisno pri vođenju reakcija koje daju produkte nestabilne pri reakcijskim uvjetima. Kada je reakcija jako brza, u šaržnom se procesu ne može odvijati na kontrolirani način. Na primjer, kada je $k_1 = 10 \text{ s}^{-1}$ i $k_2/k_1 = 0,01$, vrijeme reakcije treba biti duže od cca. 0,25 s i treba bi biti kraće od cca. 0,6 s da bi se dobio prinos veći od 90%. To znači da se reagens za gašenje treba dodati reakcijskoj smjesi upravo u ovoj vremenskoj domeni, inače se ne može dobiti željeni produkt u zadovoljavajućem prinosu. Ova vrsta kontrole vremena reakcije visoke rezolucije ne može se postići u šaržnim procesima, stoga je u tu svrhu neophodna uporaba protočnog mikro- ili milireaktorskog sustava opremljenog mikromiješalicama¹².

Protočni procesi koriste se za postizanje uvjeta koje nije lako ili nije moguće postići u šaržnim procesima, kao što su: vrlo brzo ili vrlo sporo miješanje reagensa, dodavanje reagensa u točno, precizno određeno vrijeme, vrlo ponovljivi uvjeti reakcije ili kristalizacije, izolacija reaktanata/produkata, korištenje vrlo malih volumena reaktanata (μl)¹⁸. Osim toga, stvaranje nuzprodukata se također može minimizirati ili čak potpuno spriječiti što je dodatna prednost u odnosu na šaržni proces⁷. Nadalje, optimizacija i izravno povećanje konvencionalnih šaržnih reakcija često susreće brojne složene probleme kao što su neučinkovito miješanje, neujednačeni prijenos topline i na kraju krajeva probleme sa sigurnošću provedbe reakcije. U protočnim reaktorima se veća kemijska proizvodnja može postići jednostavnim povećanjem volumena reaktora (povećanjem širine ili duljine cijevi) ili paralelnim slaganjem više reaktora pod unaprijed optimiziranim uvjetima⁷. Protočni reaktori nude i mogućnosti kontroliranog prijenosa topline, povećani omjer površine elektrode i volumena reaktora (što je primjerice bitno za elektrokemijske reakcije), povećanje interakcija otopina – kruta faza te veći tok fotona u fotokemijskim reakcijama. Ove prednosti posljedice su malih dimenzija reaktora¹⁹.

Protočni reaktori nisu čarobni, ali predstavljaju izvrsnu nadopunu tradicionalnim šaržnim reaktorima. Jedno je sigurno, izvrsni rezultati koji se mogu postići u protočnim procesima usidreni su u dobro utvrđenim principima kemijskog inženjerstva. Mnoge od očitih promjena u reaktivnosti uočene u prelasku iz šaržnih u protočne procese posljedica su jedne jednostavne činjenice, a to je da je u protočnim reaktorima povećan omjer površine i volumena. Protočni reaktori gotovo uvijek imaju veći omjer površine i volumena od odgovarajućih šaržnih reaktora, bilo da su na bazi cijevi ili ploče, a to omogućuje lakšu razmjenu energije i povećanu interakciju³. Zbog toga se reakcijske smjese mogu brže zagrijavati, hladiti, miješati i učinkovitije osvjetljivati ili elektrificirati. Iako naizgled jednostavna, ova činjenica je sama srž mnogih uočenih prednosti protočne kemije, uključujući poboljšanu selektivnost, sigurnije rukovanje opasnim reakcijama i veće brzine reakcije.

2.2. WITTIGOVA REAKCIJA

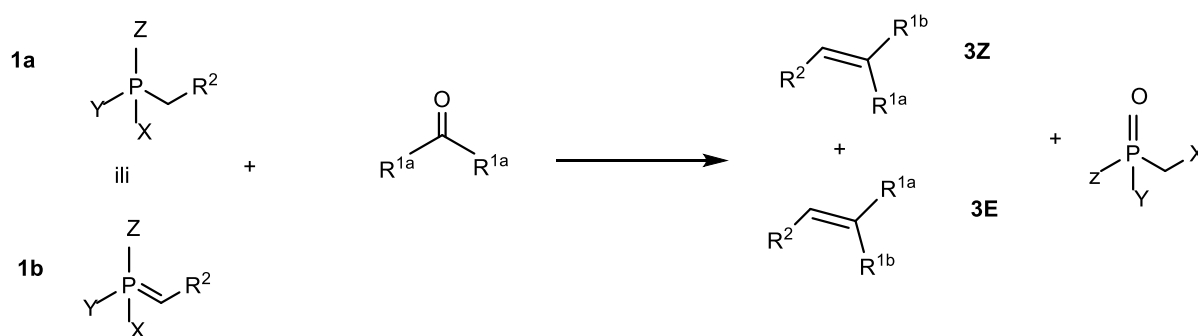
Wittigova reakcija možda je najčešće korištena reakcija pri sintezi alkena²⁰. Ovaj pristup jedan je od najsnažnijih i najsvestranijih pristupa u kemijskoj i farmaceutskoj industriji za sintezu alkena iz ketona ili aldehida s nedvosmislenim pozicioniranjem dvostruke veze ugljik-ugljik²¹. U „klasičnoj“ Wittigovoj reakciji reakcijom ilida i aldehida ili ketona nastaje odgovarajući alken i trifenilfosfin-oksid. Sami ilidi su karbanionidni spojevi u kojima negativni naboj na ugljiku stabilizira pozitivno nabijeni heteroatom, u ovom slučaju fosfor²².

Reakcija je dobila ime po znanstveniku Georgeu Wittigu, koji je za svoje otkriće novog načina stereoselektivne pripreme alkena nagrađen Nobelovom nagradom 1979. godine²³. Glavna prednost sinteze alkena Wittigovom reakcijom je ta što je mjesto dvostruke veze fiksno za razliku od smjesa koje često nastaju alkoholnim dehidratiranjem.

Postoji široki spektar fosfornih reagensa koji mogu sudjelovati u Wittigovoj reakciji, a po njihovoj prirodi Wittigovu reakciju dijelimo na tri glavne skupine:

1. „klasična“ Wittigova reakcija, u kojoj se koriste ilidi fosfora;
2. HWE reakcija, gdje se koriste fosfonatni anioni;
3. Horner-Wittigova reakcija, koja se provodi s anionima fosfin-oksida²⁴.

Reakcija se odvija između karbonilnog spoja (aldehida ili ketona, 2) i fosfonijevog ilida (1) kako bi se dobio alken (3) s fosfin-oksidom kao nusproizvodom (slika 5). Ilid može biti prikazan strukturama 1a (potpuno ionski ilidni oblik) ili 1b (ilenski oblik), koje ne treba uzeti u obzir kao rezonantne oblike nego ih treba shvatiti kao ilustriranje ionskog karaktera P-C veze s doprinosom stabilizacije karbaniona fosfonijem²⁰.



Slika 9. Wittigova reakcija. X, Y i Z mogu biti alkil-, aril- ili alkoksi-skupina i ne moraju nužno biti iste. R² može biti alkil-, aril-, vinil- ili elektron-odvlačeća skupina (npr. esterska).

Karbonilni reaktant (2) može biti formaldehid, aldehid ili keton²⁰.

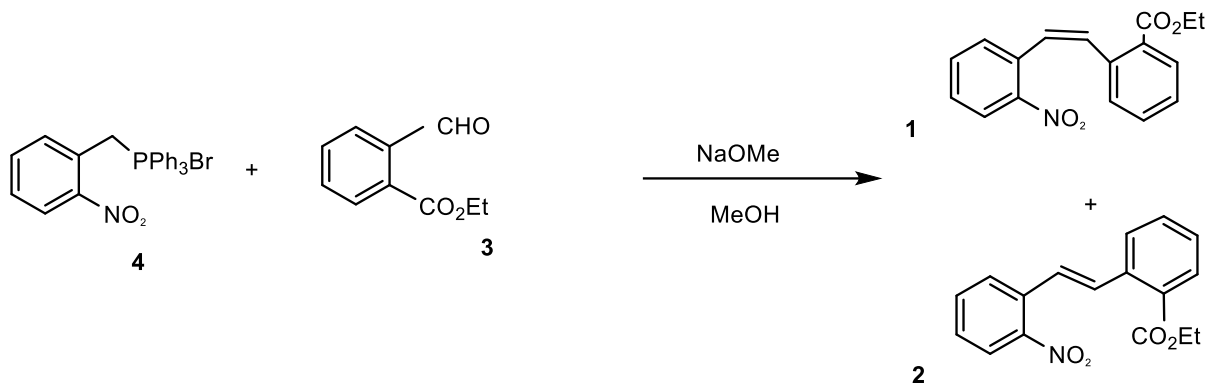
Wittigova reakcija vrlo je raširena radi njenih brojnih dobrih značajki kao što su:

- reakcija je regiospecifična – alken se uvijek formira od ilidnog α -ugljika do karbonilnog ugljika;
- reakcijski uvjeti su obično blagi;
- polazni materijali su često lako dostupni. Ilidi su lako dostupni *in situ* deprotoniranjem matične fosfonijeve soli, dobivene alkiliranjem fosfina. Određene soli, a čak i neki stabilizirani ilidi sada su i komercijalno dostupni;
- ilidi su tolerantni na niz drugih funkcijskih skupina pa je reakcija prikladna za sintezu složenih molekula;
- stereoselektivnost reakcije se često može usmjeriti na željeni alkenski izomer svrsishodnim odabirom prirode upotrijebljenih reaktanata²⁰.

Wittigova reakcija u početku se primjenjivala samo za sintezu dugolančanih nezasićenih masnih kiselina, a kasnije je otkrivena mogućnost izolacije *cis*-konfiguriranih karotenoida, pigmenta u kloroplastima. Trifenilfosfonijevi alkilidi učinkoviti su za sintezu piretrina, insekticida kao što je *cis*-piretin i *cis*-jasmon. Također, korisna je u polju kemije steroida, u sintezi geraniola (monoterpenoida i alkohola koji se nalazi u mnogim eteričnim uljima) i farnesola (alkohola, također prisutnog u eteričnim uljima)²⁵.

2.2.1. APLIKACIJE WITTIGOVE REAKCIJE U PROTOČNIM KONTINUIRANIM PROCESIMA

V. Skelton i suradnici objavili su rad o primjeni mikroreaktora pri provedbi Wittigove reakcije²⁶. Autori su koristili mikroreaktor za pripremu *cis*- i *trans*-nitrostilbenskih estera (1 i 2) putem Wittigove reakcije (slika 7.).



Slika 10. Shema Wittigove reakcije koju su u svom istraživanju proveli V. Skelton i sur.²⁷

Istraživane su značajke poput stereokemije i stehiometrije. Kada su u reakciji korištena dva ekvivalenta aldehida (3) prema fosfonijevoj soli (4) postignuta je konverzija od 70%, što je predstavljalo povećanje učinkovitosti reakcije od 10% u odnosu na tradicionalnu šaržnu sintezu. Stehiometrija reakcije je naknadno smanjena na 1:1, ali korištenjem kontinuiranog protoka reagensa prinos se smanjio na samo 39%. Međutim, naknadno je povećan na 59% provedbom tehnike injekcije kojom je fosfonijeva sol injektirana u kontinuirani tok aldehida. Istraživanje je dodatno prošireno kako bi se istražila stereokemija reakcije. Omjer izomera 1 i 2 bio je kontroliran promjenom napona primijenjenog na spremnike reaktanata unutar uređaja, što je utjecalo na elektroforetsku mobilnost reagensa. Varijacije u vanjskom naponu naknadno su promijenile reaktivne koncentracije reagensa unutar uređaja, stvarajući *Z/E* omjere (omjer *cis*- i *trans*-izomera) u području 1:9. Usporedbe radi, kada je provedena konvencionalna šaržna sinteza uz isto vrijeme reakcije, koncentraciju, otapalo i stehiometriju, uočen je omjer *Z/E* od približno 3:1. To je pokazalo superiornost mikroreaktora u pogledu kontrole u usporedbi sa šaržnim reakcijama. Autori su također pokazali da se mikroreaktor može koristiti kao alat za brzi razvoj i optimizaciju reakcije na temelju analogne kemije korištenjem različitih aldehida u reakciji²⁸.

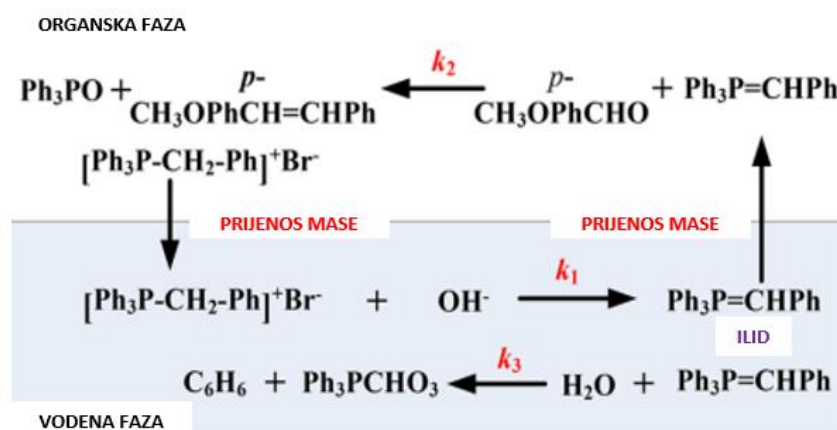
D. Cheng i F. Chen u svom radu proveli su Wittigovu reakciju kataliziranu faznim prijenosom (*phase-transfer catalysed, PTC*) u tekuće/tekuće *slug-flow* mikroreaktoru²⁹.

Slug-flow mikroreaktor naziv je za reaktor kojeg karakterizira alternativno prisustvo segmenata nemješljivih faza u mikrokanalima.



Slika 11. Alternativni tok segmenata nemješljivih faza u mikrokanalu (*slug-flow*)²⁹.

Wittigovu reakciju proveli su u heterogenom dvofaznom sustavu koji se sastojao od međusobno netopljivih tekućina od kojih je jedna vodena faza, a druga organska faza. Pristupačna i jeftina anorganska baza (NaOH) otopljena je u vodenoj fazi. U međuvremenu, organski reagens (koji je istovremeno agens za razdvajanje faza) i supstrat otopljeni su u organskom otapalu (DCM). Alkil-supstituirana fosfonijeva sol migrira iz organske faze u vodenu fazu gdje je deprotonirana anorganskom bazom kako bi se stvorio ilid, koji se zatim vraća natrag u organsku fazu i tako reagira sa supstratom/reaktantom, što dovodi do stvaranja konačnog produkta – alkena.



Slika 12. Dvofazna tekuće/tekuće Wittigova reakcija katalizirana faznim prijenosom²⁹.

Dva su koraka prijenosa mase i dvije kemijske reakcije (jedna se događa u vodenoj fazi, a druga u organskoj fazi) u Wittigovoj reakciji kataliziranoj faznim prijenosom (*PTC*). Dvosmjerni prijenos mase je u potpunosti povezan s dvjema reakcijama na temelju dvofaznog toka, stoga je ukupna brzina reakcije ograničena transportom reagirajućih/katalitičkih vrsta na mjesto reakcije. Zato je jedan od ključnih čimbenika za *PTC* Wittigove reakcije međufazni prijenos mase između dviju tekućina koje se ne miješaju, što je zapravo usko povezano sa površinskim područjem tekućina-tekućina, a time i raspodjelom veličine kapi dispergirane faze u dvofaznim reakcijskim sustavima²⁸.

U svom su radu istražili karakteristike dvofaznog protoka i prijenosa masa dvofaznog PTC Wittigovog reakcijskog sustava u tekuće-tekuće mikrokanalima, te pomno ispitali utjecaj veličine kanala (0,5, 0,8 i 1,0 mm), koncentracije reagirajućih vrsta i brzine strujanja smjese na specifičnom međufaznom području. Provedbom istraživanja, utvrđeno je da manja veličina kanala daje veću specifičnu površinu međufaza, a učinkovitost ekstrakcije i volumetrijski koeficijent prijenosa mase smanjuju se kako se veličina kanala povećavala. Kod fiksne duljine kanala, učinkovitost ekstrakcije se smanjivala s povećanjem brzine protoka smjese. Kada se vrijeme zadržavanja održavalo konstantnim, volumetrijski koeficijent prijenosa mase povećavao se kako se povećavala brzina protoka smjese. Dulje vrijeme zadržavanja dalo je veće vrijednosti konverzije¹⁹. Kod zadanog vremena zadržavanja, konverzija se povećavala smanjenjem unutarnjeg promjera cijevi, što ističe veliku važnost veličine cijevi za provedbu ove reakcije. Ukupna brzina kemijske reakcije mnogo je veća u usporedbi sa reakcijom provedenom šaržnom sintezom zbog većeg omjera površina-volumen i posljedično bržeg prijenosa mase.

2.3. REZVERATROL

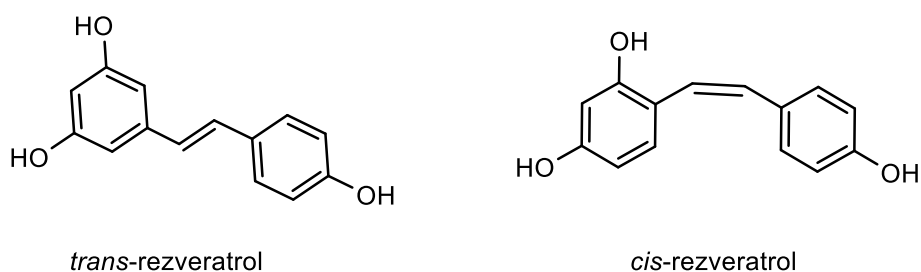
Rezveratol, ili *trans*-3,4',5-trihidroksistilben, je monomer stilbena s molekulskom formulom $C_{14}H_{12}O_3$ i molekulskom masom 228,25 g/mol. Pri sobnoj temperaturi je prah bijele boje s lagano žutom nijansom.

Rezveratrol je prvi otkrio i opisao japanski znanstvenik Dr. Michio Takaoka 1939. godine, iz otrovnog ljekovitog bilja *Veratrum grandiflorum* i kasnije iz korijenja biljke *Polygonum cuspidatum*³⁰. Rezveratrol je danas moguće izolirati iz više od 70 vrsta biljaka uključujući ljubičasto grožđe, borovnice, brusnice, te iz crnog vina, čokolade, kikirikija, itd. Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) je prirodni fitoaleksin koji proizvode neki spermatofiti (biljke koje se razmnožavaju sjemenom), poput vinove loze, a proizvode ga kao odgovor na oštećenje, ozljedu ili infekciju patogenim organizmima. *trans*-rezveratrol su prvi put opisali znanstvenici Langcake i Pryce, a dobili su ga iz lista vinove loze te su otkrili da je spoj sintetiziran u tkivima lista kao odgovor na gljivičnu infekciju ili izlaganje ultraljubičastom svjetlu³¹.

Interes za ove spojeve prisutne u grožđu pojavio se kada su epidemiološka i medicinska istraživanja pokazala povezanost između konzumacije crnog vina i pojave kardiovaskularnih bolesti. Unatoč ranom otkriću, rezveratrol je privlačio relativno malo pozornosti sve dok nije objavljena publikacija o "francuskom paradoksu", u kojem je sugerirano da ljudi u Francuskoj, koji konzumiraju relativno visoku razinu zasićenih masti imaju relativno nisku smrtnost od koronarnih srčanih bolesti, što je vjerojatno posljedica konzumiranja vina³². Rezultati istraživanja pokazali su da do utjecaja na pojavu kardiovaskularnih bolesti djelomično dolazi zbog prisutnosti etanola u vinu kao i u drugim alkoholnim pićima. Etanol djeluje putem hemostatskog mehanizma i povećanja cirkulirajućih lipoproteina visoke gustoće (*HDL*). Kolesterol se među stanicama prenosi specijalnim prenosiocima koji se nazivaju lipoproteini. Smanjena razina *HDL*-kolesterola povećava rizik za razvoj bolesti srca i krvnih žila. Ipak, pokazalo se i da drugi sastojci osim alkohola mogu imati sličan učinak. Rezveratrol se počeo razmatrati kada su znanstvenici E.H. Siemann i L. L. Creasy potvrdili njegovu prisutnost u vinu 1992. godine te pretpostavili da bi rezveratrol mogao biti biološki aktivan sastojak crnog vina. Od tada se opsežno počinju istraživati svojstva rezveratrola³².

2.3.1. SVOJSTVA REZVERATROLA

Rezveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) pripada skupini polifenola stilbenoida. Posjeduje dva fenolna prstena međusobno povezana etilenskim mostom. Nagađa se da je naziv rezveratrol izveden iz kombinacije njegove kemijske strukture i biljnog izvora iz kojeg se izolira: derivat rezorcinola ili polifenol u smoli, koji se pojavljuje u vrstama **Veratrum** koje sadrže hidroksilne (-OH) skupine (-ol)³³. Službeno kemijsko (IUPAC) ime rezveratrola je *E*-5-(4-hidroksistiril)benzen-1,3-diol. Rezveratrol je identificiran u *cis*- i *trans*-izomernim oblicima (slika 1). *trans*-izomer je dominantan u pogledu njegove rasprostranjenosti, a pripisuju mu se različite biološke aktivnosti uglavnom u induciranju staničnog odgovora (zaustavljanje staničnog ciklusa, diferencijacija, apoptoza, poboljšanje anti-proliferacije stanica raka)³⁴.



Slika 13. Kemijske strukture *trans*- i *cis*-rezveratrola (3,4',5-trihidroksistilbena).

Ekstrakcija rezveratrola iz prirodnih izvora je poprilično dugotrajna i usto daje male količine spoja. Stoga je istraživanje bioloških svojstava rezveratrola dobilo svoj zamah kada je *trans*-rezveratrol dobiven organskom sintezom. *trans*-rezveratrol ($M_r = 228$) danas je komercijalno dostupan, dok se *cis*-rezveratrol može dobiti UV zračenjem (*trans*-izomer može prijeći u *cis*-formu kada je izložen UV zračenju)¹². Utvrđeno je da je prašak *trans*-resveratrola stabilan i u stresnim uvjetima od 75% vlažnosti i 40 °C uz prisutnost zraka³⁴.

Rezveratrol je fitoaleksin koji djeluje protiv patogena, bakterija i gljivica. Brojna istraživanja pokazala su da resveratrol pokazuje vrlo visok antioksidativni potencijal. Također pokazuje antitumorsko djelovanje te se smatra potencijalnim kandidatom za prevenciju i liječenje nekoliko vrsta raka. Neka istraživanja pokazuju i da rezveratrol može inhibirati sve faze karcinogeneze (početak, razvoj i napredovanje). Pokazuje i druge bioaktivne učinke kao što su protuupalno, kardioprotektivno, fitoestrogeno i neuroprotektivno djelovanje. Ipak, primjena rezveratrola još uvijek predstavlja veliki izazov za farmaceutsku industriju zbog njegove slabije topljivosti i prilično male bioraspoloživosti, kao i zbog potencijalnih štetnih učinaka³⁴.

2.3.1.1. Antioksidacijska svojstva rezveratrola

Oksidativna oštećenja povezana su sa patogenezi mnogih važnih bolesti, kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti i rak. Također igraju važnu ulogu u procesu starenja. Zato je velika pozornost usmjerena ka pronalaženju prirodnih antioksidansa pomoću kojih bi se mogle liječiti ove bolesti, te su pritom dubinski proučeni potencijalni antioksidativni učinci rezveratrola. Njegova antioksidativna aktivnost je utvrđena u izoliranim mitohondrijima iz mozga štakora, gdje pokazuje inhibiciju stanja mitohondrijskog disanja kad se oni inkubiraju s rezveratrolom. Također, inhibira aktivnost kompleksa III koji stvara slobodne radikale³⁵. Antioksidativna aktivnost rezveratrola ovisi o rasporedu funkcionalnih skupina na strukturu jezgre. Konfiguracija, supstitucija i ukupni broj hidroksilnih skupina bitno utječu na nekoliko mehanizama antioksidativnog djelovanja kao što su uklanjanje radikala i sposobnost keliranja metalnih iona. Proučavanje antioksidativnog učinka protiv hidroksil ($\bullet\text{OH}$) i hidroperoksil ($\bullet\text{OOH}$) radikala u vodenim simuliranim medijima korištenjem različitih metoda otkriveno je da *trans*-rezveratrol može djelovati kao učinkovit $\bullet\text{OOH}$, a također i $\bullet\text{OOR}$ čistač radikala. Utvrđeno je također da se rezveratrol može koristiti za minimiziranje ili sprječavanje oksidacije lipida u farmaceutskim proizvodima, odgađanje stvaranja toksičnih oksidacijskih produkata te za održavanje nutritivne kvalitete i produljenje roka trajanja farmaceutskim proizvodima. Antioksidativna svojstva rezveratrola uspješno su korištena za zaštitu stanica od oksidativnog stresa izazvanog vodikovim peroksidom; prethodnom obradom rezveratrolom postignuto je preživljavanje stanica i zaštita od stanične smrti koja je mogla biti uzrokovana UV zračenjem³⁴.

Prema istraživanju K.T Howitz i suradnika³⁶, rezveratrol može produžiti život stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Autori su primijetili da smanjenje kalorija usporava brzinu starenja i može produljiti preživljavanje. U stanicama kvasca ovaj proces je povezan s povećanjem aktivnosti sirtuina, Sir 2 i Sir 1 – enzima koji djeluju kao regulatori brzine starenja. Pokazano je da rezveratrol djeluje na aktivnost sirtuina te može produljiti život stanicama kvasca za 70%. Ovi enzimi štite stanice od apoptotske smrti i uključeni su u obnovu DNK. Pokazano je i da rezveratrol povećava aktivnost ljudskog enzima SIRT1 *in vitro*, štiteći stanice od apoptoze³⁶. Rezveratrol također može zaštititi kožu od foto-starenja.

U *in-vivo* istraživanjima provedenim na miševima bez dlake³⁷, uočeno je da jednokratna primjena rezveratrola prije izlaganja UVB zrakama (sunčeve zrake koje uzrokuju većinu oštećenja površinskog sloja kože) značajno smanjuje edem kože i smanjuje proizvodnju H_2O_2 izazvanu UVB zrakama, a također može smanjiti peroksidaciju lipida i infiltraciju leukocita. Pokazalo se također da rezveratrol blokira aktivaciju proteina I κ B kinaze uključenih u

patogenezu obrambenih i upalnih procesa tijela. Slobodni radikali, reaktivne vrste kisika, citokini, UV svjetlo, patogene bakterije i virusi sudjeluju u aktivaciji tih proteina. Međutim, te proteine može inhibirati aktivnost polifenola, koji ne pokazuju samo sposobnost inhibiranja I κ B kinaze, nego također smanjuju ekspresiju proupalnih citokina. Ovakva aktivnost je dokazana in vitro za rezveratrol³⁸. C. Sticozzi i suradnici su također pokazali da rezveratrol in vitro u dozi od 10 μ M može zaštititi ljudske keratinocite od proteina receptora B1 čija je aktivnost uzrokovana dimom cigarete kao i smanjiti stvaranje reaktivnih vrsta kisika izazvanih dimom cigarete i stvaranje karbonila u ljudskim keratinocitima³⁹.

Međutim, terapijska primjena rezveratrola je otežana budući da ima slabu bioraspoloživost jer se brzo metabolizira i izlučuje. Rezveratrol se nakon oralnog uzimanja brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta (s poluživotom od samo 8-14 min.), ali je njegova bioraspoloživost niska jer se brzo metabolizira u jetri putem enzima faze II, i to uglavnom u sulfate, glukuronide i/ili sulfoglukuronid konjugate i eliminira se urinom³⁷. Utvrđeno je da prihvatljiv dnevni unos (*acceptable daily intake, ADI*) rezveratrola iznosi 450 mg/kg³⁹.

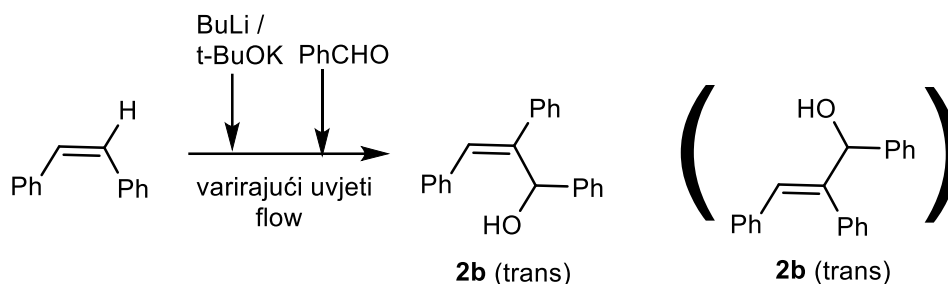
Stoga, modifikacija strukture rezveratrola uživa posebnu pozornost te su već sada sintetizirani brojni derivati rezveratrola kao što su metoksilirani, hidroksilirani i halogenirani derivati, a svi oni pokazuju povoljan terapijski potencijal.

2.3.2. SINTEZA DERIVATA REZVERATROLA U PROTOČNOM REAKTORU

Do sada su sintetizirane različite serije derivata rezveratrola na bazi *cis*- i *trans*-stilbena s ciljem otkrivanja novih spojeva s kliničkim potencijalima. Jednostavnost molekule rezveratrola povezana s njenom zanimljivom antikancerogenom aktivnošću obećava racionalan dizajn novi kemoterapeutskih agensa te se u tom kontekstu ulažu naporu u detaljno proučavanje odnosa strukture i aktivnosti ove vrste supstituiranih derivata stilbena.

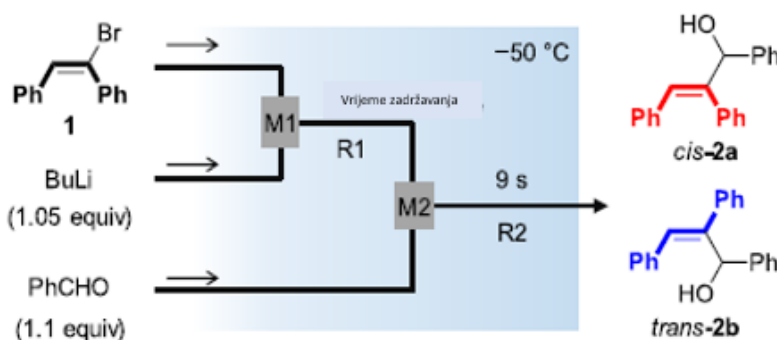
U zadnje vrijeme se istraživanje i sinteza supstituiranih derivata stilbena počinje provoditi i u kontinuiranim protočnim procesima radi već nabrojanih prednosti koje ovakva sinteza nudi.

H. Lee i suradnici⁴⁰ u svom su radu sintetizirali α -funkcionalizirane stilbene regioselektivnom sintezom sa preciznom kontrolom brze *cis*-*trans* izomerizacije u protočnom mikroreaktoru. Vrijeme reakcije precizno je kontrolirano unutar milisekundi do sekundi na -50 °C kako bi selektivno dobili *cis*- ili *trans*-izomer u visokoj konverziji. Ova metoda primijenjiva je i za sintezu prekursora komercijalnog spoja lijeka (*E*)- i (*Z*)-tamoxifen, s visokom regioselektivnošću i produktivnošću.



Slika 14. Shema vinil C-H metalacije *cis*-stilbena⁴⁰.

Široka primjena derivata stilbena u različitim istraživačkim područjima dovela je do razvoja sintetskih metoda za regioselektivnu funkcionalizaciju stilbena, međutim reakcije su ograničene zbog njihove brze izomerizacije. Geometrija *trans*-stilbena nešto je niža u energiji od *cis*-stilbena, s izomerizacijskom barijerom jer steričke interakcije tjeraju aromatske prstenove izvan ravnine i sprječavaju konjugaciju. Stoga je stvaranje *trans*-izomera prirodno poželjnije, a *cis*-izomer je osjetljiviji na izomerizaciju čak i u blagim uvjetima kao što su malo izlaganje svjetlosti ili toplini. α -Funkcionalizacija stilbena u šaržnoj reakciji je teška zbog njegove brze transformacije iz *cis* u *trans*-oblik, a stvaranje *trans* izomera ne može se u potpunosti spriječiti, čak ni pod ekstremno niskim temperaturnim uvjetima. Zbog mogućnosti precizne kontrole vremena reakcije H. Lee i suradnici u svom su se radu okrenuli sintezi derivata stilbena u protočnim reaktorima.



Slika 15. Shema provedenog protočnog procesa⁴⁰.

Reakcija je provedena u protočnom reaktoru koji se sastojao od dva mikromiksera (M1, M2) i dva cijevna reaktora (R1, R2), kao što je prikazano na slici 12. Otopine *cis*- α -bromostilbena i BuLi su spojene i miješane u M1 te se u R1 odvijala litiacija. U M2 je uveden benzaldehid te je otopina produkta iz R1 reagirala sa benzaldehidom u R2. Reakcija je provedena na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prinos spoja 2a povećan je promjenom vremena zadržavanja sa 14 ms na 3,1s zbog nepotpune izmjene Br-Li u vremenima zadržavanja koja su prekratka pod niskom temperaturom.

Međutim, prinos 2a se smanjio daljnjim povećanjem vremena zadržavanja (od 3,1 do 63s) zbog brze cis-trans izomerizacije. Kada je vrijeme zadržavanja iznosilo 0,63 s dobiven je spoj 2a u prinosu od 91%, ali detektiran je i spoj 2b (2%). Stoga je radi brže zamjene Br-Li promijenjen agens za litiaciju u n-BuLi. To je rezultiralo najvišim prinosom spoja 2a bez stvaranja izomera 2b pri vremenu zadržavanja 55 ms (93%). Pri vremenu zadržavanja 94 s, spoj 2b je dobiven kao jedini produkt sa prinosom od 84%. Prinos spoja 2a je smanjen povišenjem temperature (sa -78°C na 20°C) pri stalnom vremenu zadržavanja (3,1 s).

Na temelju mogućnosti precizne kontrole vremena reakcije (u milisekundama i manje) u protočnim reaktorima, H. Lee i suradnici izvjestili su o izvanrednoj kontroli izomerizacije α -litiiranog stilbena, a to je ujedno i prvo izvješće o α -funkcionalizaciji *cis*- i *trans*-stilbena s visokom regioselektivnošću⁴⁰.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

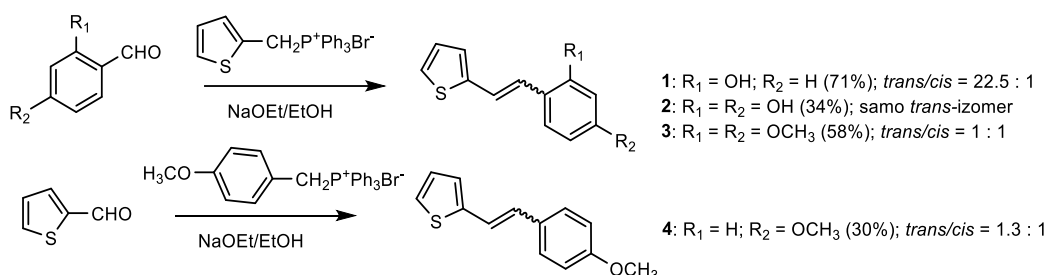
3.1.1. Kemikalije

Komercijalna otapala kupljena su od: etanol (EtOH, apsolutni i 96%, Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), acetonitril (CH₃CN, Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), diklormetan (CH₂Cl₂, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, dietileter (E, Avantor Performance Materials, Gliwice, Poljska), petrolej eter (PE, Carlo Erba, Emmendingen, Njemačka), deuterirani kloroform (CDCl₃, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania) i toluen (C₇H₈, VWR International Paris, Francuska) . Inicijalna fosfonijeva sol pripremljena je u laboratoriju iz odgovarajućeg bromida (Sigma Aldrich CO, St. Louis, USA), dok su ostali korišteni polazni karbaldehidi, meta-klorperbenzojeva kiselina (m-CPBA), 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), magnezijev sulfat (MgSO₄), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃) kupljene kemikalije (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Kemikalije su bile analitičke čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja.

3.2. EKSPERIMENTALNI POSTUPAK ZA WITTIGOVU REAKCIJU I EPOKSIDACIJU U ŠARŽNOM REAKTORU

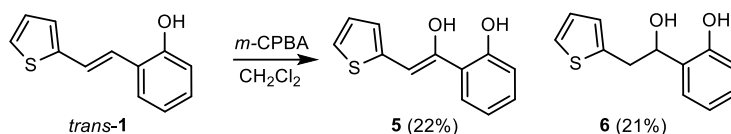
Početni spojevi **1-4** (Shema 1) sintetizirani su kao smjese *cis*- i *trans*-izomera Wittigovom reakcijom osim derivata **2** (samo *trans*-izomer). Reakcijska otopina je propuhivana dušikom 15 minuta prije dodavanja reagensa. U trogloj tikvici s okruglim dnom ($V = 100$ ml) otopljena je fosfonijeva sol (6 mmol) u 60 mL EtOH (osušena na 4 Å sita). Otopina natrijevog etoksida (6 mmol, 1,1 ekv. Na u 20 mL apsolutnog etanola) dokapana je u strogo bezvodnim uvjetima pod dušikom. U otopinu pri miješanju direktno se dodaju karboksaldehidi (6 mmol). Reakcijske smjese **1** i **2** ostavljene su da se miješaju 72 sata na 25 °C odnosno 90 °C, dok su reakcijske smjese derivata **3** i **4** miješane 24 sata na 25 °C, iznad magnetske miješalice pod balonom s dušikom. Nakon uklanjanja otapala, apsolutnog etanola rotacijskim isparivačem (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Njemačka) pod sniženim tlakom, krutina reakcijskih smjesa ekstrahirana je toluenom p.a. (3 x 25 mL). Organski slojevi su sušeni pod

bezvodnim MgSO₄. Svi produkti **1-4** izolirani su ponovljenom kolonskom i tankoslojnom kromatografijom na silika gelu korištenjem otapala u različitim omjerima (**1**: PE/E (0-1%); **2**: PE/E (0-40%); **3** i **4** (PE); (kao eluens i karakteriziran spektroskopskim metodama).



Shema 1. Sinteza analoga resveratrola **1-4** Wittigovom reakcijom. Prikazani su prinosi i *trans/cis* omjeri za šaržnu reakciju prema ¹H NMR analizama.

Spojevi **5** i **6** dobiveni su u istoj reakcijskoj smjesi eksperimentalnim postupkom za termičku oksigenaciju *trans*-**1** (Shema 2). Spoju *trans*-**1** (5 mmol) u CH₂Cl₂ (c = 0,12 mol/L) na -10 °C, dodano je 1,2 ekvivalenta *m*-CPBA u CH₂Cl₂ i smjesa je miješana 2,5 h na 25 °C. Nakon uklanjanja otapala, ostatku je dodana H₂O, koja je zatim neutralizirana zasićenom otopinom NaHCO₃ i produkt je ekstrahiran dietileterom. Produkti termalne oksigenacije izolirani su kolonskom kromatografijom, **5** u prvim frakcijama i **6** u zadnjim frakcijama, na silika gelu koristeći PE/CH₂Cl₂ (0-100%) kao eluens.



Shema 2. Funkcionalizacija analoga rezveratrola *trans*-**1** oksidacijom s *m*-CPBA. Prikazani su prinosi za šaržnu reakciju.

3.3. MILI- I MIKROREAKTORSKI EKSPERIMENTI

3.3.1. Eksperimenti s milireaktorom

Odgovarajuće količine fosfonijeve soli i karboksaldehida otopljene su u apsolutnom EtOH (otopina A) kao i u natrijevom etoksidu (otopina B). Točne količine prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Količine tvari koje se koriste za pripremu otopina za pokuse na milireaktorima - brojevi **1-4** odgovaraju shemi 1.

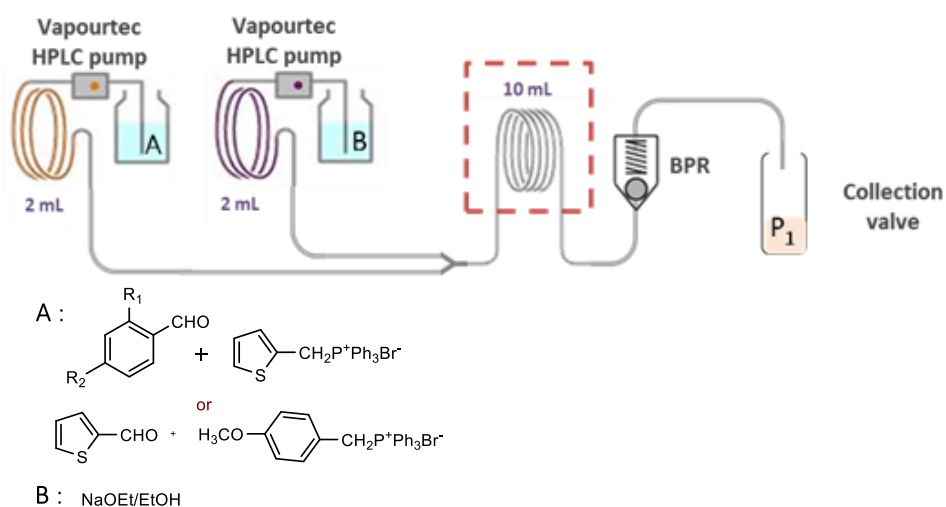
spoj	otopina A					otopina B			
	<i>m</i> (fosfonijeva sol), g	<i>V</i> (karboks- aldehid), mL	<i>n</i> , mmol	<i>c</i> , mol/L	<i>V</i> (EtOH), mL	<i>V</i> (NaOEt), mL	<i>n</i> , mmol	<i>c</i> , mol/L	<i>V</i> (EtOH), mL
1	0.400	0.1	0.940	0.094	10	0.352	0.980	0.098	10
2	0.318	0.1	0.724	0.072	10	0.271	0.724	0.072	10
3	0.264	0.1	0.602	0.060	10	0.225	0.602	0.063	10
4	0.487	0.1	1.070	0.107	10	0.400	1.070	0.107	10

Otopine su propuhane i držane pod dušikom u tikvici s okruglim dnom. Otopine su pumpane s dvije HPLC pumpe (Vapourtec, UK) u PFA reaktor (1/16", I.D. = 1,016 mm) s Y-mikserom i unutarnjim volumenom od 10 mL (Slika 1). Za sintezu svakog analoga rezveratrola (**1-4**, shema 1) provedeno je 7 pokusa s različitim reakcijskim uvjetima. Uvjeti reakcije su mijenjani kako je prikazano u Tablici 3 kako bi se pronašli najbolji uvjeti provođenja procesa.

Tablica 3. Reakcijski uvjeti za svaki pokus sinteze analoga rezveratrola u milireaktoru.

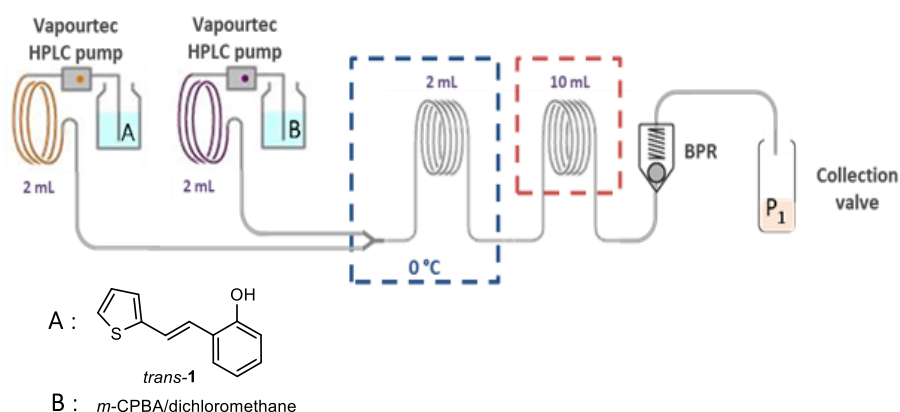
EXP.	UVJETI				PROTOCI	
	V, mL	I.D., mm	τ , min	T, °C	Otopina A, mL/min	Otopina B, mL/min
1.	10	1.016	60	25	0.083	0.083
2.	10	1.016	30	25	0.167	0.167
3.	10	1.016	15	25	0.333	0.333
4.	10	1.016	15	120	0.333	0.333
5.	10	1.016	30	120	0.167	0.167
6.	10	1.016	30	120	0.138	0.195
7.	10	1.016	30	25	0.138	0.195

Reaktor je uronjen u termostatiranu kupelj na IKA RCT basic IKAMAG Safety Control magnetnoj miješalici (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Austrija) kod eksperimenata koji su bili provedeni pri povišenim temperaturama (120 °C). Dodatno, za regulaciju tlaka korišten je podesivi regulator tlaka (BPR) i to kontinuiranim podešavanjem njegovog položaja tako da je ulazni tlak ostao na željenoj zadanoj vrijednosti (4 bara). Reakcijska smjesa je sakupljena u bočice na izlazu iz reaktora i karakterizirana UHPLC s DAD detektorom pri valnoj duljini 227 nm.



Slika 16. Milireaktorski sustav za Wittigovu reakciju pri sintezi derivata 1-4.

U drugom mili reaktorskom sustavu (Slika 17) spoj *trans*-1 (0,49 mmol) otopljen je u 10 mL CH₂Cl₂ ($c = 0,0494$ mol/L) (otopina A). Nadalje, 1 molarni ekvivalent *m*-CPBA otopljen je u 10 mL CH₂Cl₂ (otopina B). Otopine su pumpane s dvije HPLC pumpe (Vapourtec, UK) u ohlađenu (0-5 °C) petlju od 2 mL napravljenu od PFA cijevi (1/16", I.D. = 1,016 mm) s ulazom u obliku Y-miksera, a zatim dalje upumpane u PFA reaktor (1/16", I.D. = 1,016 mm) s unutarnjim volumenom od 10 mL. Ispitano je vrijeme zadržavanja od 2,5 h i 30 minuta i analogno su se mijenjale brzine protoka dok je omjer volumnog protoka održavan konstantnim na 1:1 za otopine A i B. Dva eksperimenta su izvedena na 25 °C, a jedan na 60° C u termostatiranoj uljnoj kupelji. Za regulaciju tlaka (4 bara) korišten je regulator tlaka (BPR). Reakcijska smjesa na izlazu iz reaktora sakupljena je u vialu i karakterizirana UHPLC-om s DAD detektorom na valnoj duljini 227 nm.



Slika 17. Milireaktorski sustav za funkcionalizaciju analoga *trans*-1 s *m*-CPBA.

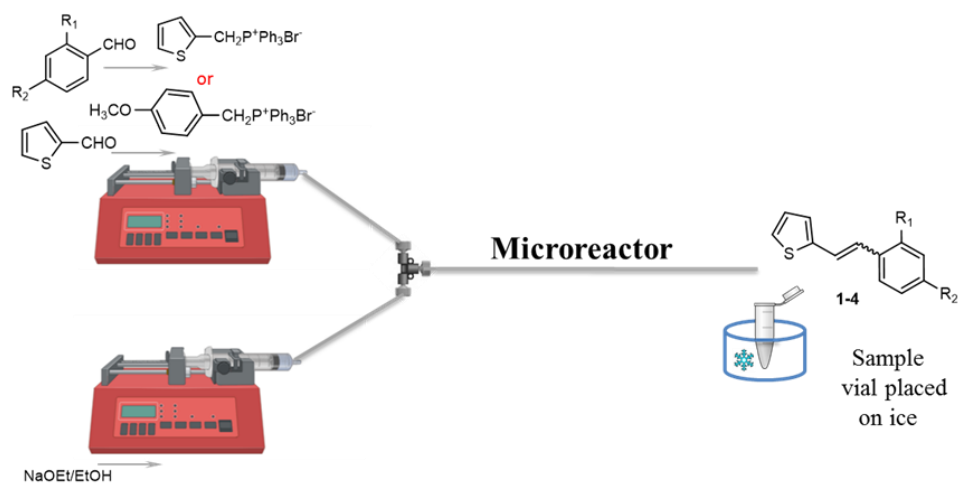
3.3.2. Eksperimenti s mikroreaktorom

Kako bi se utvrdilo jesu li mikroreaktori prikladni za sintezu novih heterocikličkih analoga rezveratrola, pokusi su izvedeni u različitim mikroreaktorima (Tablica 4, Slika 18). Svi eksperimenti su provedeni u politetrafluoroetilenskom (PTFE) mikroreaktoru opremljenom s dva ulaza u obliku slova “T” na 25°C. Za dovod otopine korištene su dvije pumpe sa štrcaljkama (PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD) opremljene visokotlačnim štrcaljkama od nehrđajućeg čelika (8 mL, Harvard Apparatus, SAD). Jedna pumpa sa štrcaljkom korištena je za dovod otopine A i jedna za dovod otopine B koje su pripremljene prema tablici 2. Ukupne brzine protoka ispitane u ovom istraživanju bile su u rasponu od $q = 11,78\text{--}235,5$ $\mu\text{L}/\text{min}$ s volumnim omjerom protoka otopina A i B 1:1.

Tablica 4. Dimenzije mikroreaktorskih sustava korištenih u eksperimentima sinteze analoga resveratrola.

Dimenzije	sistem 1	sistem 2	sistem 3
promjer (D , mm)	0.25	0.5	1
radijus (r , mm)	0.125	0.25	0.5
duljina (L , mm)	1200	300	75
volumen (V , μL)	58.875	58.875	58.875

Reakcijska smjesa na izlazu reaktora je sakupljena u viale postavljene na ledu i karakterizirana UHPLC-om sa DAD detektorom pri 227 nm.



Slika 18. Mikroreaktorski sustav za Wittigovu reakciju pri sintezi derivata **1-4**.

3.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST NOVIH HIBRIDA REZVERATROLA

Antioksidacijska aktivnost ispitivanih spojeva je mjerena u smislu doniranja vodika ili sposobnosti hvatanja radikala, korištenjem stabilnog radikala, 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazila (DPPH)²². 50 μ L različitih koncentracija ispitivanih otopina stavljeno je u kivetu i dodano 1 mL etanolne otopine DPPH, a konačna koncentracija DPPH održavana je konstantnom ($c = 8 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Smjesa je inkubirana 30 minuta na 25 °C. Apsorbancija je izmjerena na 517 nm (UV-1800 UV/Vis spektrofotometar, Shimadzu, Japan). Sva određivanja provedena su u tri primjerka. Koncentracije ispitivanih spojeva izražene su kao konačne koncentracije. Inhibicija DPPH izražena u postocima izračunata je prema jednadžbi (1):

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{A_{C(0)} - A_{C(t)}}{A_{C(0)}} \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je $A_{C(0)}$ apsorbancija kontrole pri $t = 0$ min, a $A_{A(t)}$ apsorbancija antioksidansa pri $t = 30$ min. Inhibicije su prikazane kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Podaci su korišteni za izračunavanje IC_{50} vrijednosti koristeći nelinearni fit vrijednosti koncentracije spoja vs postotak inhibicije.

3.5. SPEKTROSKOPSKE METODE ZA PRAĆENJE REAKCIJA

¹H NMR spektri produkata iz šaržnih reakcija su snimljeni na Bruker Avance spektrometru (Coventry, United Kingdom) pri 600 MHz i 300 MHz s CDCl₃ kao otapalom i tetrametilsilanom kao referentnim standardom. Kolonske kromatografije produkata su provedene na silica-gelu (Fluka 60 Å, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland). Silika-gel 60 F₂₅₄ (Kieselgel 60, 0.2 mm, 20 × 20 cm, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) pločice su korištene za tankoslojnu kromatografiju (TLC). Organski slojevi su sušeni iznad bezvodnog magnezijevog sulfata (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Produkti i iz šaržnih i iz protočnih reakcija su analizirani UHPLC-om (1290 Infinity II, Agilent Technologies, USA) na Waters Acquity BEH C18 koloni (150 x 3 mm, 1.7 μ m). Mobilna faza sastojala se od otopine A (0.77 g amonij acetata u 2 L H₂O, pH = 5.0) i otopine B (Acetonitril) sa gradijentnim eluiranjem: od 20 do 50% B prvih 7 min, 50% B je održavano 4 min i onda 50 do 80% B 1 min, od 80 do 90% B 2 min, 90% B održavano 1 min, zatim je 90% zamijenjeno za 20% slijedeće 3 min. Protok je iznosio 0.4 mL/min, temperatura kolone je iznosila 40 °C a UV

detekcija je provođena pri 227 nm. Dodatno su strukture produkata potvrđene UPLC-om s MS detektorom opremljenim ESI izvorom (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). UV spektri su snimani UV/Vis spektrometrom (Varian Cary 50 UV/Vis, Lexington, Massachusetts, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

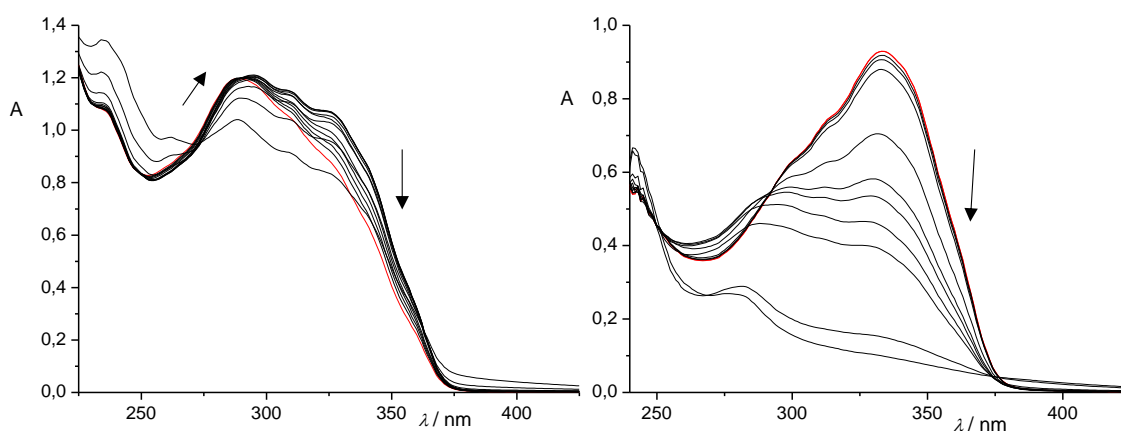
4.1. SINTEZA HETEROCIKLIČKIH ANALOGA REZVERATROLA U ŠARŽNOM REAKTORU

Derivati rezveratrola **1-4** pripremljeni su Wittigovom reakcijom iz fosfonijevih bromida i odgovarajućih aldehida kao smjese geometrijskih izomera, *trans*- i *cis*- (osim kod spoja **2**, gdje je dobiven samo *trans*-izomer). Smjese geometrijskih izomera **1-4** su razdvojene kolonskom kromatografijom kako bi se dobili čisti spojevi. Prema ¹H NMR spektroskopiji, supstituent na aromatskom prstenu usmjerava omjer geometrijskih izomera u Wittigovoj reakciji (Shema 1). Svi eksperimenti provedeni u šarži u početku su se izvodili pri 25 °C, ali je primijećeno da je prinos dihidroksi derivata **2** iznosio samo 5 % pri 25 °C nakon 72 sata reakcije, stoga je ova reakcija ponovljena pri višoj temperaturi, odnosno pri 90 °C. Povišenjem temperature, prinos se povećao na 34%. Iako je prinos nešto manji u usporedbi sa ostalim provedenim reakcijama za analoge **1**, **3** i **4**, primijećeno je da se u ovoj reakciji formira samo *trans*-izomer što zapravo ovu reakciju čini vrlo povoljnom. Provođenjem reakcije za analog **1** s hidroksi-supstituentom prevladavao je *trans*-izomer (omjer *trans/cis* = 22.5:1) pri temperaturi 25°C. Prema rezultatima dobivenim za analog **1**, reakcija je ponovljena pri 90 °C kako bi se dobila još čišća smjesa, no nažalost podizanjem temperature reakcije omjer *trans/cis* se pomiče u korist *cis* izomera (1:3.2) čineći tako ove reakcijske uvjete nepovoljnima. Kod metoksi derivata **3** i **4**, udjeli su sličniji (shema 1); za derivat **3** omjer *trans/cis* je iznosio 1:1 a za derivat **4** 1.3:1.

Uspoređujući postignute konverzije u provedenim reakcijama, najviša konverzija od 71% ($t = 72$ h) je dobivena pri pripravi derivata **1**, dok je najniža konverzija (30%, $t = 72$ h) postignuta pri pripravi derivata **4** kao posljedica prirode ilida kao intermedijera. Svi izolirani izomeri spojeva **1-4** su spektroskopski karakterizirani. U ¹H NMR spektru izoliranih geometrijskih izomera **1-4** (slika 21) vide se pikovi koji odgovaraju etilenskim protonima između 6.4 i 7.0 ppm (*cis* izomeri) i između 7,0 i 7,3 ppm (*trans* izomeri) s karakterističnim konstantama sprege, signalima za protone na tiofenskom dijelu u aromatskom području i singletima hidroksi- i metoksi-protona.

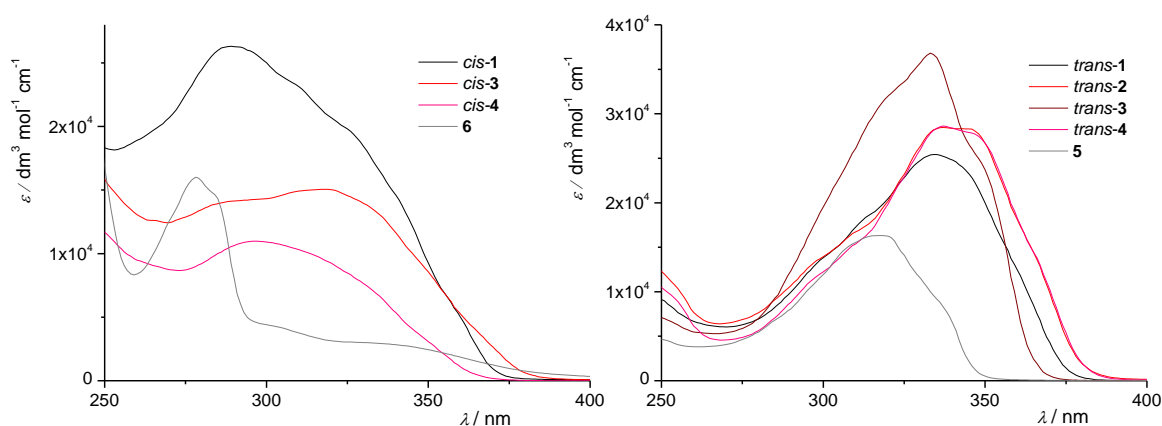
Kako bismo istražili fotokemijsku stabilnost analoga resveratrola **1-4**, proveli smo osvjetljavanje u polarnom otapalu CH₃CN, a tijekom reakcije je praćen UV-Vis spektroskopijom (slike 19 i 20, prilog). Nakon zračenja *cis*-**1** uočeni su hiperkromni i batokromni pomaci (slika 19), u skladu s formiranjem *trans*-izomera. Ekscitacija *trans*-**1** i *trans*-**2** (Slike 19 i 20) dovela

je do hipokromnih i hipsokromnih (samo u slučaju *trans-1*) promjena zbog stvaranja odgovarajućeg *cis*-izomera.



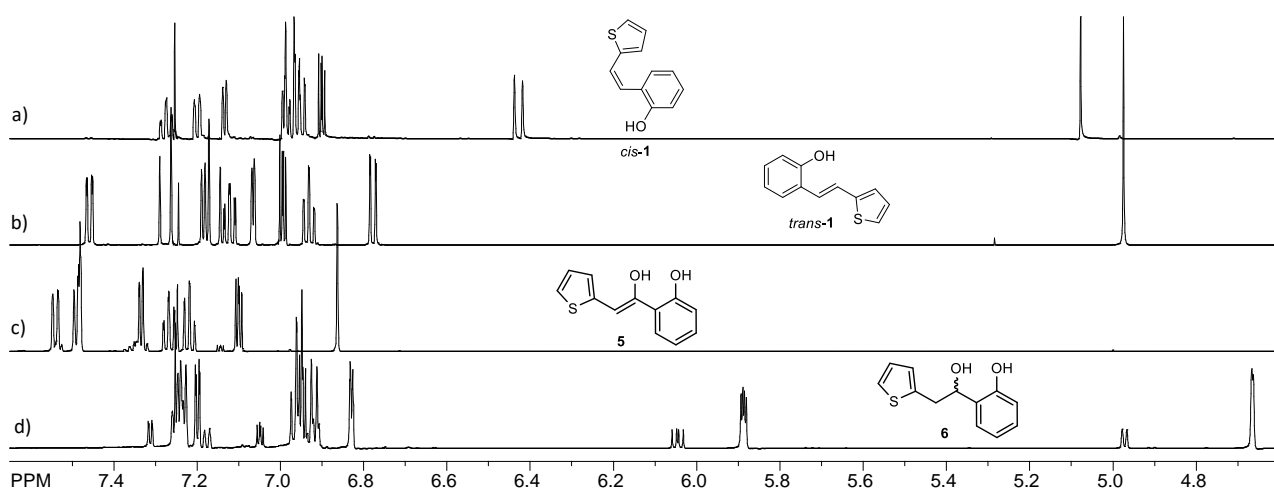
Slika 19. Spektralne promjene nastale tijekom osvjetljavanja *cis-1* analoga rezveratrola (lijevo) u CH₃CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$) i *trans-1* (desno) u CH₃CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$).

Metoksi-derivati **3** i **4** pokazuju slične trendove kao i derivat **1** (vidi prilog). Dulje osvjetljavanje derivata **1-4** na 313 nm rezultiralo je gubitkom izozbestičkih točaka uslijed sekundarnih procesa, vjerojatno nastajanja fotoproducta elektro ciklizacije. UV-Vis spektri *cis*- i *trans*-izomera **1-4** u CH₃CN tipični su za diariletan^{41,42} s jakom apsorpcijom s maksimumom na oko 340 nm, za *trans*-izomere, i manje intenzivnom i hipsokromno pomaknute trake za *cis*-izomere.

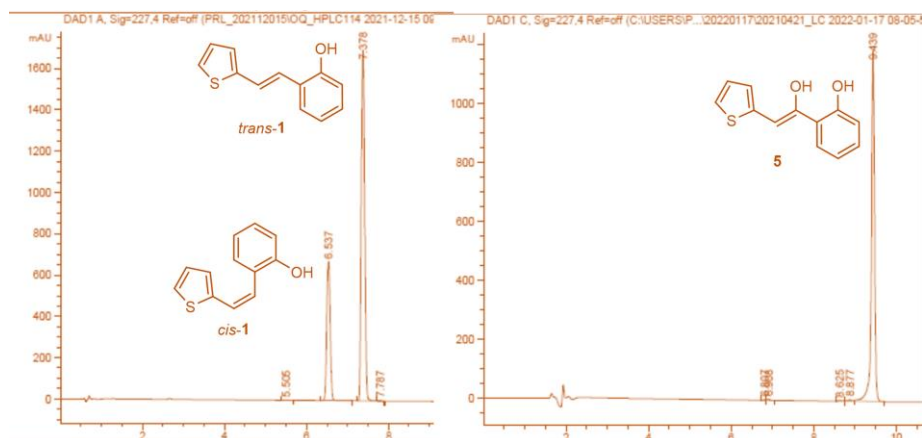


Slika 20. UV/Vis spektar *cis-1-3* i **6** (lijevo) i od *trans-1-4* i **5** (desno) u CH₃CN.

Za dobivanje funkcionaliziranih hidroksi-derivata rezveratrola **5** i **6** (Shema 2, Tablica 2), provedena je reakcija s *trans*-**1** i *m*-CPBA u 2 mL diklormetana. U toplinskoj reakciji *trans*-**1** korištenjem *m*-CPBA (Shema 2) smatra se da hidroksi-derivati **5** i **6** nastaju pregradnjom epoksidnog međuprodukta koji nastaje prvenstveno iz *trans*-**1**⁴³. Stoga objašnjavamo stvaranje derivata **5** iz reakcije cijepanja intermedijarnog epoksida i daljnju oksigenaciju do **6**.



Slika 21. ¹H NMR spektar (CDCl₃) *cis*-**1** (a), *trans*-**1** (b), **5** (c) i **6** (d).

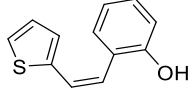
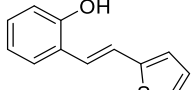
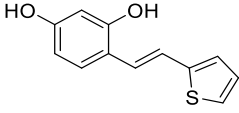
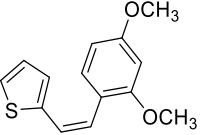
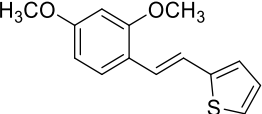
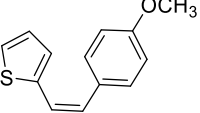
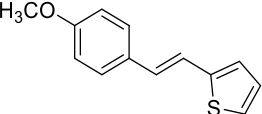
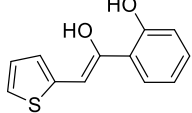
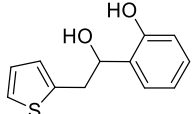


Slika 22. Retencije produkata *trans*- i *cis*-**1** i spoja **5** dobivene HPLC analizom.

Ova dva nova spoja **5** i **6** izolirana su i potvrđena spektroskopskim metodama (Slike 21 i 22 i prilog). Položaj druge (uvedene) hidroksi-skupine određen je 2D NMR spektroskopijom. Zanimljivo je da je derivat rezveratrola **5** najstabilniji pri izlaganju UV zračenju u usporedbi s

1-4 (vidi prilog). Također, nije iznenađujuće da UV spektri **5** i **6** pokazuju maksimume valne duljine i koeficijente apsorpcije mnogo niže od bolje konjugiranih struktura **1-4** (Slika 20).

Tablica 5. Nomenklatura i strukture sintetiziranih spojeva **1-6**.

Spoj	Skraćenica	Struktura
(<i>Z</i>)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol	<i>cis-1</i>	
(<i>E</i>)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol	<i>trans-1</i>	
(<i>E</i>)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzen-1,3-diol	<i>trans-2</i>	
(<i>Z</i>)-2-(2,4-dimetoksistiril)tiofen	<i>cis-3</i>	
(<i>E</i>)-2-(2,4-dimetoksistiril)tiofen	<i>trans-3</i>	
(<i>Z</i>)-2-(4-metoksistiril)tiofen	<i>cis-4</i>	
(<i>E</i>)-2-(4-metoksistiril)tiofen	<i>trans-4</i>	
(<i>Z</i>)-2-(1-hidroksi-2-(tiofen-2-il)vinil)fenol	5	
2-(1-hidroksi-2-(tiofen-2-il)etil)fenol	6	

4.2. SINTEZA HETEROCIKLIČKIH ANALOGA REZVERA-TROLA U MILI- I MIKRO REAKTORIMA

Kao što je već spomenuto u uvodu, prijenos procesa iz šaržnog u protočni reaktor, a posebice u mili- i mikro-protočne sustave otvara nove mogućnosti sinteze. Prednosti kao što su kratko vrijeme reakcije, viša produktivnost, bolja kontrola procesa i mogućnost izbjegavanja formiranja neželjenih nusprodukata^{14,44} čine mili- i mikroreaktore tako zanimljivima. Stoga je sljedeći korak ovoga rada bio istražiti mili- i mikro- protočne sustave kako bi vidjeli mogu li protočni sustavi poboljšati produktivnost ($\mu\text{mol}/\text{min}$) Wittigove reakcije i reakciju funkcionalizacije dobivenog produkta Wittigove reakcije *trans*-1. Sveukupno su dva mili- (slike 16 i 17) i tri mikro- (slika 18 i tablica 4) reaktora proučavana te su dobiveni rezultati, bazirani na prinosu, konverziji, produktivnosti i *trans/cis* omjeru, uspoređivani sa rezultatima dobivenim u šaržnim reakcijama. Također su i različiti procesni uvjeti (temperatura, protoci, vrijeme zadržavanja i ekvivalenti) mijenjani kako bi se istražio njihov utjecaj na djelotvornost procesa.

Rezultati prikupljeni iz reakcija provedenih u milireaktoru su prikazani u Tablici 6. Može se vidjeti da je reakcija značajno brža u milireaktoru. Pri vremenu zadržavanja od samo 0.5 h dobiveni su viši prinosi i produktivnost u usporedbi sa šaržnim reaktorom. Dobiveni rezultati jasno ukazuju na prednosti boljeg prijenosa mase u umanjenim protočnim reaktorima u usporedbi sa šaržnim reaktorima.

Tablica 6. Rezultati mili- i mikroreaktora u usporedbi sa šaržnom sintezom.

C ^a	Vrijeme, h			Prinos, % ^b			Konverzija, %			<i>trans</i> -/ <i>cis</i> omjer ^d			Produktivnost, $\mu\text{mol/mL min}$		
	Šarža	Mili	Mikro	Šarža	Mili	Mikro	Šarža	Mili	Mikro	Šarža	Mili	Mikro	Šarža	Mili	Mikro
1	72	0.5	0.5	71	70	65	93	77	71	22.5:1	6.4:1	11.7:1	0.017	0.530	1.695
2^e	72	-	-	34	-	-	52	-	-	samo <i>trans</i> -	-	-	0.002	-	-
3	24	0.5	0.5	58	65	50	91	87	66	1:1	1:1.4	1:0.7	0.032	0.922	1.017
4	24	0.5	0.5	30	75	75	100	100	100	1.3:1	1.7:1	1.6:1	0.103	2.090	1.864
5	2.5	0.5	-	22	35	-	45	53 ^c	-	1:1 ^f	3:1 ^f	-	0.368	0.437	-
6	2.5	0.5	-	21	10	-	40	17 ^c	-			-	-	0.327	0.140

Reakcijski uvjeti: za produkte Wittigove reakcije **1-4** prikazani podaci su pri sobnoj temperaturi; ^abroj spoja; ^bizolirani prinos kod šaržne reakcije smjese *cis*- i *trans*-izomera, ^ctemperatura reakcije 60 °C, ^d*trans/cis* omjer dobiven NMR i UHPLC analizama; ^erezultati konverzije i produktivnosti u protočnim sustavima ne mogu biti očitani radi preklapanja signala produkta **2** i trifenilfosfin-oksida na UHPLC-u. Za spoj **2** bi trebalo razviti novu metodu za potencijalna buduća istraživanja. ^fomjer spojeva **5/6** u reakciji s *m*-CPBA;

Također je utvrđeno da se promjenom temperature može kontrolirati omjer *trans*- i *cis*-izomera, slično kao pri sintezi analoga **1** u šaržnom reaktoru. Kada je reakcija dobivanja produkta Wittiga **1** provedena u milireaktoru pri 25°C, omjer *trans/cis* izomera je bio 6.4:1, pri vremenu zadržavanja 0.5 h. Omjer *trans* i *cis* izomera se povisio povišenjem temperature. Povišenjem temperature omjer se povisio u korist *cis*-izomera te pri 90°C iznosi 1:6.2, a pri 120°C iznosi 1:5.3.

Omjes *trans/cis* analoga kod produkta **4** također može biti kontroliran temperaturom, ali za razliku od produkta **1**, udio *trans*-izomera raste u ovoj reakciji povišenjem temperature. Pri vremenu zadržavanja 15 min i temperaturi 25°C *trans/cis* omjer je iznosio 1.7:1, dok se pri istom vremenu zadržavanja ali povišenoj temperaturi od 120°C omjer *trans/cis* povisio na 3.6:1 u korist *trans*-izomera.

Suprotno od derivata **1** i **4**, u reakciji sa derivatom **3** *cis*-oblik je predominantan i pri nižoj i pri višoj temperaturi, te je utvrđeno da povišenjem temperature sa 25°C na 120°C, *trans/cis* omjer ostaje isti, 1:1.5 ($\tau = 0.5$ min).

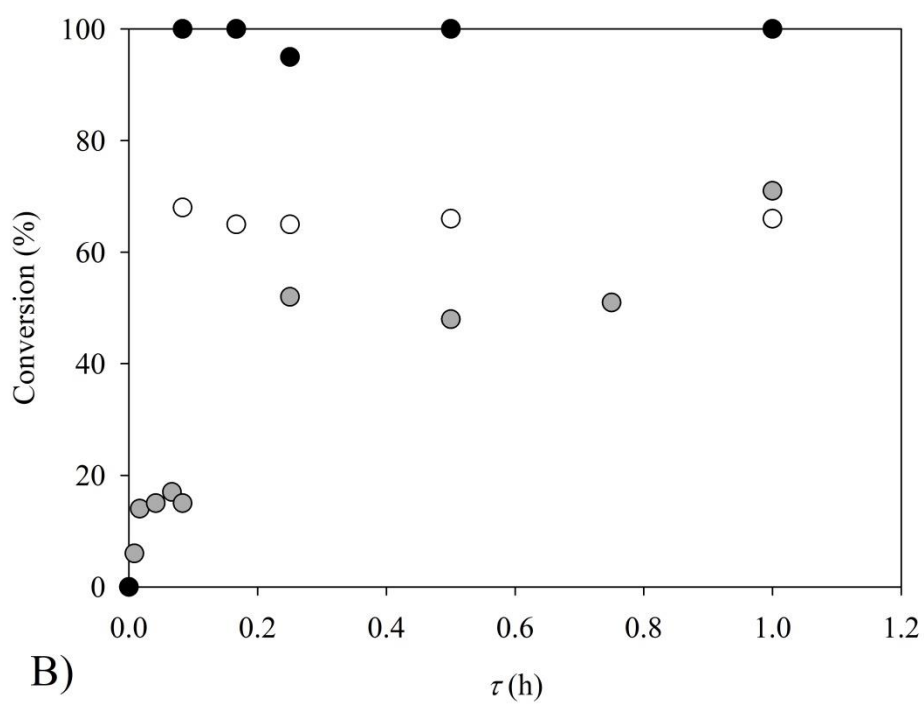
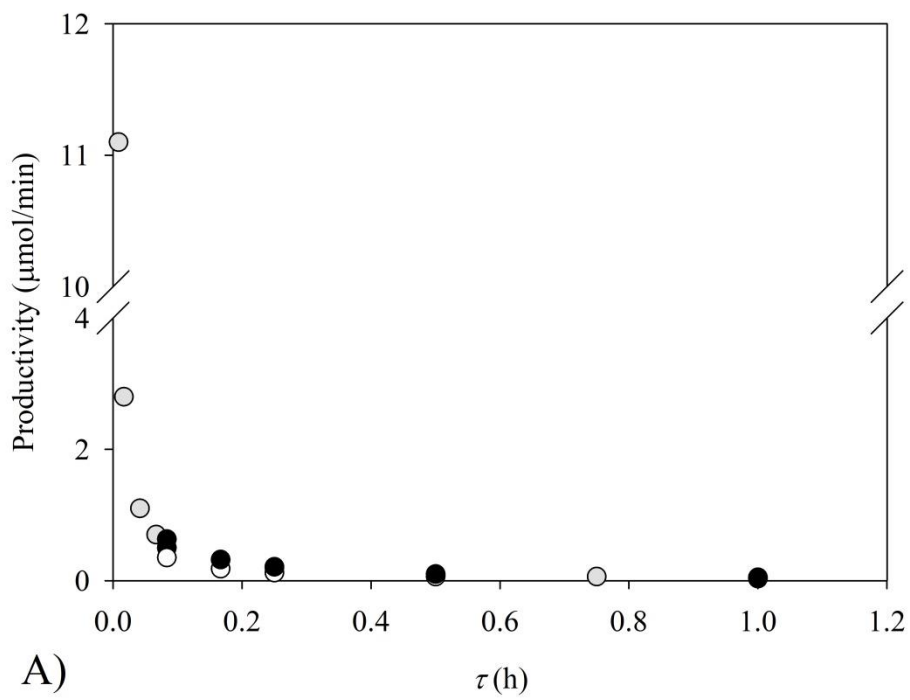
Također je u svim slučajevima promatran utjecaj vremena zadržavanja pri konstantnoj temperaturi na *trans/cis* omjer. Utvrđeno je da je omjer *trans/cis* ostao isti neovisno o promjeni vremena zadržavanja. Rezultati ukazuju na to da niže temperature, primjerice 25°C, favoriziraju formiranje *trans*-izomera, dok pri višim temperaturama nastaje više *cis*-izomera za derivate **1**. Poznato je da je *trans*-oblik stabilniji te da se upravo taj oblik povezuje sa biološkim svojstvima i zdravstvenim dobrobitima, stoga visoke temperature nisu detaljnije istraživane za ovaj derivat u ovom radu. Suprotno tome, kod derivata **4** je pri višoj temperaturi nastalo više *trans*-**4** derivata u usporedbi sa *cis*-**4**. Međutim, uzimajući u obzir količinu energije potrebnu za grijanje reaktora na 120 °C i dobiveni omjer, ipak su bolji izbor reakcije pri nižim temperaturama ($T = 25^\circ\text{C}$). Kod derivata **3**, preferirana temperatura bi bila 25 °C budući da temperatura ne utječe na *trans/cis* omjer.

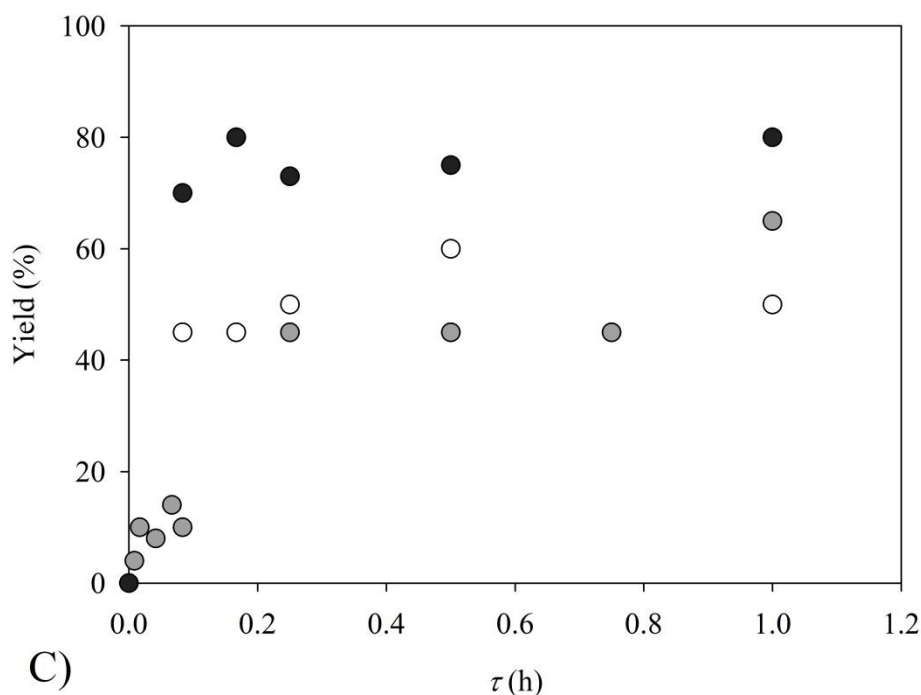
Kao što je ranije spomenuto, još jedna prednost mili- i mikrosustava je lakša kontrola procesa, što znači da je moguće lako mijenjanje protoka u milicijevima radi proučavanja učinkovitosti procesa. Testirani su različiti omjeri protoka otopina A i B (podaci nisu prikazani). Dobiveni rezultati ukazuju da su najviši *trans/cis* omjer, prinos, konverzija i produktivnost dobiveni pri omjeru protoka 1:1. Još jedna prednost ovog omjera je činjenica da je pod ovim uvjetima formiran usporedan i stabilan protok, sa međufaznim područjem točno u sredini reaktora. To

omogućuje odvajanje faza na kraju milicijevi, što bi moglo biti prvi korak u razvoju integriranog sustava za kontinuiranu sintezu, funkcionalizaciju i odvajanje.

Funkcionalizacija analoga rezveratrola *trans*-1 je provedena oksidacijom sa *m*-CPBA u milireaktoru (tablica 5), te je primijećena bolja učinkovitost procesa u milireaktoru u usporedbi sa šražnim reaktorom. Provedena su dva eksperimenta pri dvije različite temperature, 25°C i 60°C. Budući da je spoj **5** više povoljniji kao pravi analog rezveratrola, glavni cilj bio je pokušati pomaknuti reakciju u proizvodnji tog spoja. Kao što se može vidjeti (slika 1 i tablica 5), kada je reakcija provedena u šražnom reaktoru, dobiven je isti prinos za **5** i **6** (22% za **5** i **6**). Prebacivanjem reakcije u milireaktor i povećanjem temperature na 60°C dobivena je 3 puta veća količina spoja **5**.

Nakon što su reakcije provedene u milireaktoru, veličina kanala je dodatno smanjena na mikroveličinu. Ispitana su tri mikroreaktora s tri različita promjera kanala (0,25, 0,5 i 1 mm) te su dobiveni rezultati uspoređeni s onima dobivenima u šražnom i milireaktoru. Kada je reakcija provedena pri istom vremenu zadržavanja kao u milireaktoru ($\tau = 0,5$ min), dobiveni su slični rezultati u sve tri veličine kanala. Dobiveni rezultati pokazali su da je razina miješanja fluida i prijenosa mase bila ista u mili- i mikroreaktorskom sustavu, što znači da su sve prednosti mikroreaktora prisutne u mili-sustavu. To znači da daljnje smanjenje veličine (ispod milireaktora) nema dodatni pozitivan učinak na izvedbu reakcije. Budući da su rezultati bili isti, sljedeći korak, ispitivanje utjecaja vremena zadržavanja na proizvodnju komponenti **1**, **3** i **4** provedeno je samo na mikrokanalu s unutarnjim promjerom 1 mm. Reakcija za spoj **2** također je izvedena u mikroreaktoru, no zbog niske topljivosti dobivenog produkta unatoč vremenu zadržavanja uočeno je začepljenje mikrokanala. Iz tog razloga tu reakciju nije bilo moguće izvesti na skali manjeg promjera. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 23 i tablici 6. Kao što je vidljivo, povećanjem vremena zadržavanja raste prinos i konverzija, a maksimalne vrijednosti (iste kao one dobivene u šražnom reaktoru) postižu se znatno brže nego u šražnom reaktoru.





Slika 23. Usporedba A) produktivnosti, B) konverzije i C) prinosa za različito vrijeme zadržavanja u mikroreaktorskom sustavu 3 za ● spoj 1, ○ spoj 3 i ● spoj 4

Također je utvrđeno da dimenzije mikrokanala ne utječu na omjer, tj. smanjenje promjera mikrokanala ne utječe na *trans-cis* omjer. Dodatno je istražen utjecaj vremena zadržavanja u mikrokanalu promjera 1 mm na omjer *trans-* i *cis-*izomera (rezultati nisu prikazani) te je utvrđeno da vrijeme zadržavanja nema utjecaja na njihov međusobni omjer, tj. bez obzira na vrijeme zadržavanja, količina *trans-1* bila je oko 14 puta veća u odnosu na *cis-1* spoj.

Najznačajnija razlika između mili- i mikroreaktora u odnosu na šaržni reaktor uočena je pri usporedbi produktivnosti. Kao što se može vidjeti u tablici 6, produktivnosti dobivene u milireaktoru i mikroreaktoru su gotovo iste, ali znatno veće u usporedbi sa šaržnim reaktorom, što ih čini boljim izborom za predložene reakcije.

4.3. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE NOVIH ANALOGA REZVERATROLA

Potencijal antioksidativnog djelovanja tiofenskih derivata rezveratrola **1-4** određen je DPPH metodom u suradnji sa Sveučilištem u Mostaru. DPPH test odabran je zbog njegove jednostavnosti, valjanosti i topljivosti u organskim otapalima što ga čini pogodnim za hidrofilne i lipofilne antioksidanse. Ova se metoda temelji na redukciji stabilnog DPPH• radikala u prisutnosti antioksidansa koji daje vodik zbog stvaranja neradikalnog oblika DPPH-H u reakciji, što se može lako pratiti spektrofotometrijski. Stoga se mjeri aktivnost uklanjanja radikala ispitivanog spoja. Dobro je poznato da su fenolne skupine sposobne djelovati kao čistači radikala budući da se radikal nastao nakon darivanja vodika DPPH može stabilizirati rezonancijom. Među ispitivanim spojevima, oni s hidroksi-skupinom pokazali su učinkovitu aktivnost uklanjanja radikala (Tablica 6, Slika 9). Polumaksimalna koncentracija uklanjanja radikala DPPH (IC₅₀) izračunata je za *cis-1*, *trans-1* i *trans-2*. Derivat *trans-1*, s OH grupom na orto-poziciji i *trans*-geometrijom stilbenskog dijela, pokazao se snažnim antioksidansom s IC₅₀ vrijednošću 158,8 μmol/L. Za usporedbu, utvrđeno je da je IC₅₀ vrijednost za rezveratrol 77,9 μmol/L⁴⁵ i 74,0 μmol/L⁴⁶.

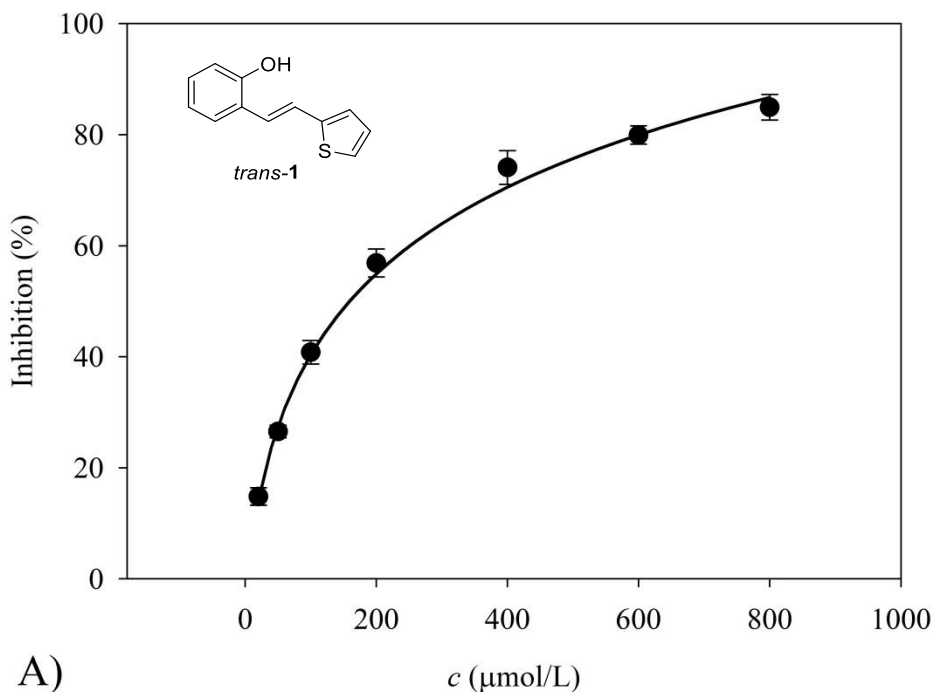
Tablica 7. Aktivnost uklanjanja radikala DPPH spojeva **1-4**.

Spoj	DPPH	
	IC ₅₀ (μmol/L)	% Inhibicije*
<i>cis-1</i>	158.8	87.2±0.4 (800)
<i>trans-1</i>	782.1	75.2±1.5 (2600)
<i>trans-2</i>	26.8	94.4±1.5 (80)
<i>cis-3</i>	-	18.0±0.2 (50000)
<i>trans-3</i>	-	7.1±0.1 (50000)
<i>cis-4</i>	-	19.8±2.4 (50000)
<i>trans-4</i>	-	9.6±0.4 (50000)

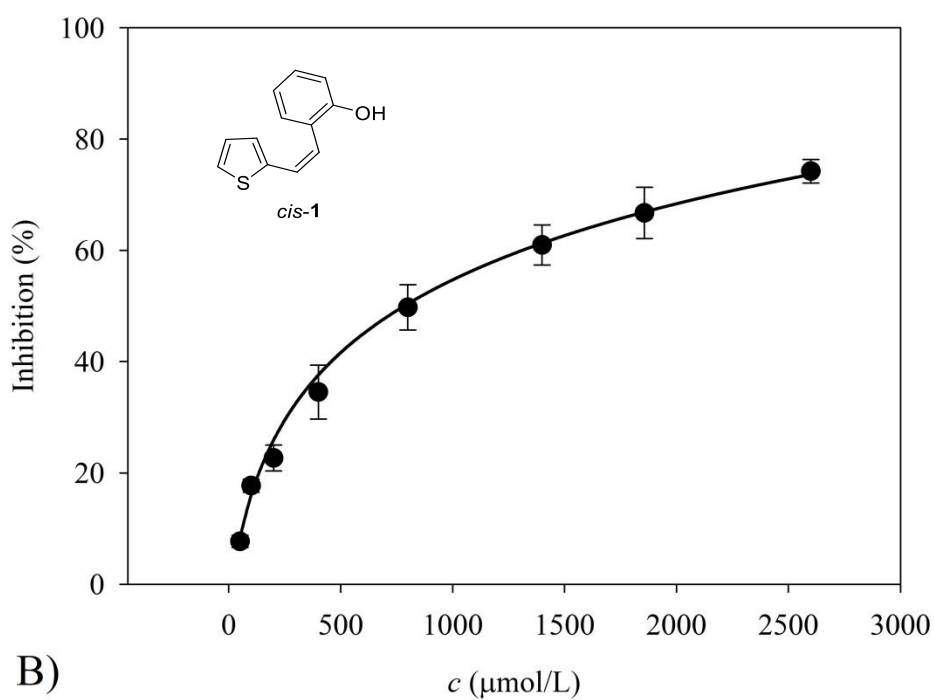
* Brojevi navedeni u zagradama predstavljaju maksimalne koncentracije testirane u μmol/L.

Promjena konfiguracije na *cis-1* rezultirala je smanjenjem antioksidativne aktivnosti, ali je i dalje vrijednost IC₅₀ postignuta u mikromolarnom rasponu (IC₅₀ 782,1 μmol/L). Isti

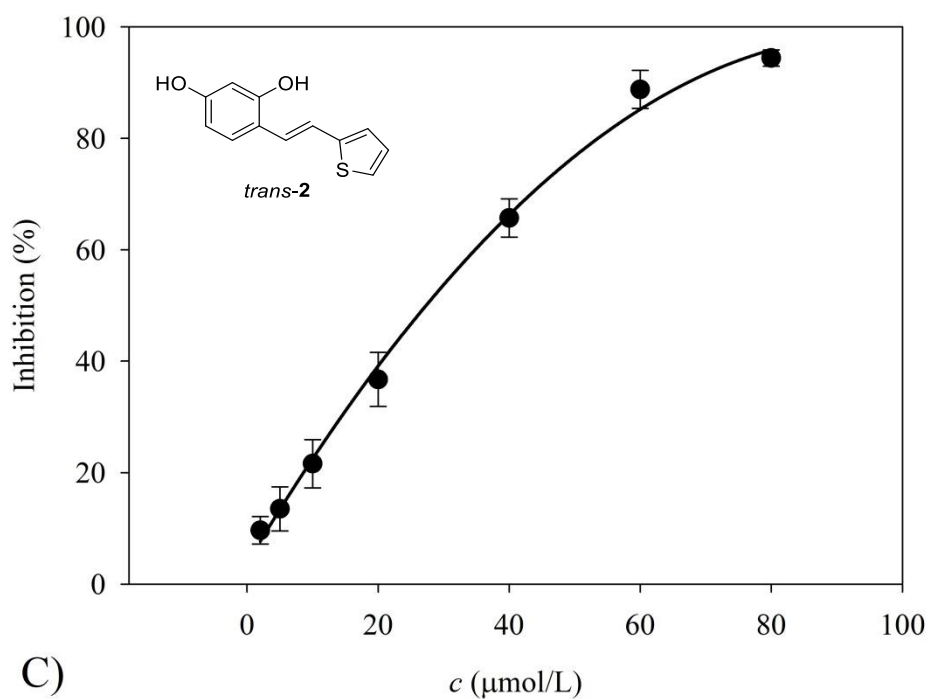
konfiguracijski učinak također je uočen za *cis*- i *trans*-resveratrol⁴⁷⁻⁴⁹ što ukazuje da se odnos strukture i aktivnosti mora uzeti u obzir pri određivanju biološke aktivnosti. Uvođenje dodatne OH skupine na poziciju 4 na fenilnoj skupini povećalo je antioksidativno djelovanje. Derivat *trans*-2 pokazao je najbolju aktivnost uklanjanja s izvrsnom vrijednošću IC₅₀ od 26,8 μmol/L, tri puta bolje od rezveratrola. U derivatu *trans*-2, obje OH skupine mogu biti uključene u stabilizaciju rezonancije što rezultira boljom aktivnošću uklanjanja radikala. Derivati s metoksi skupinama (*cis*-3, *trans*-3, *cis*-4 i *trans*-4) nisu u stanju tako učinkovito ukloniti radikal jer su pokazali vrlo slabu inhibiciju čak i pri visokim koncentracijama (milimolarni raspon).



A)



B)



C)

Slika 24. Aktivnost uklanjanja slobodnih radikala DPPH različitih koncentracija spojeva A) *cis-1* (20-800 $\mu\text{mol/L}$), B) *trans-1* (50-2600 $\mu\text{mol/L}$) i C) *trans-2* (2-80 $\mu\text{mol/L}$).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu kontinuirano se provodila sinteza novih heterocikličkih analoga rezveratrola Wittigovom reakcijom i reakcijama funkcionalizacije dobivenog Wittigovog produkta **1** u mili- i mikroreaktorima. Pri prelasku iz šaržnog reaktora na mikro-skalu, uočeni su bolji rezultati (brža reakcija, povećana produktivnost i čistoća). S druge strane, uspoređujući rezultate između mili- i mikroreaktora; postignute konverzije, produktivnosti, prinosi i omjeri produkata praktički su isti, što znači da su sve prednosti mikroreaktora prisutne i u mili-sustavu. Uzimajući u obzir i druge prednosti milireaktora, kao što je činjenica da ih je jednostavnije i jeftinije proizvesti od mikroreaktora, te da su manje osjetljivi na začepljenje i nude mogućnost veće proizvodnje produkta, bili bi najbolje proizvodno rješenje za željene produkte.

Analizom dobivenih novih heterocikličkih analoga rezveratrola utvrđeno je da oni s hidroksi-skupinom/skupinama pokazuju učinkovitu aktivnost uklanjanja radikala. Derivat *trans*-**2** pokazao je najbolju aktivnost uklanjanja s izvrsnom vrijednošću IC₅₀ od 26,8 μmol/L, tri puta boljom od rezveratrola te relativno visoku stabilnost prema fotoizomerizaciji u odgovarajući *cis*-izomer.

6. LITERATURA

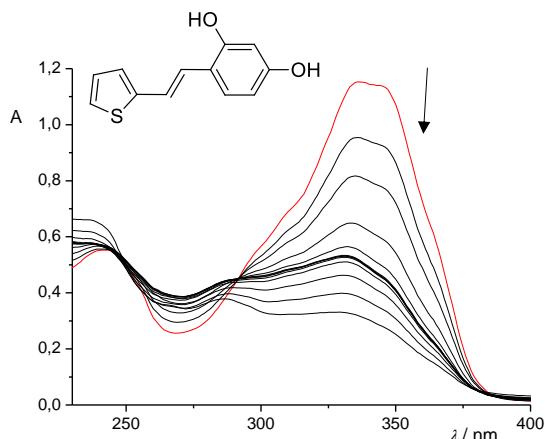
1. T. Belwal, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, A. R. Dehpour, S. Shirooie, Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease, Chapter 3.1.1, Academic Press, UK, 2020
2. J. Li, Z. Qiu, G.-R. Zhao, Modular engineering of *E. coli* coculture for efficient production of resveratrol from glucose and arabinose mixture, *Synth. Syst. Biotechnol.* 7 (2022) 718–729
3. J. Lopez-Hernandez, P. Paseiro-Losada, A. T. Sanches-Silva, M. A. Lage-Yusty, Study of the changes of trans-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of trans- and cis-resveratrol in Spanish white wines, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 789–796
4. G. Montsko, M. S. P. Nikfardjam, Z. Szabo, K. Boddi, T. Lorand, R. Ohmacht, L. Mark, Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS, *J. Photochem. Photobiol. A.* 196 (2008) 44–50
5. C. G. Silva, J. Monteiro, R. R. N. Marques, A. M. T. Silva, C. Martínez, M. Canle, J. L. Faria, Photochemical and photocatalytic degradation of trans-resveratrol, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2013) 638
6. W. L. Klaus, L. Shiming, Resveratrol, pterostilbene and dementia. *Biofactors* 44 (2018) 83–90. <https://doi.org/10.1002/biof.1396>[10] K. A. Roupe, C. M. Remsberg, J. A. Yáñez, N. M. Davies, Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* 1 (2006) 81–101
7. H. S. Lin, B. D. Yue, P. C. Ho, Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 1308–1315
8. D. McCormack, D. McFadden, A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 575482
9. N. Ratola, J. L. Faria, A. Alves, Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal), *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2004) 125–130
10. M. Mlakić, A. Šalić, M. Bačić, B. Zelić, I. Šagud, O. Horváth, I. Škorić, Photocatalytic oxygenation of heterostilbenes-batch versus microflow reactor, *Catalysts* 11 (2021) 395
11. Jens Wegner, Sascha Ceylan, and Andreas Kirschning; Flow Chemistry – A Key Enabling Technology for (Multistep) Organic Synthesis, *Adv. Synth. Catal.* 354 (2012) 17–57
12. Jun-ichi Yoshida, Yusuke Takahashi, and Aiichiro Nagaki; Flash chemistry: Flow chemistry that cannot be done in batch, *Chem. Commun.* (2013)
13. John R. Naber, C. Oliver Kappe, and Jaan A. Pesti, Flow Chemistry Enabling Efficient Synthesis, *Org. Process Res. Dev.* 24 (2020) 1779–1780
14. Matthew B. Plutschack, Bartholomäus Pieber, Kerry Gilmore, and Peter H. Seeberger; The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry, *Chem. Rev.*, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00183

15. Klavs F. Jensen; Flow Chemistry—Microreaction Technology Comes of Age, *AIChE Journal* DOI 10.1002/aic.15642
16. Timothy Noël, John R. Naber, Ryan L. Hartman, Jonathan P. McMullen, Klavs F. Jensen and Stephen L. Buchwald; Palladium-catalyzed amination reactions in flow: overcoming the challenges of clogging *via* acoustic irradiation, *Chem. Sci.*, 2 (2011) 287-290
17. Bandaru T. Ramanjaneyulu, Niraj K. Vishwakarma, Shinde Vidyacharan, Praveen Reddy Adiyala, and Dong-Pyo Kim; Towards Versatile Continuous-Flow Chemistry and Process Technology Via New Conceptual Microreactor systems, *Bull. Korean Chem. Soc.* (2018) 1229-5949
18. K. Robertson; Using flow technologies to direct the synthesis and assembly of materials in solution, *Chemistry Central Journal*, 11 (2017) 4
19. D. Tyler McQuade, and Peter H. Seeberger; Applying Flow Chemistry: Methods, Materials, and Multistep Synthesis, *J Org Chem.* 78 (2013) 6384-9
20. Peter A. Byrne, a and Declan G. Gilheany; The Modern Interpretation of the Wittig Reaction Mechanism, *Chem. Soc. Rev.*, 42 (2013) 6670-6696
21. Dang Cheng and Fen-Er Chen; Experimental and Numerical Studies of the Phase-TransferCatalyzed Wittig Reaction in Liquid–Liquid Slug-Flow Microchannels, *Ind. Eng. Chem. Res.* 59, 10 (2020) 4397–4410
22. Wade, L. G., *Organska kemija*. 2017, Zagreb: Školska knjiga
23. H. Pommer; The Wittig Reaction in Industrial Practice, *Angrw. Chem.* 1111. Ed. Engl. 16 (1977) 423-429
24. M. Edmonds, A. Abell, *ChemInform*, (2004) 1-17
25. M. Schlosser, u E. Eliel, N. Allinger; *Topics in Stereochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 5 (1970) 1–5, 7–9, 13–21
26. V. Skelton, et al.; The preparation of a series of nitrostilbene ester compounds using micro reactor technology, *The Analyst*, (2001) 126
27. Paul Watts and Stephen J. Haswell; Continuous flow reactors for drug discovery, 8(13) (2003), 586-9
28. V. Skelton. et al.; The generation of concentration gradients using electroosmotic flow in micro reactors allowing stereoselective chemical synthesis, *Analyst*, 126 (2001) 11–13
29. D. Cheng and F. Chen; Experimental and Numerical Studies of the Phase-TransferCatalyzed Wittig Reaction in Liquid–Liquid Slug-Flow Microchannels, *Ind. Eng. Chem. Res.* 59 (2020) 4397–4410
30. A. K. Dhingra, V. Rathi, B. Chopra; *Resveratrol*, book
31. Lucie Fremont; Biological effects of resveratrol, *Life Sciences*, 66(8) (2000) 663-673
32. E.B. Rimm, A. Klatsky, D. Grobbee, M.J. Stampfer, *Br.Med.J.*, 312 (1996) 731-736

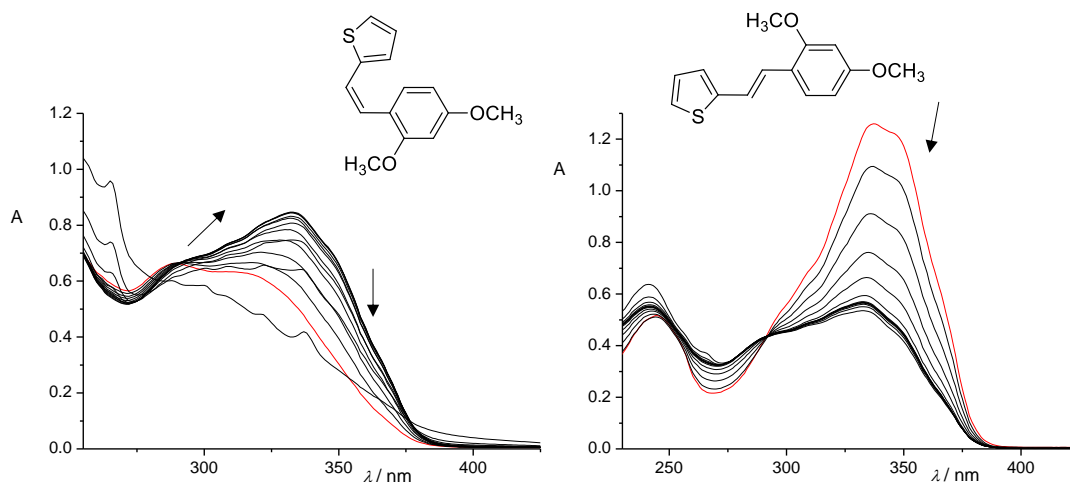
33. E.J. Park, J. M. Pezzut; The Pharmacology of Resveratrol in Animals and Humans, *Biochim Biophys Acta.* 6 (2015) 1071-113.
34. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits, *Biomedicines.* 6(3) (2001) 91
35. J. Gambini, M. Inglés, G. Olaso, R. Lopez-Grueso, V. Bonet Costa, L. Gimeno-Mallench, C. Mas-Bargues, K. M. Abdelaziz, M. C. Gomez-Cabrera, J. Vina, and C. Borrás: Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans, *Oxid.Med. Cell Longev.*, (2015) 837
36. K.T. Howitz, et al.; Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425 (2003) 191–96
37. A. Ratz-Lyko, J Arct; Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: a review, *J Cosmet Laser Ther.* 21(2) (2019) 84-9
38. Z. Hou, J.D. Lambert, K.V. Chin, C.S. Yang; Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention, *Mutat Res.*, 555 (2004) 3–19
39. C. Sticozzi, F. Cervellati, X. M. Muresan, C. Cervellati, G. Valacchi; Resveratrol prevents cigarette smoke-induced keatinocytes damage. *Food Funct.* 5 (2014) 2348–56
40. H. Lee et al.; Regioselective Synthesis of α -Functional Stilbenes via Precise Control of Rapid cis–trans Isomerization in Flow, *Org. Lett.* 23(8) (2021) 2904–2910
41. W. M. Horspool, P. S. Song; *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, Boca Raton, (1995)
42. A. Griesbeck, M. Oelgemöller, F. Ghetti; *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, Boca Raton, (2012)
43. S. B. Gingerich, P. W. Jennings; Oxidation of 2-methyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzofuran with m-chloroperbenzoic acid, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 2606
44. J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, Ten key issues in modern flow chemistry, *Chem. Commun.* 47 (2011) 4583–4592
45. I. Gülçin, Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11 (2010) 210–218
46. B. Fauconneau, P. Waffo-Teguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit, J.-M. Merillon, Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests, *Life Sciences* 61 (1997) 2103–2110
47. F. Orallo, Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 87–98
48. A. Francioso, P. Mastromarino, A. Masci, M. d’Erme, L. Mosca, Chemistry, stability and bioavailability of resveratrol, *Med. Chem.* 10 (2014) 237–245
49. S. S. Kulkarni, C. Canto, The molecular targets of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta* 1852 (2015) 1114–1123

7. PRILOZI

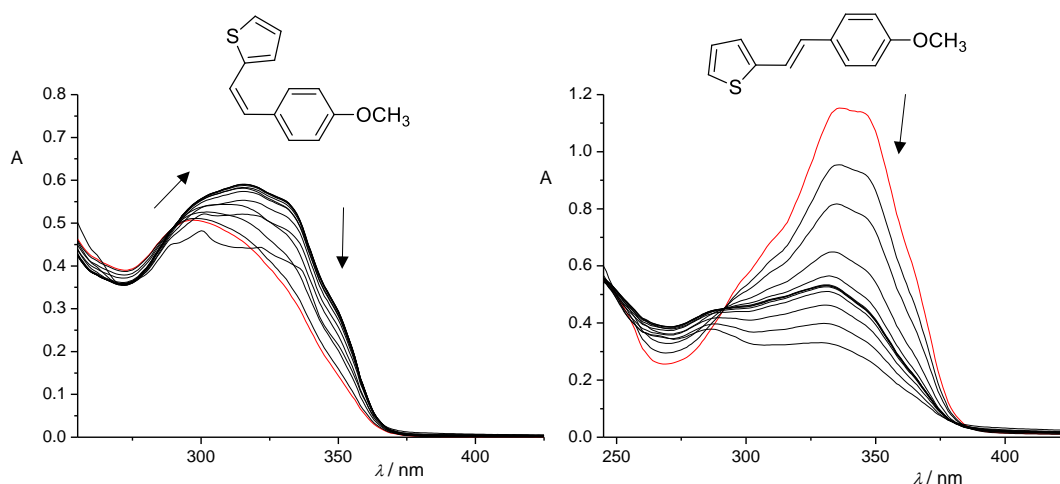
7.1. Proučavanje spektralnih promjena pod utjecajem UV zračenja



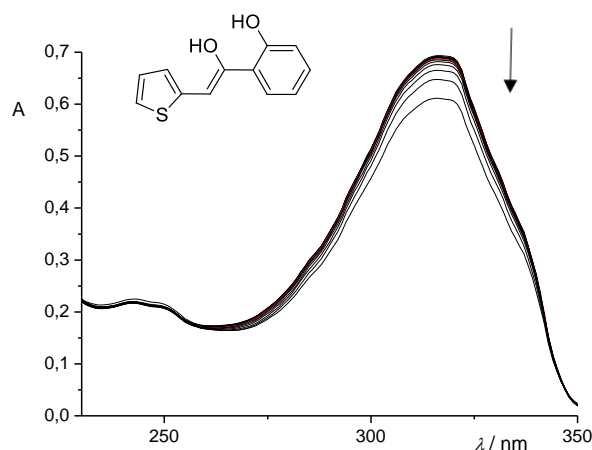
Slika 1. Spektralne promjene tijekom osvijetljavanja analoga rezveratrola *trans-2* u CH_3CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$).



Slika 2. Spektralne promjene tijekom osvijetljavanja analoga rezveratrola *cis-3* (lijevo) u CH_3CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$) i *trans-3* (desno) u CH_3CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$).

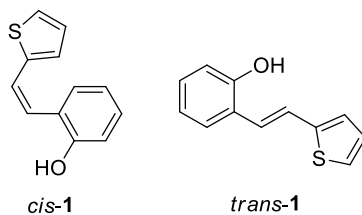


Slika 3. Spektralne promjene tijekom osvjetljavanja analoga rezveratrola *cis-4* (lijevo) u CH_3CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$) i *trans-4* (desno) u CH_3CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$).



8.
Slika 4. Spektralne promjene tijekom osvjetljavanja analoga rezveratrola **5** u CH_3CN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; ($\lambda_{\text{ir}} = 313 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$).

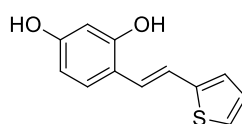
7.2. Spektroskopski podaci sintetiziranih derivata rezveratrola 1-6



(Z)-2-(2-(thiophen-2-yl)vinyl)phenol (*cis-1*): 34 mg (isolated 6 %), colorless oil; R_f (PE/DCM = 50%) = 0.44; UV (CH_3CN) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 289 (26314); $^1\text{H NMR}$

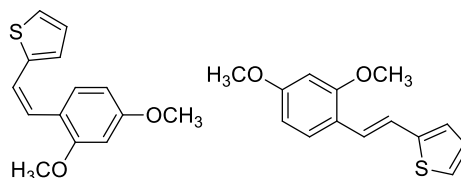
(CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.28 (tdd, $J = 7.9, 1.7, 0.7$ Hz, 1H), 7.20 (dt, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.13 (dt, $J = 5.1, 0.9$ Hz, 1H), 7.01 – 6.93 (m, 4H), 6.90 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 5.08 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 153.2 (s), 138.7 (s), 129.2 (s), 128.3 (d), 127.6 (d), 125.4 (d), 125.1 (d), 123.5 (d), 122.9 (d), 77.4 (d), 76.9 (d), 76.5 (d); MS (ESI) m/z (% , fragment): 202 (30), 105 (100).

(E)-2-(2-(thiophen-2-yl)vinyl)phenol (*trans*-1): 495 mg (isolated 82 %), white powder; m.p. = 126-127 °C; R_f (PE/DCM = 50%) = 0.33; UV (CH₃CN) λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$) 335 (27412); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.46 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H), 7.28 (dt, $J = 16.1, 0.8$ Hz, 1H), 7.20 – 7.16 (m, 2H), 7.15 – 7.10 (m, 1H), 7.07 (dt, $J = 3.7, 0.9$ Hz, 1H), 6.99 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H), 6.93 (dt, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 4.97 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 152.9 (s), 143.3 (s), 128.6 (d), 127.6 (d), 127.2 (d), 126.0 (d), 124.4 (d), 124.3 (s), 123.3 (d), 122.7 (d), 121.2 (d), 115.9 (d); MS (ESI) m/z (% , fragment): 202 (25), 105 (100).



trans-2

(E)-4-(2-(thiophen-2-yl)vinyl)benzene-1,3-diol (*trans*-2): 79 mg (isolated 51 %), white powder; m.p. = 141-143 °C; R_f (PE/E = 50%) = 0.16; UV (CH₃CN) λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$) 343 (28311), 336 (28462); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.33 – 7.30 (m, 1H), 7.17 – 7.12 (m, 2H), 7.05 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.03 (dt, $J = 3.6, 1.0$ Hz, 1H), 6.99 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.78 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 156.1 (s), 154.1 (s), 143.5 (s), 128.4 (d), 127.5 (d), 125.4 (d), 123.9 (d), 122.5 (d), 121.6 (d), 117.5 (s), 108.6 (d), 103.2 (d); MS (ESI) m/z (% , fragment): 241 ($M^+ + Na$, 10), 218 (5), 201 (100).



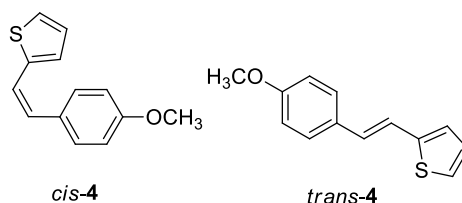
cis-3

trans-3

(Z)-2-(2,4-dimethoxystyryl)thiophene (*cis*-3): 58 mg (isolated 10 %), colorless oil; R_f (PE) = 0.22; UV (CH₃CN) λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$) 317 (15058); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.30 (dd, $J = 8.4, 0.9$ Hz, 1H), 7.05 (dt, $J = 5.2, 0.8$ Hz, 1H), 6.97 (dt, $J = 3.7, 0.9$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 6.52 – 6.45 (m, 3H),

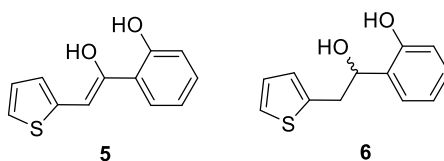
3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 160.9 (s), 158.3 (s), 140.3 (s), 130.9 (d), 127.9 (d), 126.2 (d), 125.1 (d), 124.4 (d), 123.1 (d), 118.61 (s), 104.3 (d), 98.6 (d), 55.5 (q), 55.4 (q); MS (ESI) m/z (% , fragment): 246 (100).

(E)-2-(2,4-dimethoxystyryl)thiophene (trans-3): 112 mg (isolated 35 %), m.p. = 90-93 °C; $R_f(\text{PE}) = 0.22$; UV (CH_3CN) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 347 (25493, sh), 333 (36811); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.17 (s, 2H), 7.13 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J = 3.5, 1.2$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H), 6.50 (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 160.5 (s), 158.1 (s), 144.1 (s), 127.5 (d), 127.4 (d), 124.9 (d), 123.5 (d), 123.3 (d), 120.4 (s), 119.1 (d), 104.9 (d), 98.5 (d), 55.5 (q), 55.4 (q); MS (ESI) m/z (% , fragment): 246 (100).



(Z)-2-(4-methoxystyryl)thiophene (cis-4): 132 mg (isolated 23 %), colorless oil; $R_f(\text{PE}) = 0.59$; UV (CH_3CN) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 297 (10983); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.28 (dd, $J = 9.2, 7.2$ Hz, 2H), 7.09 (dd, $J = 5.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.88 (td, $J = 5.3, 2.8$ Hz, 3H), 6.63 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 159.1 (s), 140.0 (s), 130.1 (d), 129.6 (s), 128.8 (d), 127.8 (d), 126.4 (d), 125.2 (d), 122.5 (d), 113.9 (d), 55.2 (q); MS (ESI) m/z (% , fragment): 216 (100).

(E)-2-(4-methoxystyryl)thiophene (trans-4): 324 mg (isolated 57 %), white powder; m.p. = 136-138 °C; $R_f(\text{PE}) = 0.54$; UV (CH_3CN) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 336 (28625); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.35 – 7.31 (m, 2H), 7.08 (dt, $J = 5.1, 0.9$ Hz, 1H), 7.02 (dt, $J = 16.1, 0.8$ Hz, 1H), 6.95 (dt, $J = 3.6, 1.0$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H), 6.83 – 6.79 (m, 3H), 3.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 159.3 (s), 143.3 (s), 129.8 (s), 127.9 (d), 127.5 (d), 125.4 (d), 123.7 (d), 119.8 (d), 114.2 (d), 114.1 (d), 55.33 (q); MS (ESI) m/z (% , fragment): 216 (100).



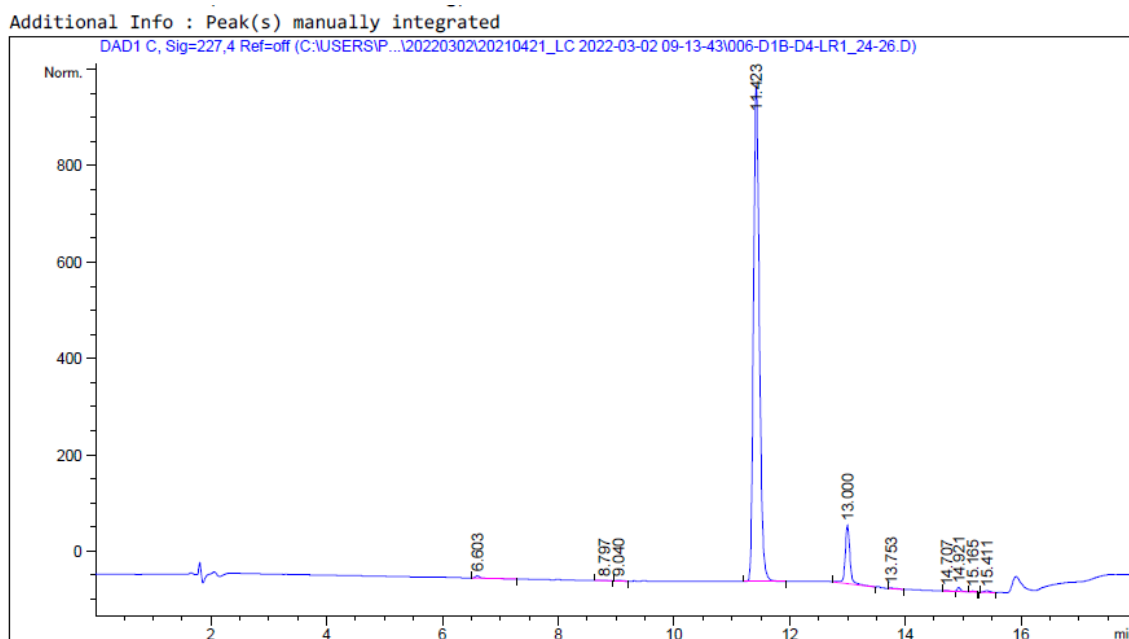
(Z)-2-(1-hydroxy-2-(thiophen-2-yl)vinyl)phenol (5): 13 mg (isolated 22 %), white powder; m.p. = 84-86 °C; $R_f(\text{DCM}) = 0.96$; UV (CH_3CN) $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 317 (16308); ^1H

NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.54 (ddd, $J = 7.6, 1.5, 0.7$ Hz, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.33 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.30 – 7.19 (m, 2H), 7.10 (dd, $J = 5.0, 3.6$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H) 5.00 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 154.6 (s), 151.3 (s), 133.3 (s), 129.1 (s), 125.8 (d), 124.6 (d), 124.3 (d), 123.1 (d), 120.8 (d), 111.1 (d), 101.1 (d), 29.7 (d); MS (ESI) m/z (% , fragment): 241 (M⁺ + Na, 5), 218 (15), 201 (100).

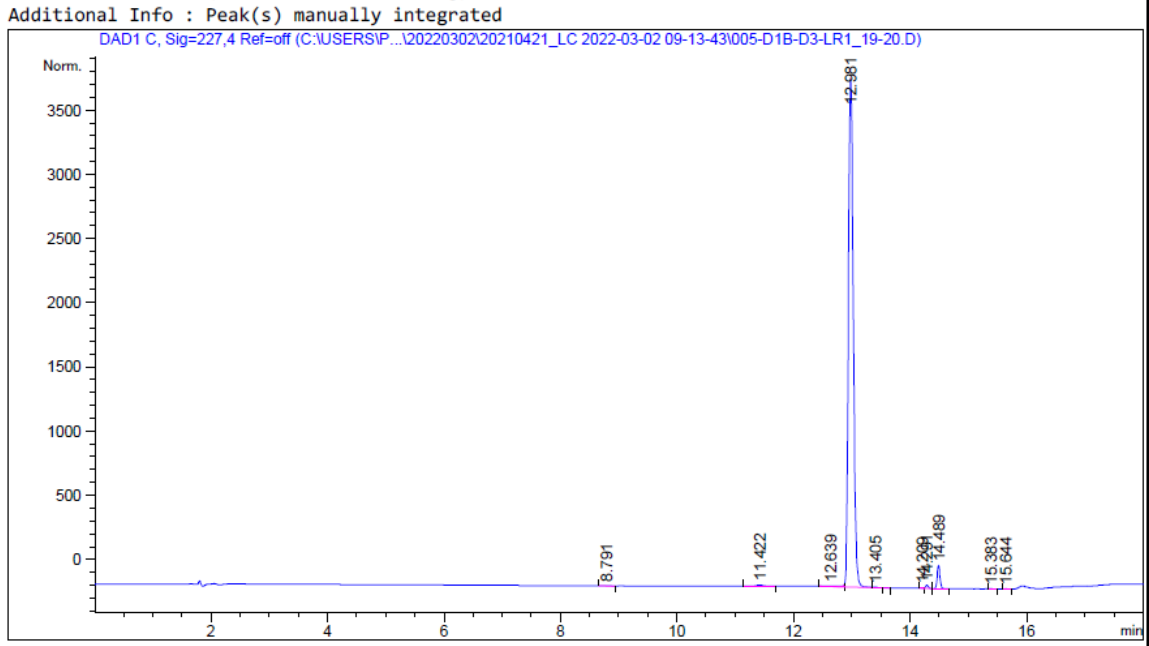
2-(1-hydroxy-2-(thiophen-2-yl)ethyl)phenol (6): 10 mg (isolated 21 %), rose oil; R_f (DCM) = 0.48; UV (CH₃CN) λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$) 278 (16010); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7.28 – 7.21 (m, 3H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 6.99 – 6.89 (m, 4H), 6.83 (dt, $J = 3.5, 1.0$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J = 5.2, 2.6$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 3.37 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 157.6 (s), 143.2 (s), 129.3 (d), 127.1 (d), 125.6 (d), 125.1 (d), 124.8 (d), 121.7 (d), 121.5 (s), 110.3 (d), 107.6 (d), 101.4 (s), 51.3 (d), 47.9 (t); MS (ESI) m/z (% , fragment): 220 (25), 202 (100).

7.3. Kromatogrami novih spojeva 1-6

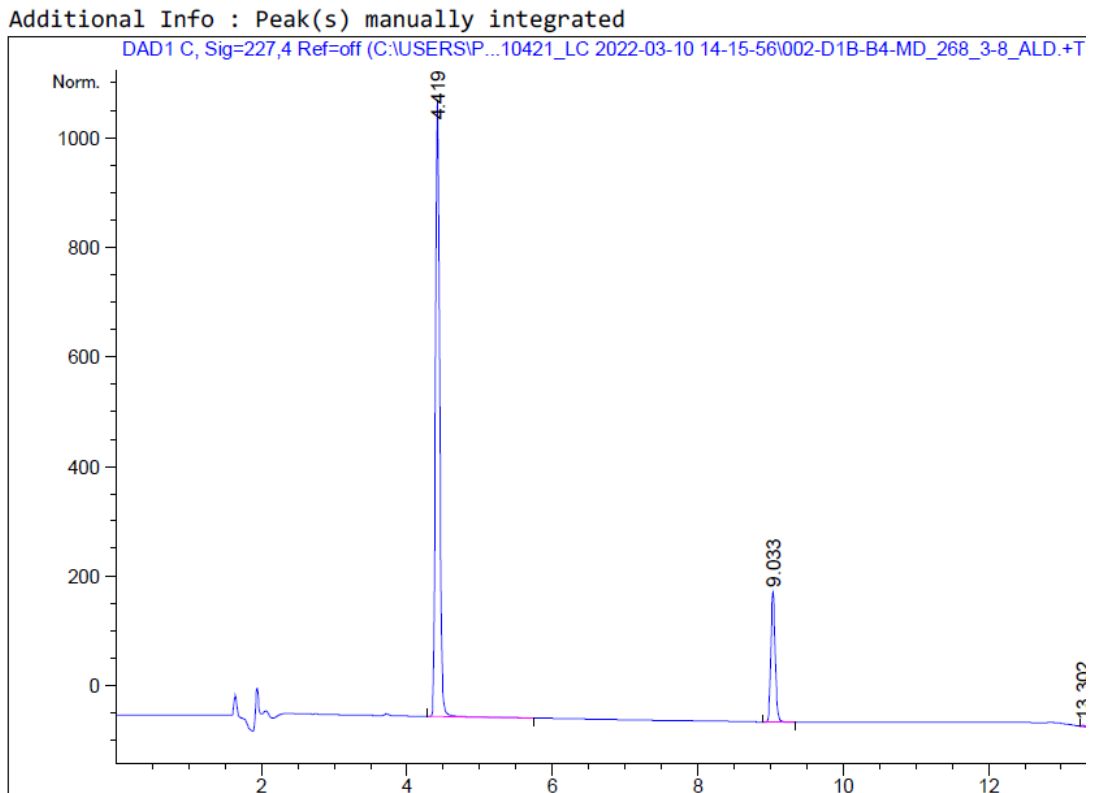
cis-1



trans-1

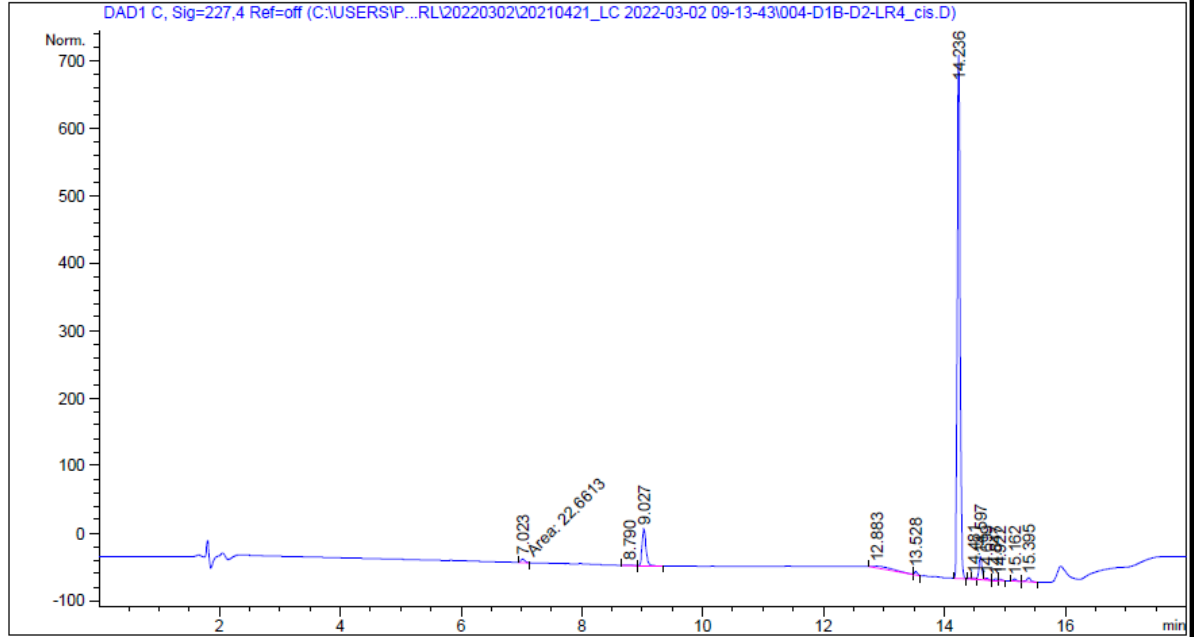


trans-2



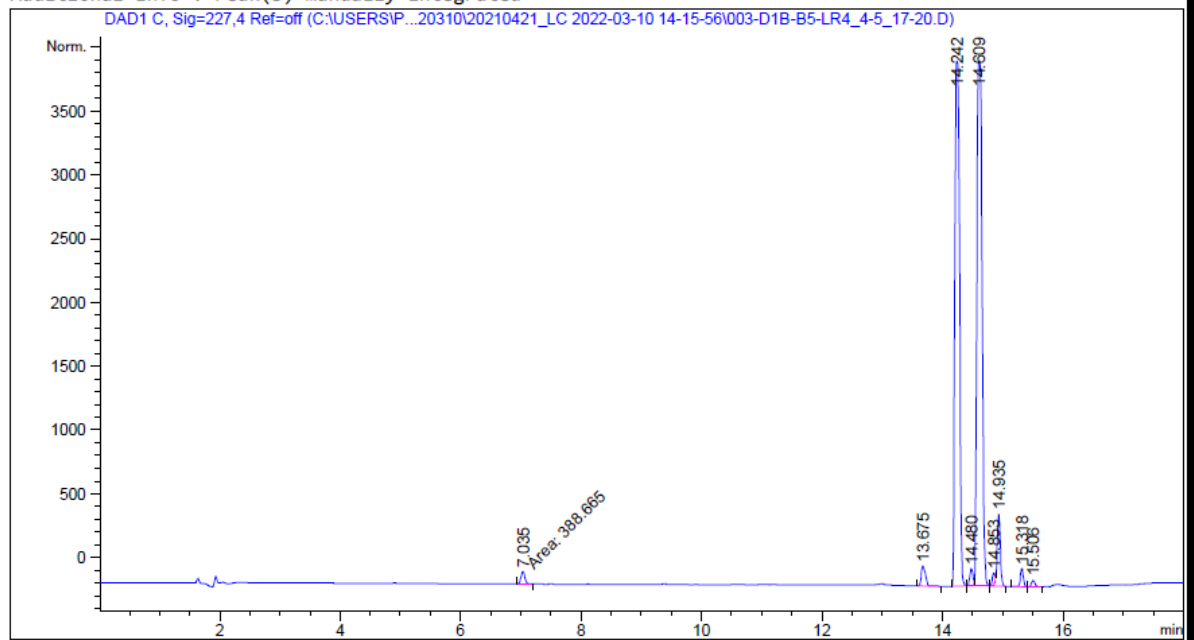
cis-3

Additional Info : Peak(s) manually integrated

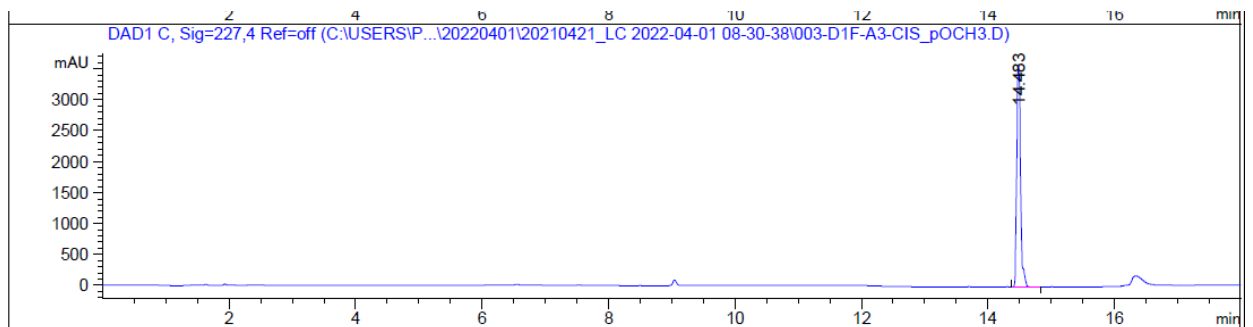


Smjesa *cis*-3 i *trans*-3

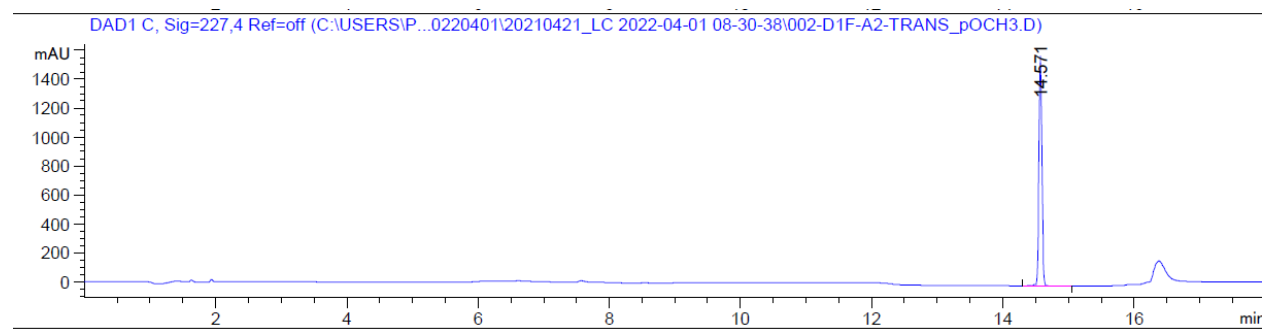
Additional Info : Peak(s) manually integrated



cis-4



trans-4



8. ŽIVOTOPIS

Lucija Rajič osnovnoškolsko obrazovanje završila je 2013. godine u Trećoj osnovnoj školi u Bjelovaru. Nakon toga upisuje Gimnaziju Bjelovar, program Opće gimnazije paralelno sa srednjom glazbenom školom Vatroslav Lisinski u Bjelovaru te je maturirala oba programa 2017. godine. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Kemija i inženjerstvo materijala. Tijekom preddiplomskog studija stručnu praksu je odradila u firmi Hrvatska elektroprivreda (HEP d.o.o.) u Centralnom kemijsko-tehnološkom laboratoriju. Diplomski studij upisala je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Kemija i inženjerstvo materijala. Po završetku prve godine diplomskog studija zapošljava se kao studentica u Plivinom istraživačkom institutu na odjelu Kemija.