

Sinteza i karakterizacija novih oksimskih derivata heterostilbena kao potencijalnih reaktivatora kolinesteraza

Puček, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:944501>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Puček

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Puček

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA NOVIH OKSIMSKIH DERIVATA
HETEROSTILBENA KAO POTENCIJALNIH REAKTIVATORA
KOLINESTERAZA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Irena Škorić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

prof. dr. sc. Sandra Babić

Zagreb, rujan 2020.

Sažetak

U cilju proučavanja djelovanja oksimskih derivata heterostilbena kao reaktivatora kolinesteraza sintetizirani su novi spojevi **15** – **21**. Dobivanje željenih spojeva započinje Wittigovom reakcijom kojom su sintetizirani heterostilbeni **1** – **7**, koji su Vilsmeier-Haackovim formiliranjem prevedeni u aldehide **8** – **14**. Na njima je provedena reakcija u cilju dobivanja oksimskih derivata **15** – **21**, koji do sada literaturno nisu poznati. Očekivani produkti bili su *cis*- i *trans*- izomeri spojeva **15** – **21**, s nizom različitih supstituenata vezanih u *para*- položaju benzenskog prstena. U konačnici, u svakoj provedenoj reakciji dobivanja oksima nastala su četiri izomera, s obzirom na konfiguraciju dvostruke veze ugljika, te s obzirom na konfiguraciju dvostruke veze između ugljika i dušika oksimske skupine. Svaki dobiveni oksimski derivat **15** – **21** može zauzeti četiri različita izomerna oblika: *cis*, *syn*-, *trans*, *syn*-, *cis*, *anti*-, *trans*, *anti*-. Svi novi spojevi okarakterizirani su spektroskopskim metodama, a za one dobivene u dovoljnoj količini bit će ispitana reaktivacijska aktivnost prema humanim enzimima AChE i BChE.

Ključne riječi: heterostilbeni, kolinesteraze, oksimi, reaktivacija AChE i BChE, spektroskopija

Summary

Synthesis and characterization of novel oxime derivatives of heterostilbenes as potential cholinesterase reactivators

For the purpose of studying the effect of oxime derivatives of heterostilbene as a cholinesterase reactivators, new compounds **15** – **21** were synthesized. Starting compounds **1** – **7** were synthesized using the Wittig reaction, and they are converted to the aldehydes **8** – **14** by Vilsmeier-Haack formylation. In order to obtain previously unknown oximes **15** – **21**, oximation was carried out. The expected products were the *cis*- and *trans*- isomers of compounds **15** – **21**, which contain different substituents bound in the *para*-position of the benzene ring. Finally, in each reaction of oxime formation, four isomers were obtained, considering to the configuration of the carbon-carbon double bond, and to the double bond between the carbon and nitrogen of the oxime group. Each obtained oxime derivative **15** – **21** can take four different isomeric forms: *cis*, *syn*-, *trans*, *syn*-, *cis*, *anti*-, *trans*, *anti*-. All new compounds were characterized by spectroscopic methods, and for those obtained in sufficient quantities, the reactivation activity against human enzymes AChE and BChE will be tested.

Key words: AChE and BChE reactivation, cholinesterases, heterostilbenes, oximes, spectroscopy

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

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na stručnom vodstvu, danim savjetima, uloženom trudu u prenošenju znanja i pruženoj potpori tijekom izrade diplomskog rada.

Također, hvala svim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na ugodnom radnom okruženju i pruženoj pomoći.

Hvala mojoj obitelji koja je uvijek vjerovala u mene, te hvala mojim prijateljima, posebice Luki na podršci i potpori u svim trenucima mog školovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Kolinesteraze	2
2.1.1. Inhibicija kolinesteraza	3
2.2. Primjena oksima	5
2.2.1. Novi potencijalni oksimski reaktivatori	7
2.2.2. Utjecaj naboja	10
2.2.3. Primjena mutiranih AChE.....	11
2.3. Derivati oksazola kao inhibitori kolinesteraza	12
3. REZULTATI I RASPRAVA	15
3.1. Uvod	15
3.2. Dobivanje oksimskih derivata heterostilbena.....	16
3.2.1. Wittigova reakcija	16
3.2.2. Vilsmeier-Haackovo formiliranje	18
3.2.3. Oksimi.....	19
3.3. Spektroskopska karakterizacija dobivenih spojeva 1 – 21	22
4. EKSPERIMENTALNI DIO.....	30
4.1. Opće napomene	30
4.2. Sintaza heterostilbena 1 – 7	31
4.3. Sintaza aldehida 8 – 14	34
4.4. Sintaza oksima 15 – 21	38
5. ZAKLJUČAK	44
6. LITERATURA.....	45
ŽIVOTOPIS	49

1. UVOD

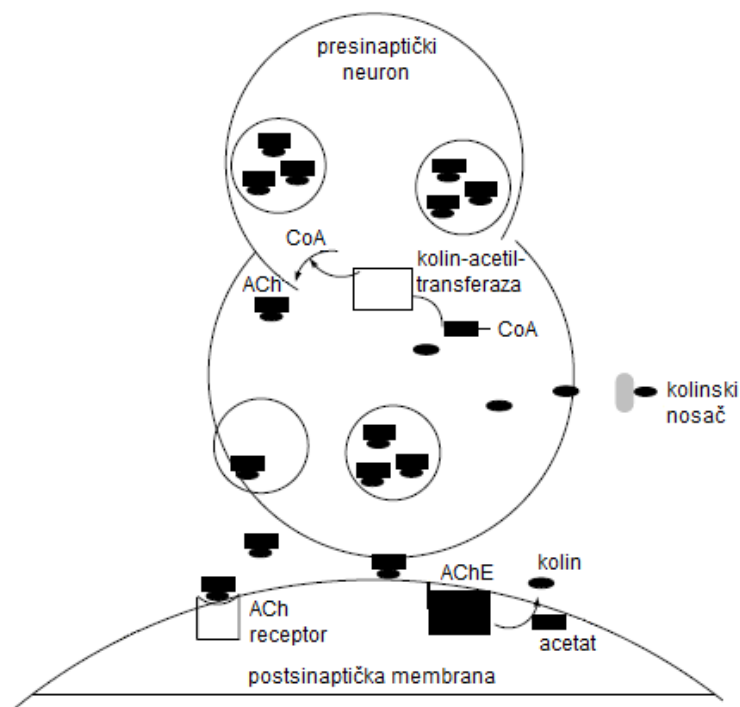
Literaturno poznati oksimski derivati pokazali su se pogodnima u ulozi reaktivatora AChE i BChE inhibiranih organofosfatima ili kao inhibitori spomenutih kolinesteraza. S obzirom da trovanje živčanim agensima predstavlja velik problem, istraživanja terapijskog učinka radi suzbijanja posljedica trovanja, od velike su važnosti. U okviru ovog rada sintetizirani su oksimski derivati **15** – **21**, u obliku četiri moguća izomerna oblika, sa nizom supstituenata u *para*- položaju benzenskog prstena reakcijskim putem koji uključuje Wittigovu reakciju, Vilsmeier-Haackovo formiranje i u konačnici oksimiranje. Za identifikaciju i određivanje dobivenih struktura korištene su jednodimenzionalne ^1H i ^{13}C NMR metode te dvodimenzionalne COSY i HSQC spektroskopske metode. Cilj ovog rada bio je sinteza novih oksimskih derivata heterostilbena, kao potencijalnih reaktivatora kolinesteraza, te će biološka aktivnost dobivenih novih spojeva u dovoljnoj količini biti ispitana.

2. OPĆI DIO

2.1. Kolinesteraze

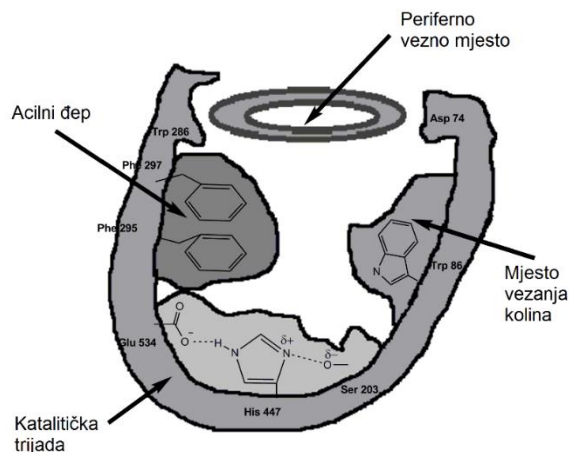
Acetilholinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) su strukturno homologni enzimi, a karakterizira ih različita katalitička aktivnost, specifičnost vezanja supstrata, liganada i inhibitora.¹

Enzim AChE je visoko specifična za hidrolizu acetilkolina (ACh), čime kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava.^{2,3} Tijekom neurotransmisije (slika 2.1.) ACh se oslobađa iz sinaptičkog mjehurića presinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu. Tamo se veže na receptore ACh smještene na postsinaptičkoj membrani.^{4,5} Vezanje ACh pokreće niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom živčanog impulsa.³ Na postsinaptičkoj membrani smještena je AChE, čijim djelovanjem se ponovno uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane, a prijenos impulsa se zaustavlja.^{4,5}



Slika 2.1. Put ACh tijekom neurotransmisije.⁶

Posebnu značajku strukturi AChE daje ždrijelo aktivnog mjesta duboko 20 Å, dok je aktivno mjesto enzim smješteno na udaljenosti 4 Å od dna molekule. Na slici 2.2. shematski je prikazana struktura aktivnog mjesta AChE, koje se sastoji od dvije podjedinice, periferno anionsko mjesto i katalitičko mjesto, na kojem se odvija vezanje ACh.⁶



Slika 2.2. Shematski prikaz aktivnog mjesta AChE.⁶

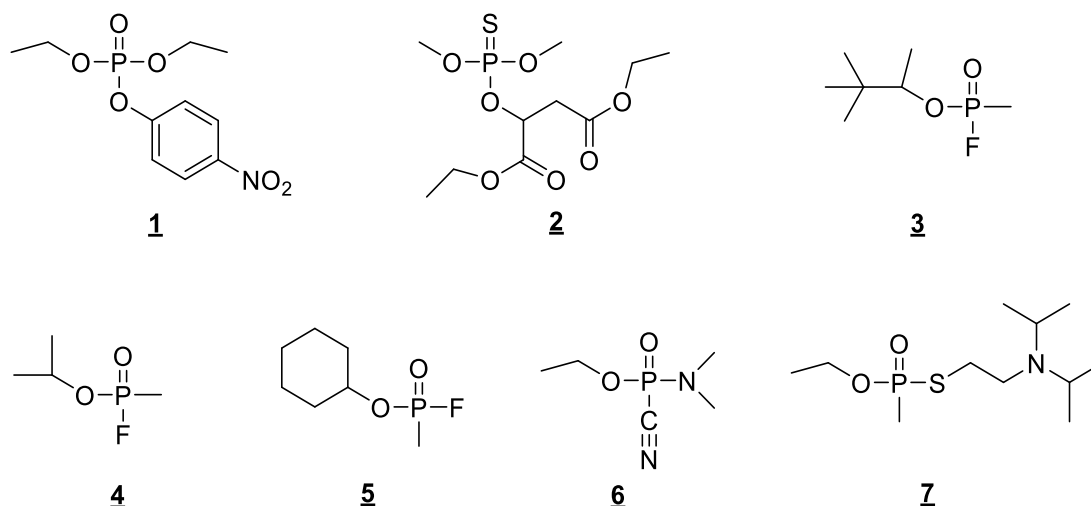
Mehanizam hidrolize započinje vezanjem acilne skupine ACh na aminokiselinski ostatak serina, te preko intermedijera dolazi do oslobađanja kolina. Acilirani enzim podliježe nukleofilnom napadu vode, odnosno deaciliranju, koje je potpomognuto histidinom, a u završnom koraku dolazi do oslobađanja octene kiseline i u konačnici regeneracije enzima.^{1,6} Smanjena razina ACh i gubitak kolinergičkog sustava karakteristika su Alzheimerove bolesti, pa osnovu farmakoterapijskog liječenja Alzheimerove bolesti predstavljaju reverzibilni inhibitori AChE.⁷

Većina BChE nalazi se u plazmi, predstavljajući sakupljača raznih štetnih tvari prije njihovog dolaska do AChE, čime uzrokuju njenu inhibiciju.^{8,9} BChE hidrolizira puno širi spektar estera (propionil(tio)kolin, benzoil(tio)kolin i dr.) uključujući i voluminozne neutralne estere (heroin, kokain, prokain i dr.), pa čak i neke negativno nabijene estere (aspirin), i to brzinama bliskima brzini hidrolize butirilkolina.¹⁰ Također, ona služi kao ko-regulator kolinergičke neurotransmisije hidrolizom ACh.^{11,12}

2.1.1. Inhibicija kolinesteraza

Inhibitori kolinesteraza mogu biti reverzibilni i imati terapijski učinak, dok toksični efekt ostvaruju ireverzibilni inhibitori.⁶ Ireverzibilni inhibitori AChE pripadaju skupini organofosfatnih spojeva (OP), a to su najčešće esteri ili tioli izvedeni iz fosforne, fosfonske, fosfinske ili fosforamidne kiseline. Svoje glavne toksikološke učinke iskazuju putem ireverzibilne fosforilacije esteraza u središnjem živčanom sustavu.¹³ Organofosfatni spojevi koriste se kao pesticidi i insekticidi, uslijed čega djeluju i na druga živa bića i ljude.⁶ Primjeri nekih korištenih pesticida prikazani su na slici 2.3., paraokson (**1**) i malation (**2**).⁹ Trovanje

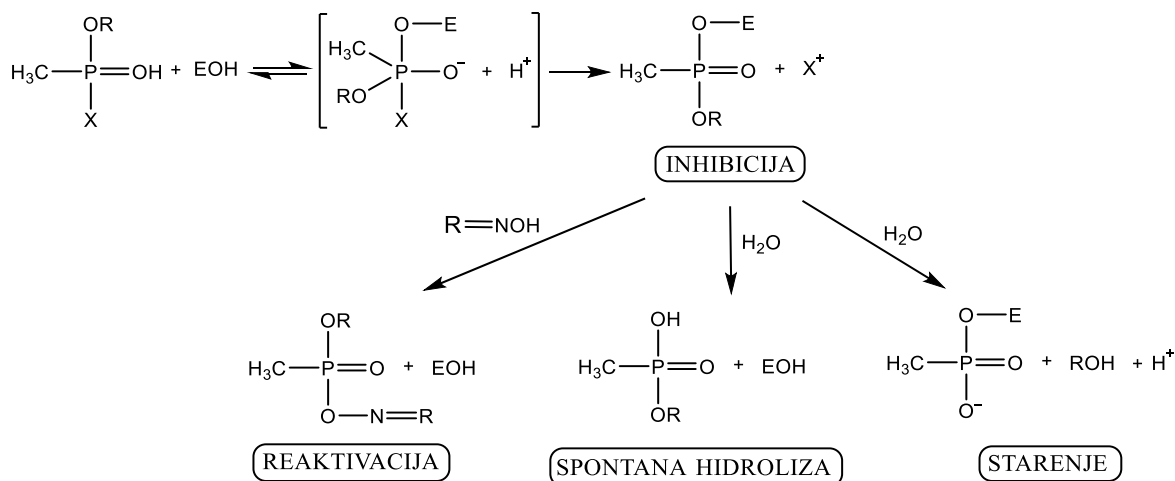
može biti uzrokovano unošenjem OP spojeva na različite načine: udisanjem, gutanjem ili apsorpcijom kroz kožu.¹⁴ Najveću opasnost od OP spojeva predstavlja kemijsko oružje poput somana (**3**), sarina (**4**), ciklosarina (**5**), tabuna (**6**) i VX (**7**) (slika 2.3.). No, iako je njihovo korištenje zabranjeno od strane Ujedinjenih Naroda, terorističke organizacije i pojedine države ipak ih koriste.⁹



Slika 2.3. Strukture organofosfatnih spojeva **1** – **7**.

Organofosfati su zapravo supstrati analogni ACh, koji ulaze u aktivno mjesto AChE, te se kovalentno vežu na hidroksilnu skupinu serina, čime dolazi do fosforilacije enzima (shema 2.1). Defosforilacija, odnosno regeneracija enzima vrlo je spora, štoviše traje danima i onemogućuje hidroliziranje neurotransmitera ACh.¹⁵ Inhibicija enzima dovodi do nakupljanja ACh u sinaptičkoj pukotini, što rezultira prekomjernom stimulacijom nikotinskih i muskarinskih ACh receptora, čime je neurotransmisija onemogućena. Klasični simptomi ovih procesa su uznemirenost, slabost mišića, mišićni trzaji, mioza, hipersalivacija, znojenje, a trovanje može uzrokovati respiratorno zatajenje, nesvjesnost, zbuđenost, konvulzije i/ili smrt.¹⁶⁻¹⁸

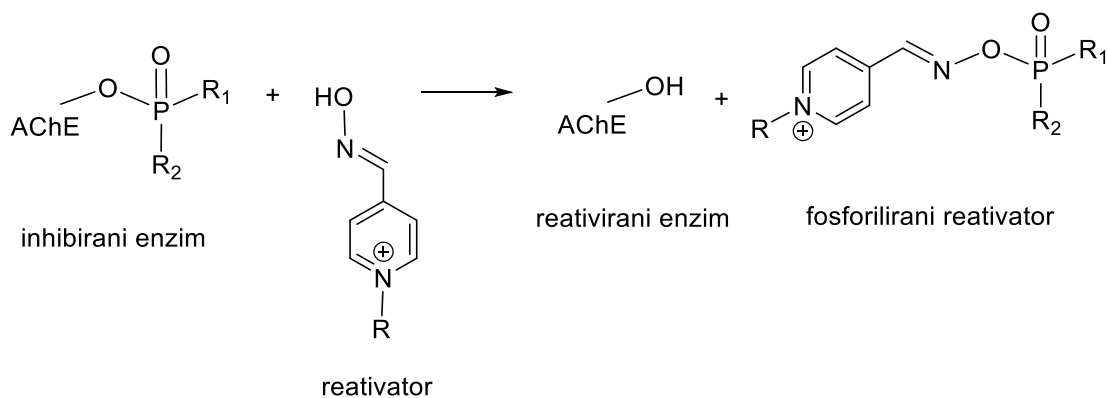
Ireverzibilna inhibicija odvija se u dva koraka. Prvi je brza, kratkotrajna reverzibilna inaktivacija enzima, a drugi je spora ireverzibilna inhibicija. Prilikom ireverzibilne inhibicije dolazi do kovalentnog vezanja inhibitora na enzim, odnosno formiranja vrlo stabilnog kompleks između enzima i inhibitora.¹⁹ No, pravovremenim djelovanjem enzim se može reaktivirati oksimima, prije nego što uslijedi dealkiranje kompleksa enzim-organofosfat (shema 2.1.).⁶



Shema 2.1. Mehanizam inhibicije enzima acetilkolinesteraze (EOH) organofosfatima i reaktivacija, spontana hidroliza te starenje fosforilanog enzima.⁶

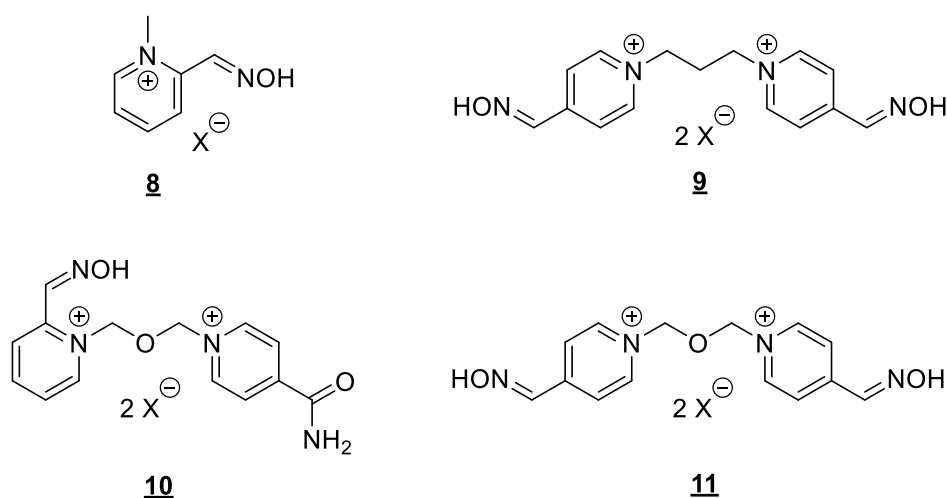
2.2. Primjena oksima

Usljed trovanje OP spojevima, glavna terapija uključuje atropin kao antimuskarinski lijek, benzodiazepin kao antikonvulzivni lijek, a terapijsku ulogu pronalaze i odgovarajući oksimi.²⁰ Oni, za razliku od simptomatskih lijekova, regeneriraju funkciju AChE uklanjanjem OP spojeva iz aktivnog mjesta. Na shemi 2.2. prikazan je mehanizam reaktivacije AChE, koji se zasniva na nuklofilnom napadu oksima prema OP na fosforiliranoj AChE. Kovalentna veza između OP i serina AChE se cijepa, nastaje kompleks između reaktivatora i OP, a enzim se tada oslobađa.^{21,22} Fosforilirani oksim može biti moćniji inhibitor od početnog OP, pa može doći i do reinhibicije reaktivirane AChE.²³ Iz tog razloga oksimi u ulozi reaktivatora moraju imati visoki afinitet prema fosforiliranim kolinesterazama, a slabi afinitet za reinhibiciju.²⁴



Shema 2.2. Reaktivacija inhibirane AChE oksimskim reaktivatorom.⁶

Usprkos brojnim istraživanjima, trenutna standardna terapija još uvijek se temelji na malom broju spojeva koji su prvi put sintetizirani 50-ih i 60-ih godina prošlog stoljeća, a radi se o pralidoksimu (2-PAM; **8**), trimedoksimu (TMB-4; **9**), asoksimu (HI-6; **10**) i obidoksimu (**11**), čije su strukture prikazane na slici 2.4.²⁵⁻²⁹ Provedena su mnoga *in vitro* ispitivanja reaktivacijske, upotrebom različitih izvora AChE, različitih pesticida i živčanih agenasa i *in vivo* ispitivanja sa širokim spektrom eksperimentalnih uvjeta, životinjskih vrsta, kombinacija protuotrova i njihovih doza, te je dokazano da dodatak oksima osnovnom tretmanu atropinom predstavlja terapijsku korist.³⁰



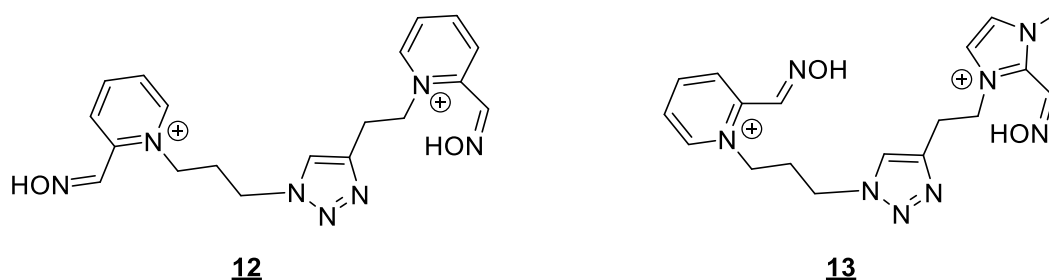
Slika 2.4. Strukture spojeva **8** – **11**.

Iako je pralidoksim (2-PAM; **8**) prvi sintetizirani i najčešće korišteni lijek, njegova sposobnost regeneracije inhibirane enzimске aktivnosti nije zadovoljavajuća. S druge strane, trimedoksim (TMB-4; **9**) i obidoksim (**11**) pokazali su se vrlo dobri u liječenju trovanja OP insekticidima, dok je za asoksim (HI-6; **10**) uočeno da je učinkovit za intoksikaciju izazvanu živčanim agensima. Štoviše, obidoksim (**11**), u kombinaciji s atropinom i diazepamom, pokazao je pozitivne rezultate u kliničkim ispitivanjima.^{31,32} No, niti jedan od standardnih oksima, koji se koriste u medicinske i vojne svrhe, nije se pokazao kao univerzalni reaktivator AChE.³³ Kritični segmenti mehanizma reaktivacije su orijentacija oksima i OP spojeva unutar uskog ždrijela aktivnog mjesta, te kut nukleofilnog napada oksima.³³⁻³⁸ Također, kristalografskim ispitivanjem inhibirane AChE, otkriveno je da konformacijske promjene pojedinih ostataka mogu rezultirati smanjenom pristupačnošću reaktivatora u ždrijelu aktivnog mjesta.³⁹

2.2.1. Novi potencijalni oksimski reaktivatori

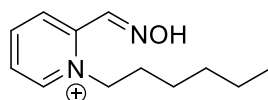
Provedena su istraživanja kojima je odabrano nekoliko oksimskih derivata sa triazolnim prstenima koji pokazuju reaktivacijska svojstva prema AChE inhibiranoj živčanim agensima, uspoređujući njihova svojstva sa svojstvima standardno korištenih oksima.

Na slici 2.5. istaknuti su neki od primjera struktura takvih aldoksima, koji na lanac vezanog triazolnog prstena imaju vezan i piridinski prsten sa aldoksimskom skupinom u *ortho*- položaju (**12**) ili imidazolni prsten sa aldoksimskom skupinom u položaju 2 (**13**). Ispitivanje je uključivalo mjerenje reaktivacije AChE inhibirane živčanim agensima VX, sarinom i ciklosarinom, te pesticidima koji sadrže toksični sastojak analogan paraoksonu. S obzirom da se radi o piridinskim i imidazolnim aldoksimima, oni ne pokazuju brzi prelazak krvno-moždane barijere, ali kao spojevi koji sadrže kvaterne amonijeve atome, vjerojatno će se lako moći izlučiti iz organizma.⁴⁰



Slika 2.5. Strukture spojeva **12** i **13**.

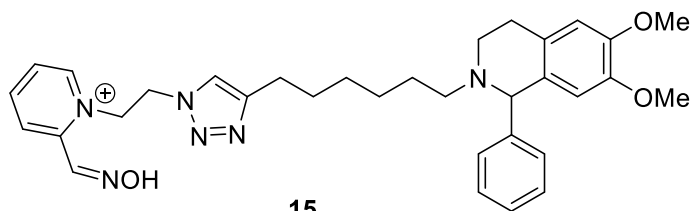
Također, u *ex vivo* ispitivanjima prethodno odabranih oksima kao reaktivacijskih sredstava za inhibirane mutirane AChE, ističe se spoj **14** (slika 2.6.). Unutar istraživanja, ispitivana je i skupina alkiliranih piridinijevih aldoksima, koji ujedno strukturom predstavljaju analoge spoja **7**, od kojih je spoj **14** bio spoj sa najduljim alkilnim lancem, te je pokazao najbolje rezultate. Ovakva struktura spoja sadrži hidrofobni alkilni lanac i dio molekule kationskog karaktera. Kroz istraživanje je promatrana i uloga alkilnog lanca u kasnijem izlučivanju iz organizma, pa bi se produljenjem ovog lanca mogla ostvariti takva svojstva molekule reaktivatora kojima bi se poboljšalo njeno izlučivanje iz organizma. Intoksikacija je ispitivana, na inhibiranim AChE sa različitom količinom živčanog agensa tabuna, korištenjem različite količine spoja **14** kao reaktivatora.⁴¹



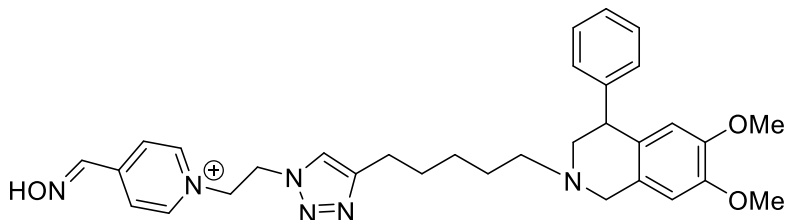
14

Slika 2.6. Struktura spoja **14**.

Nadalje, istraživanjima oksimskih reaktivatora, koji u svojoj strukturi sadrže triazolni prsten, uspješno su se pokazali i aldoksimi triazola s vezanim feniltetraizokinolinski dijelom (slika 2.7.). Kod spojeva **15** i **16** lanac koji sadrži triazolni prsten i spaja piridinski prsten sa feniltetraizokinolinski dijelom, znatno je duži u odnosu na lanac sa triazolnim prstenom, kod prijašnje spomenutog spoja **12**, koji spaja dva piridinska prstena. Sintetizirana je skupina oksima, te su pojedinačno ispitane njihove reaktivacijske sposobnosti prema AChE i BChE inhibirane sarinom, VX, ciklosarinom i tabunom.⁴²



15



16

Slika 2.7. Struktura spojeva **15** i **16**.

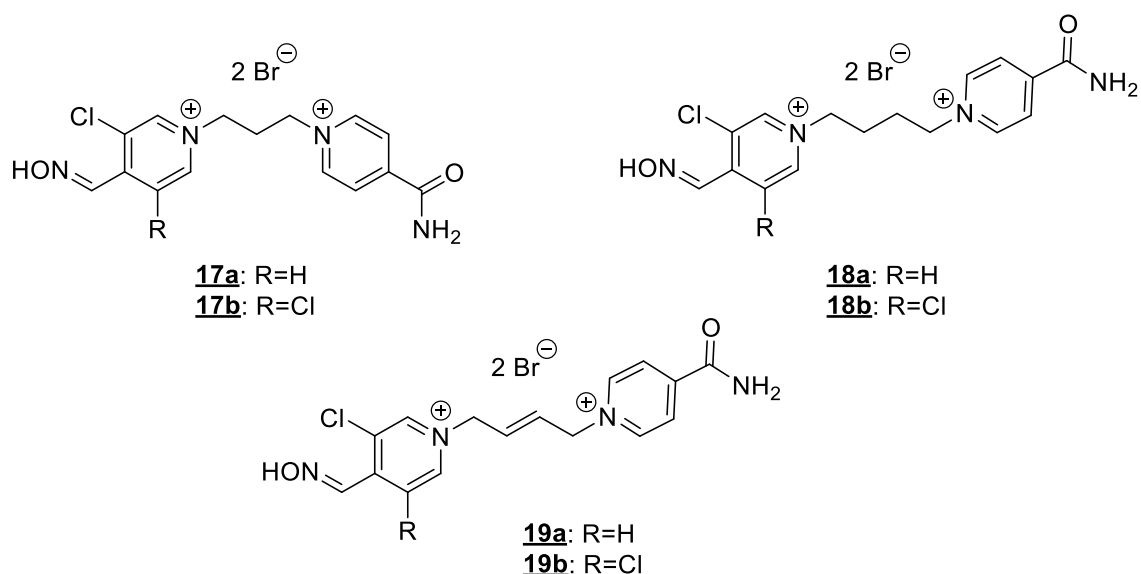
Uočeno je da prisutnost triazolnog prstena, zbog njegovog jakog dipolnog karaktera, može dati manje povoljnu orijentaciju za nukleofilni napad prema inhibiranom enzimu. Također, iako aktivno mjesto BChE omogućava veću konformacijsku slobodu i fleksibilnost testiranih oksima, za razliku od aktivnog mjesta AChE, identificirani su potencijalni reaktivatori BChE inhibirane samo sarinom i ciklosarinom, kao posljedica strukture samih inhibitora.⁴²

Razlika u reaktivacijskoj sposobnosti određenog oksima, prema pojedinoj kolinesterazi inhibiranoj s odabranim OP spojem, posljedica je konformacijskih promjena na aktivnom mjestu kolinesteraze i steričkih smetnji uzrokovanih vezanim OP spojem, što onda utječe na

moćnost pristupa i zauzimanja potrebne orijentacije oksima, u cilju nukleofinog napada prema OP spoju. Višestrukim interakcijama oksima sa ostacima unutar aktivnog mjesta može doći do stabilizacije oksima u nepogodnoj konformaciji, kojom je oksim smješten predaleko od fosfora vezanog na serin, čime ne ostvaruje preduvjete za uspješnu defosforilaciju. Također, prostorno ograničenje ždrijela aktivnog mjesta može ograničiti kut napada oksima i izlazak OP iz ždrijela aktivnog mjesta. Rezultati ispitivanja kojima se teži, obuhvaćaju postizanje maksimalne *in vivo* reaktivacije i minimalne toksičnost od samog reaktivatora, što je najbolje postići maksimalnom brzinom reaktivacije i minimiziranjem afiniteta za preostali slobodni enzim.⁴²

Nedavno su sintetizirani i piridinijevi oksimi s jednim ili dva klora u *ortho*- položaju (slika 2.8.), koji su se pokazali kao učinkoviti reaktivatori AChE inhibirane različitim živčanim agensima. U većini slučajeva su se ispitivani piridinijevi oksimi sa dva klorova atoma pokazali kao učinkovitiji reaktivatori, u odnosu na one sa jednim klorom. Uvođenjem klorovih atoma kao supstituenata ostvarena je povećana lipofilnost, što je rezultiralo povećanom sposobnošću prelaska krvno-moždane barijere i smanjenju vrijednosti pKa što povećava reaktivacijsku sposobnost takvih oksima.⁴³

Temeljem rezultata istraživanja piridinijevih oksima kao potencijalnih reaktivatora AChE inhibirane živčanim agensima, provedeno je istraživanje njihove reaktivacijske sposobnosti BChE inhibirane sarinom, ciklosarinom, VX i tabunom. S obzirom da se spoj **17b** (slika 2.8.) istaknuo u reaktivacijskoj sposobnosti inhibirane AChE, on je ispitivan i kao potencijalni reaktivator inhibirane BChE. Uz njega je za reaktivaciju BChE inhibirane sarinom ispitivan i spoj **18b**, te je u tom slučaju njihova reaktivacijska sposobnost bila usporediva, a dobivenim rezultatima pokazali su se boljima od standardnih oksima. U slučaju reaktivacije BChE inhibirane ciklosarinom i VX, spoj **17b** pokazao je sposobnost reaktivacije koja je bliska rezultatima koje pokazuju standardni oksimi. Iako se ovaj spoj pokazao neaktivnim za reaktivaciju AChE inhibirane tabunom, u slučaju BChE inhibirane istim živčanim agensom on pokazuje sposobnost za reaktivaciju koja je bolja od standardnih oksima. Razlog tomu može biti aktivno mjesto BChE koje omogućava veću konformacijsku slobodu testiranog oksima.²⁰



Slika 2.8. Strukture spojeva **17** – **19**.

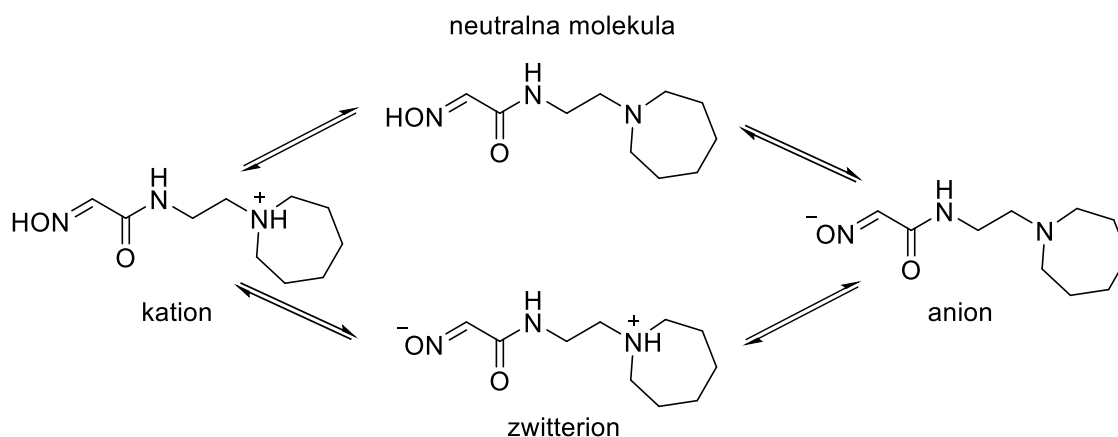
Spoj **17b** istaknuo se sposobnošću reaktivacije inhibirane AChE, ali i inhibirane BChE od strane različitih živčanih agenasa, što bi moglo dodatno poboljšati učinkovitost terapije. Također, s obzirom na veliki afinitet vezanja spoja **17b** prema AChE, on bi mogao zaštititi aktivno mjesto AChE od vezanja OP spojeva na katalitički serin.²⁰

2.2.2. Utjecaj naboja

Sposobnost nukleofila da pristupi atomu fosfora unutar ograničenog prostora ždrijela aktivnog mjesta, jedno je od ograničenja djelovanja reaktivatora. Uz to, nameće i drugo ograničenje, koje proizlazi iz sposobnosti reaktivatora da prijeđe krvno-moždanu barijeru. Učinjeni su brojni pokušaji kako bi se poboljšao prijenos reaktivator kroz krvno-moždanu barijeru i omogućilo mu se ciljano djelovanje. To je uključivalo primjenu pro-lijeka, vezanje reaktivatora na nosače, dodavanje spoju hidrofobni karakter, te upotrebu drugih potencijalnih nukleofila.⁴⁴

Orijentacija dipola unutar ždrijela je takva da će pozitivno nabijene supstrate, s kojima stvara elektrostatske interakcije, voditi do aktivnog mjesta. Bočni aromatski lanci, na određeni način, štite supstrat od izravne interakcije s negativno nabijenim ostacima. Afinitet kvaternih amonijevih spojeva prema aromatskim prstenima uz djelovanje opisanih elektrostatskih interakcija, djeluju usklađeno i time ostvaruju selektivno i učinkovito mjesto vezanja supstrata u AChE, što je u skladu sa položajem aktivnog mjesta u dnu ždrijela.⁴⁵ Takva orijentacija dipola niz ždrijelo aktivnog mjesta AChE prirodno služi za privlačenje kationa prema aktivnom mjestu, kao što to pokazuje i njen prirodni supstrat ACh.⁴⁴

Spojevi koji sadrže kvaterni dušikov atom pokazali su ograničenja u brzini prelaska krvno-moždane barijere, pa alternativu predstavljaju oksimi koji nemaju pozitivan naboj ili u strukturi imaju tercijski dušikov atom. Ispitivanja su pokazala da spoj **20** u kratkom vremenskom intervalu prelazi krvno-moždanu barijeru.⁴⁶



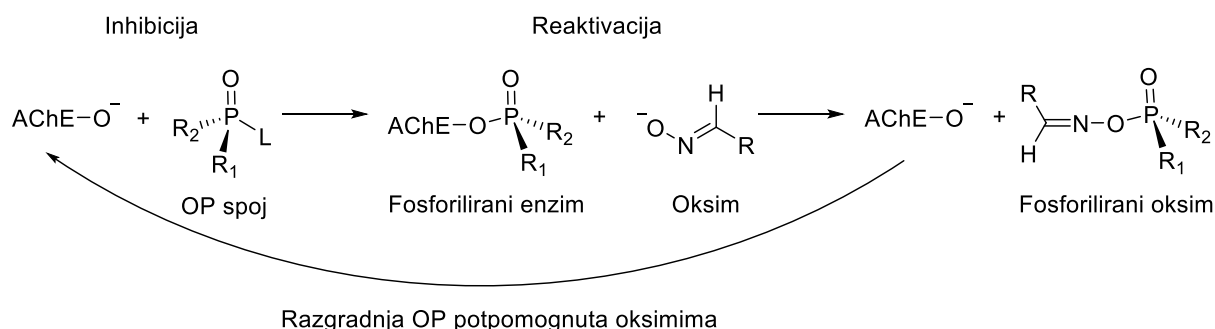
Shema 2.3. Ravnoteža između kationskog, neutralnog, anionskog i zwitterionskog oblika molekule **20**.⁴⁴

Ravnoteža se formira između dvije skupine, oksimske i aminske, što rezultira pojavom kationskog, zwitterionskog, neutralnog i anionskog oblika molekule u području pH vrijednosti koje su prisutne u fiziološkim uvjetima. Zwitterionski i kationski oblik reaktivatora ima najveću sposobnost interakcije s kompleksom OP-AChE, dok se za neutralni oblik reaktivatora može očekivati da ima najveću sposobnost prelaska krvno-moždane barijere i dolaska do centralnog živčanog sustava.⁴⁷ Mnoga razmatranja ukazuju na prednosti koje daje mogućnost molekule da formira ova četiri ionska oblika izmjenom protona, i time joj omogućuje različiti ionski karakter, ovisno o okruženju u kojem se nalazi.⁴⁴ Također, potencijalno ograničenje predstavlja i mogućnost uklanjanja protuotrova iz organizma i utjecaj njegove strukture na tu mogućnost, što za sobom veže i razinu toksičnosti koju može uzrokovati njegova primjena.⁴⁸

2.2.3. Primjena mutiranih AChE

Daljnja istraživanja usmjerena su na upotrebu oksima kod razgradnje organofosfata u plazmi, čime bi djelovanje prema živčanim agensima bilo ostvareno prije njihovog prelaska krvno-moždane barijere, čime bi se onemogućio njihov dolazak do ciljanog mjesta i djelovanje na AChE. Korištenje mutiranih oblika AChE u kombinaciji s učinkovitim oksimskim reaktivatorom, predstavlja znatan doprinos u borbi protiv posljedica uzrokovanih izlaganjem OP

spojevima, posebice u slučaju somana, tabuna i VX-a. Potencijalno aktivni parovi oksima i mutiranih oblika AChE, čije djelovanje u ciklusima inhibicije i reaktivacije je shematski prikazano (shema 2.4.), istraživanjem su sveobuhvatno analizirani.⁴⁹



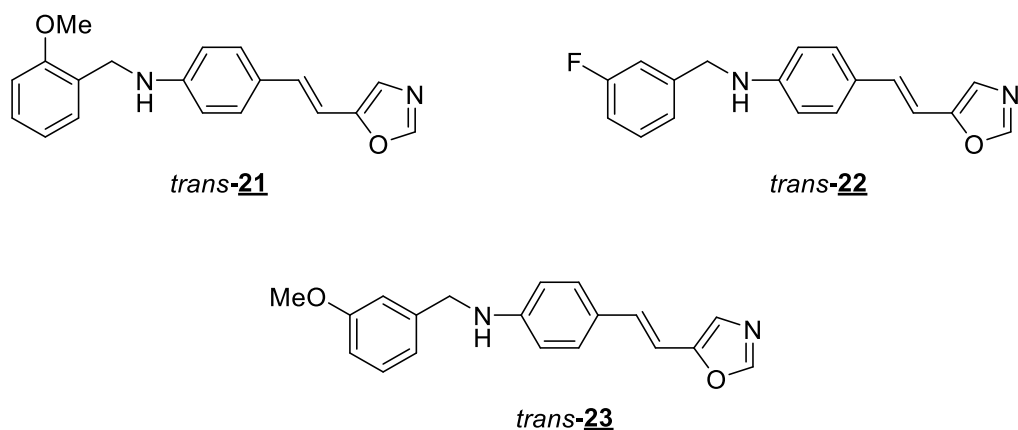
Shema 2.4. Razgradnja OP spoja u ciklusima inhibicije AChE i oksimima potpomognute reaktivacije.⁴⁹

Razgradnja OP pomoću oksima, koja je katalizirana egzogenim mutiranim AChE dokazana je *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* kod miševa. Na ovaj način znatno je umanjen problem dealkiliranja kompleksa između enzima i OP spoja, odnosno proces starenja, koji je izražen kod djelovanja živčanog agensa somana. Prednost koju pruža ovakav način djelovanja je stereoselektivnost organofosfatnog enantiomera kod inhibicije, koja odgovara zahtjevima za reaktivaciju oksimima.⁴⁹

2.3. Derivati oksazola kao inhibitori kolinesteraza

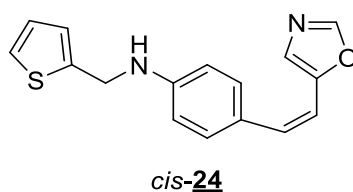
S obzirom da su se oksimi pokazali kao molekule koje imaju sposobnost ulaska u aktivno mjesto AChE i BChE, svoju ulogu mogu pronaći i kao reverzibilni inhibitori kolinesteraza. Na taj način bila bi omogućena primjena u preventivne svrhe, što bi bilo izuzetno korisno u situacijama moguće izloženosti OP spojevima koji ireverzibilno inhibiraju kolinesteraze i čija je reaktivacija tada onemogućena. Također, takvi bi spojevi mogli biti učinkoviti i za smanjenje simptoma Alzheimerove bolesti.²⁴

Proučavanje interakcija molekula različitih struktura, sa specifičnom strukturom aktivnog mjesta AChE i BChE, dovelo je do novih spoznaja i novih oksazolnih derivata sa zapaženim svojstvom inhibicije kolinesteraza.



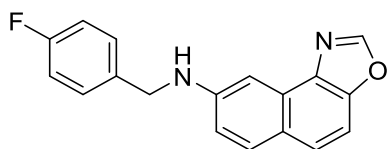
Slika 2.9. Strukture spojeva *trans-21* – *trans-23*.

Kao najmoćniji inhibitori BChE, u ovoj skupini spojeva, pokazali su se spojevi prikazani na slici 2.9., *trans-21*, *trans-22* i *trans-23*, od kojih je *trans-21* imao najveći afinitet vezanja za BChE. Značajnu ulogu u aktivnosti određenog spoja ima vrsta supstituenta i njegov položaj na fenilnom prstenu ovih derivata. U slučaju metoksi supstituenta, *ortho*- (*trans-21*) i *meta*- (*trans-23*) analozi daju puno bolje rezultate od *para*-metoksi analoga. Shodno tome, spoj sa *meta*- supstituiranim fluorom (*trans-22*) dao je bolje rezultate od njegovog analoga sa fluorom u *para*- položaju. Spojevi sa supstituiranom metilnom skupinom bili su najslabiji inhibitori BChE od ovdje testiranih spojeva.⁵⁰

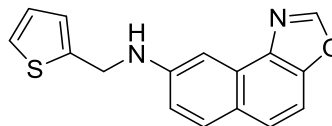


Slika 2.10. Struktura spoja *cis-24*.

Na slici 2.10. prikazana je struktura spoja *cis-24*, unutar kojeg se nalazi tiofenska jezgra, jednog od izoliranih *cis*- izomera amino-5-ariletiloksazola, koji je pokazao najbolju aktivnost prema BChE, te time predstavlja spoj sa većom inhibitornom sposobnosti od opisanih spojeva *trans-21*, *trans-22* i *trans-23*. U skupini ispitivanih naftoksazol benzilamina, koji predstavljaju elektrociklizacijske produkte, spojevi **25** i **26**, sa *p*-fluorofenilnim i tiofenskim supstituentom (slika 2.11.), pokazali su zapaženu inhibicijsku sposobnost prema AChE.⁵⁰



25



26

Slika 2.11. Strukture spojeva **25** i **26**.

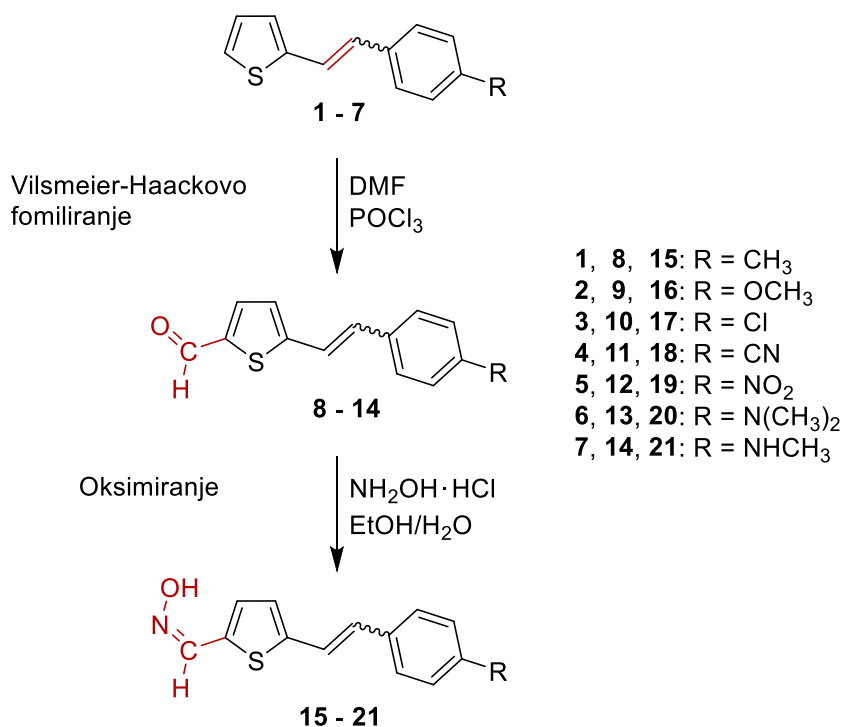
Prema tome, dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazuju da se ispitivani naftoksazol benzilamini i amino-5-ariletenil-oksazoli mogu klasificirati kao umjereni inhibitori BChE. Također, naftoksazol benzilamini pokazali su se kao snažniji inhibitori AChE nego derivati *trans*-amino-5-ariletenil-oksazola. Selektivnost ovih spojeva prema vezanju za BChE mogla bi biti korisna u daljnjem istraživanju i razvoju selektivnih inhibitora kolinesteraza.⁵⁰

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uvod

Oksimi i oksimski derivati pokazuju zamjetan terapijski učinak u brojnim područjima, te su njihova dobra svojstva i potencijalna biološka aktivnost poticaj za nova istraživanja. Svoju značajniju primjenu pokazali su kod terapije uslijed trovanja organosfosfatima i inhibicije kolinesteraza, kao posljedice djelovanja insekticida, pesticida ili živčanih agenasa. Pogodna struktura oksima, daje mogućnost njihovog djelovanja kao reaktivatora inhibirane kolinesteraze. Nastavno na dosadašnja ispitivanja molekula koje imaju heterostilben kao osnovu strukture, odabrani su segmenti za dizajn novih potencijalno biološki aktivnih spojeva. Do sada su literaturno poznati derivati heterostilbena sa tiofenskom jezgrom sintetizirani reakcijom unakrnog pregrađivanja⁵¹, Heckovom reakcijom⁵²⁻⁵³, te rađeni u svrhu ispitivanja fotokemijskih⁵⁴ i optičkih⁵⁵ svojstava.

Dobivanje željenih oksimskih derivata, kao potencijalnih reaktivatora kolinesteraza, ostvareno je prema prikazanom reakcijskom putu (shema 3.1.). On započinje formiranjem dvostruke veze Wittigovom reakcijom, čime dobivamo početne spojeve **1 – 7**, koji se u prvom koraku formiliraju, te se dobiveni aldehidi **8 – 14**, prevode u oksime **15 – 21** kao konačne spojeve ovog slijeda reakcija.

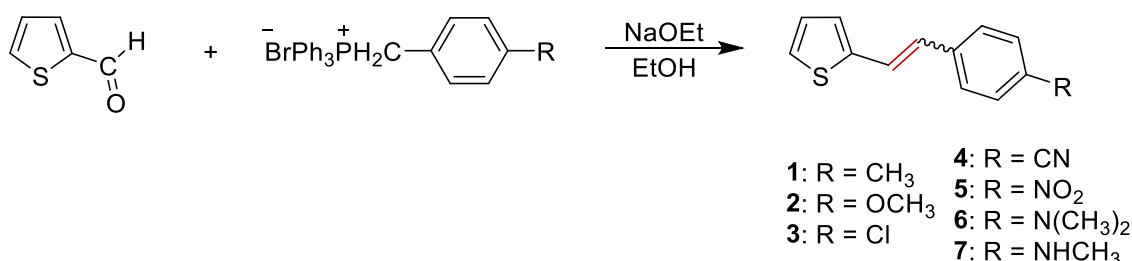


Shema 3.1. Reakcijski put dobivanja oksimskih derivata heterostilbena.

3.2. Dobivanje oksimskih derivata heterostilbena

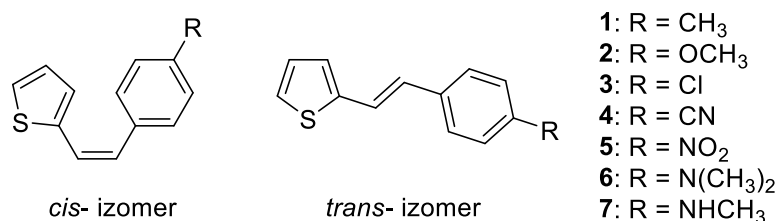
3.2.1. Wittigova reakcija

Strukturu stilbena karakterizira etilenska skupina koja povezuje dvije fenilne skupine, dok je u ovom konkretnom slučaju heterostilbena, jedna fenilna skupina zamijenjena heterocikličkom jezgrom, odnosno tiofenskim prstenom. Za dobivanje ovakve strukture, odnosno formiranje dvostruke veze koja povezuje tiofenski prsten s benzenskim prstenom korištena je Wittigova reakcija. Općenito, Wittigova reakcija predstavlja reakciju aldehida ili ketona s trifenilfosfonijevim ilidom (Wittigov reagens), te se kao produkt dobiva alken i trifenilfosfonijev oksid. Stereokemija prijelaznog stanja, odnosno radi li se o *syn* ili *anti* oksafosfetanu određuje hoće li reakcija biti usmjerena prema nastajanju *Z*- ili *E*- izomera alkena.⁵⁶



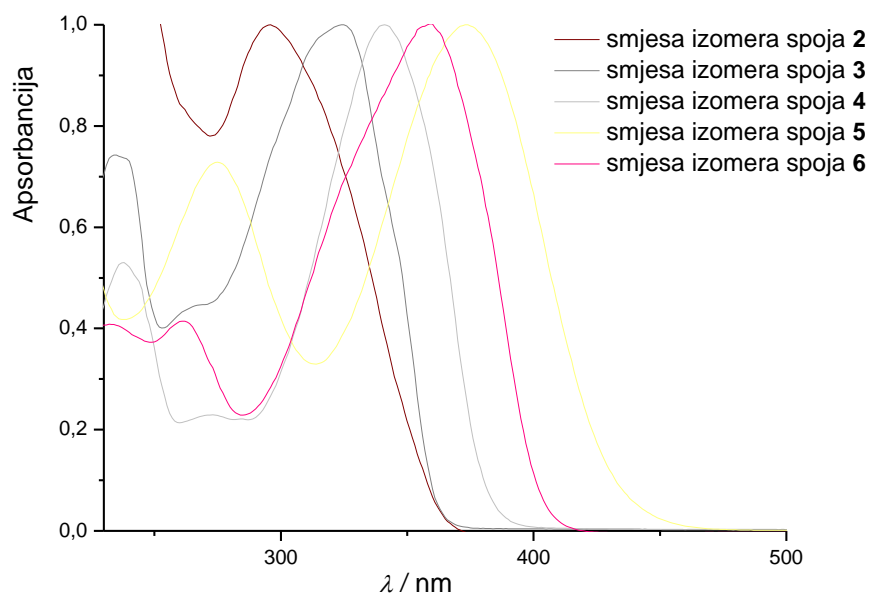
Shema 3.2. Sinteza spojeva **1** – **7** Wittigovom reakcijom.

Wittigova reakcija provedena je korištenjem tiofen-2-karbaldehida, kupovne kemikalije i odabrane fosfonijeve soli priredene u našem laboratoriju, uz odgovarajuće reakcijske uvjete (shema 3.2.). Dobiveni produkti **1** – **7** predstavljaju osnovnu strukturu za daljnje reakcije u cilju dobivanja željenih oksimskih derivata, kao što je prikazano na shema 3.1., odnosno predstavljaju početni spoj za funkcionalizaciju. Ovdje govorimo o *cis*- i *trans*- izomerima produkata **1** – **7**, prikazanih na slici 3.1., koji su kao smjesa geometrijskih izomera podvrgnuti daljnjoj reakciji formiliranja.



Slika 3.1. Prikaz geometrijskih izomera spojeva **1** – **7** nastalih Wittigovom reakcijom.

Također, ^1H NMR spektroskopskom analizom produkata **1**, **2**, **4** i **5** utvrđeno je da je omjer *cis*- i *trans*- izomera 1 : 2, odnosno da su provedene Wittigove reakcije usmjerene prema nastajanju *trans*- izomera, dok je kod produkata **3**, **6** i **7** količina nastalih izomera jednaka.

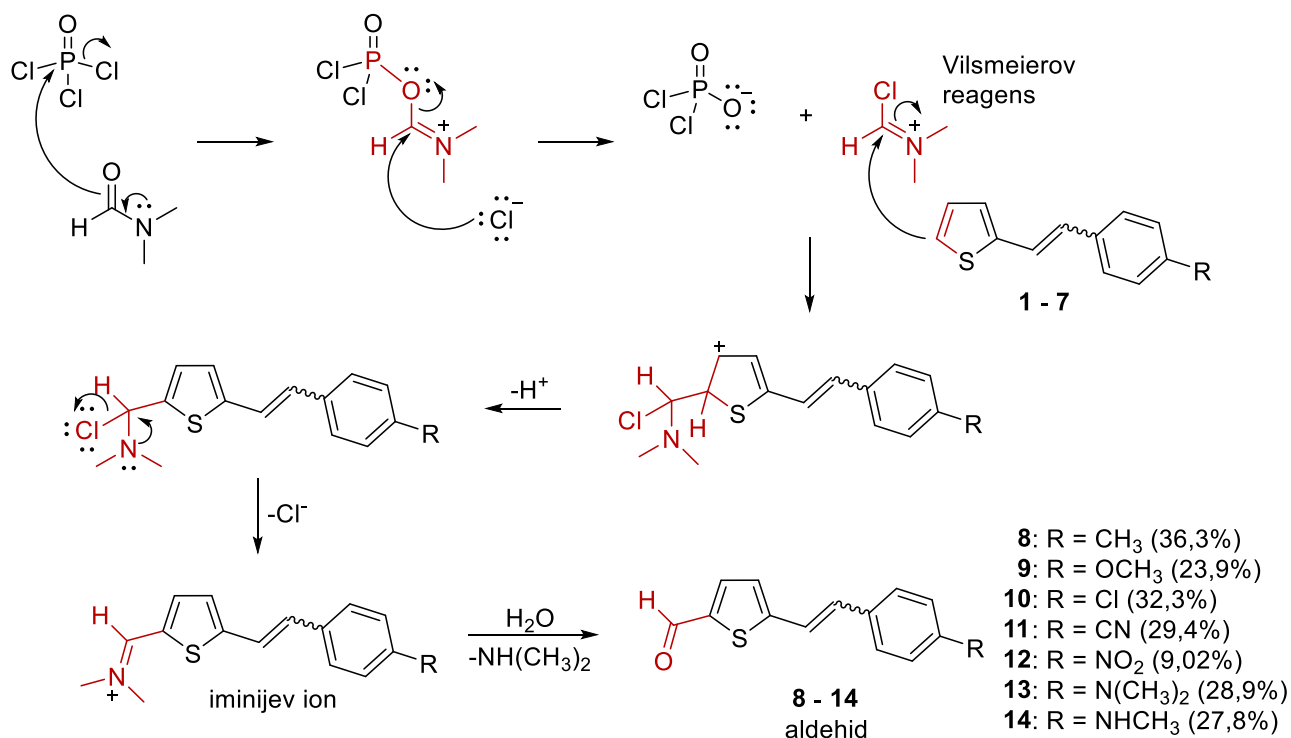


Slika 3.2. Normalizirani UV spektri smjesa izomera **2** – **6**.

Na priloženim normaliziranim UV spektrima smjesa izomera **2** – **6**, na slici 3.2., vidljiv je utjecaj supstituenta na položaj maksimuma apsorpcije (λ_{max}). Heterostilben **5**, s vezanom nitro-skupinom na benzenski prsten ima najveću vrijednost valne duljine maksimuma apsorpcije, koja iznosi 373 nm. Najmanju vrijednost valne duljine maksimuma apsorpcije od 295 nm, ostvaruje heterostilben **2**, s vezanom metoksi-skupinom. Vrijednosti λ_{max} ostalih ispitivanih smjesa geometrijskih izomera heterostilbena po iznosu se nalaze između navedene dvije krajnje vrijednosti, a redom uzlazno radi se o spojevima sa supstituentima: klorom (**3**), cijano-skupinom (**4**) i nitro-skupinom (**5**).

3.2.2. Vilsmeier-Haackovo formiliranje

Smjese pripremljenih geometrijskih izomera podvrgnute su reakciji Vilsmeier-Haackovog formiliranja (shema 3.3.). U ovoj reakciji POCl_3 i DMF prvotno tvore klor-iminijev ion, Vilsmeierov reagens, koji zatim stupa u reakciju s heterostilbenom. Reakcija se odvija na ugljikovom atomu, u položaju 2, tiofenskog prstena, te nastaje iminijev ion, koji hidrolizom prelazi u konačni aldehyd **8 - 14**.



Shema 3.3. Mehanizam dobivanja spojeva **8 – 14** Vilsmeier-Haackovim formiliranjem.

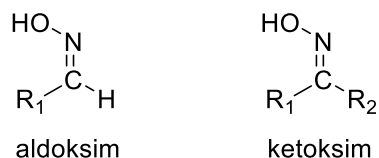
Dobiveni produkti **8 – 14** predstavljaju smjesu geometrijskih izomera u različitim omjerima, s obzirom na različiti supstituent, a samim time i različiti omjer *cis*- i *trans*- izomera njihovih početnih spojeva **1 – 7**. Temeljem asignacije ^1H NMR spektara dobivenih smjesa izomera aldehyda može se reći da su *trans*- izomeri početnih spojeva **1 – 7** uspješnije reagirali u provedenom formiliranju u odnosu na *cis*- izomere, pa je time udio *trans*- izomera u produktima **8 – 14** znatno veći.

Reakcije dobivanja produkata **8 – 10** provedene su sa zadovoljavajućim iskorištenjem na izoliranim smjesama aldehyda, od oko 30%. Iskorištenje reakcije dobivanja produkata **11 i 12**, prvotno je bilo znatno niže u odnosu na prethodno provedene eksperimente. Iz tog razloga, nakon što je reakcija postavljena prema proceduri koja uključuje korištenje vode s komadićima

leda za snižavanje temperature reakcijske smjese na 10°C, što zahtijeva egzotermna reakcija, ostavlja se na sobnoj temperaturi sat vremena, a zatim zagrijava na 80°C kroz tri sata. U tom slučaju iskorištenje reakcije dobivanja produkta **11** povećano je pet puta, a produkt **12** dobiven je s dva puta većim iskorištenjem u odnosu na ono kada zagrijavanje u tijeku reakcije nije primijenjeno. Po uzoru na njih, u tijeku reakcije dobivanja produkata **13** i **14**, reakcijska smjesa je zagrijavana na 60°C u istom periodu.

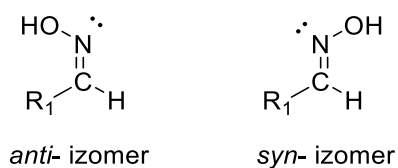
3.2.3. Oksimi

Oksimi su skupina spojeva s općom formulom $R_1R_2C=NOH$, gdje je R_1 organski bočni lanac, a R_2 može biti vodikov atom, tvoreći aldoksime, ili organski supstituent, čime dobivamo ketoksime.⁵⁷



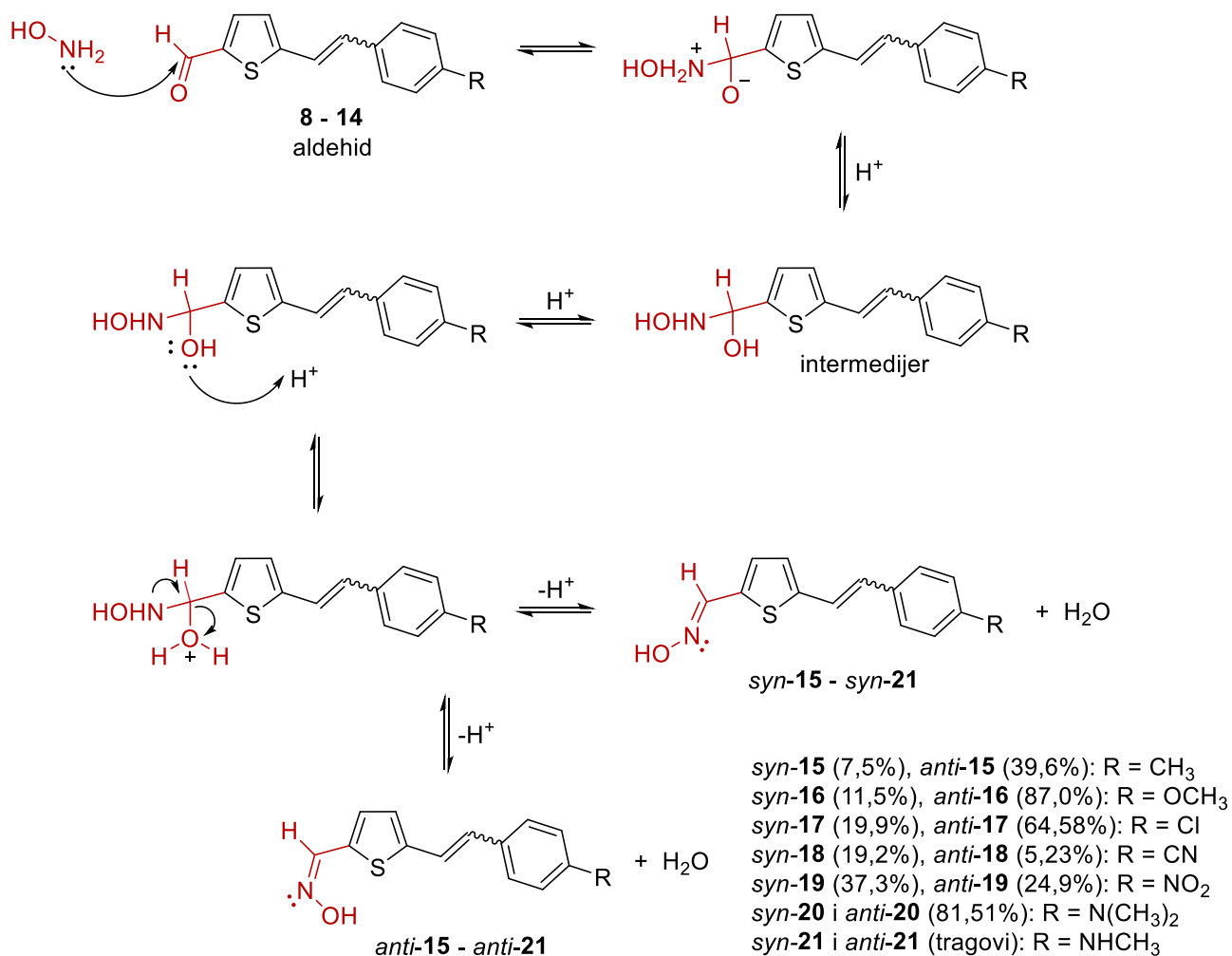
Slika 3.3. Opća struktura oksima.

Zahvaljujući relativnoj rigidnosti veze između ugljika i dušika oksima, oni mogu postojati u dva izomerna oblika, kao *E*- ili *anti*- i *Z*- ili *syn*- izomer. Na slici 3.4. prikazani su mogući izomeri aldoksima, ovisno o tome nalaze li se $-OH$ skupina i vodik na suprotnoj ili istoj strani dvostruke veze ugljika i dušika.⁵⁷



Slika 3.4. Prikaz izomera aldoksima

Reakcija prevođenja sintetiziranih aldehida **8** – **14** u željene oksimske derivate **15** – **21**, uključivala je korištenje $NH_2OH \cdot HCl$ i smjesu etanola i vode kao otapala. Reakcijski uvjeti odabrani su po uzoru na reakciju opisanu u literaturi⁹ temeljem karakteristika strukture na kojoj se izvodi reakcija. Na shemi 3.4. prikazan je mehanizam provedene reakcije s dobivenim produktima i pripadajućim iskorištenjima.



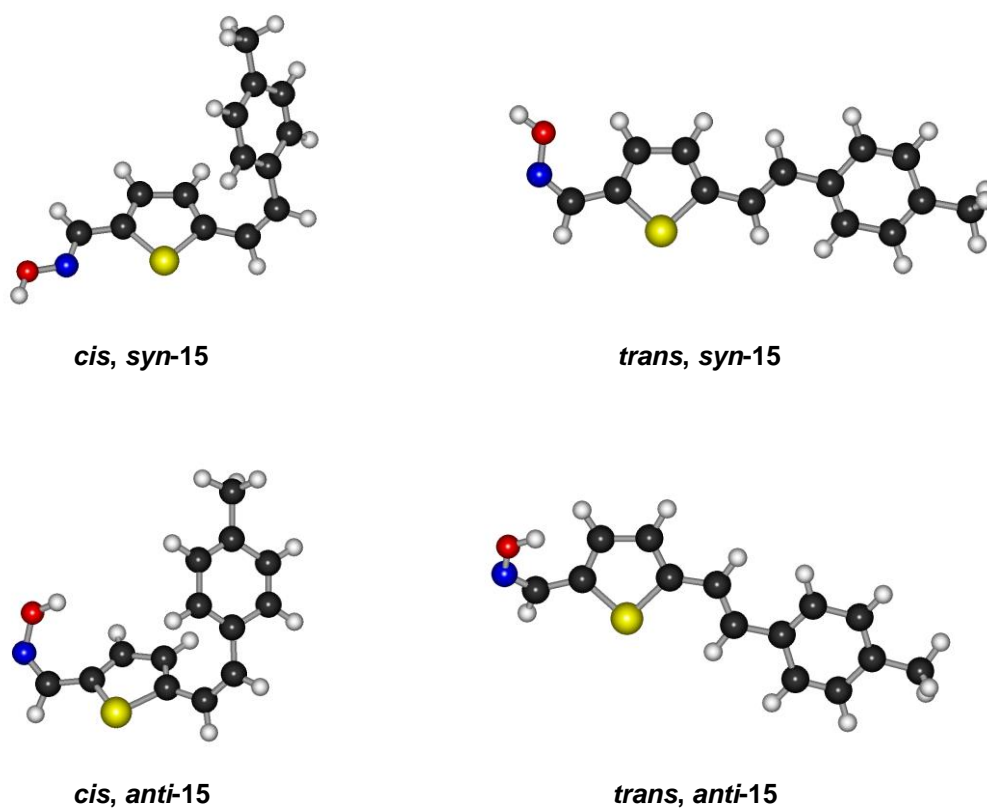
Shema 3.4. Mehanizam dobivanja oksimskih derivata heterostilbena **15 – 21**.

Kao produkt svakog provedenog eksperimenta, odnosno reakcije prevođenja aldehida u oksimski derivat, dobivena je smjesa izomera, koji s obzirom na etensku skupinu mogu biti *cis*- ili *trans*-, a s obzirom na položaj elektronskog para dušika unutar oksimske skupine mogu biti *syn*- ili *anti*-, što u konačnici daje četiri moguća produkta.

Reakcije dobivanja spojeva **15 – 17** većinski su bile orijentirane prema nastajanju *anti*- izomera, dok je u reakcijama dobivanja spojeva **18 – 20** dobiveno više *syn*- izomera oksima, a produkt **21** je dobiven u tragovima. Za vrijeme provođenja eksperimenta utvrđeno je da su *anti*- izomeri oksima polarniji u odnosu na *syn*- oksime, te su obzirom na razliku njihovih *R_f* vrijednosti, relativno dobro izolirani. Sličnost *R_f* vrijednosti *cis*- i *trans*- izomera *syn*- oksima utjecala je na razinu uspješnosti njihovog razdvajanja, te je u sastavu svih smjesa *syn*- oksima većinski bio *trans*- izomer. *Anti*- oksimi sadržavali su znatno veći udio odgovarajućeg *trans*- izomera.

Spojevi *cis*, *syn*-**15**, *trans*, *syn*-**15** – **19**, te *trans*, *anti*-**15** – **18** uspješno su izolirani i okarakterizirani, dok su spojevi *cis*, *syn*-**16** – **19** i *cis*- i *trans*- izomer spoja *anti*-**19** okarakterizirani temeljem ¹H NMR spektroskopske analize dobivenih smjesa izomera. Izomeri spojeva **20** i **21** nisu dobiveni u čistom obliku, te iz tog razloga nisu asignirani.

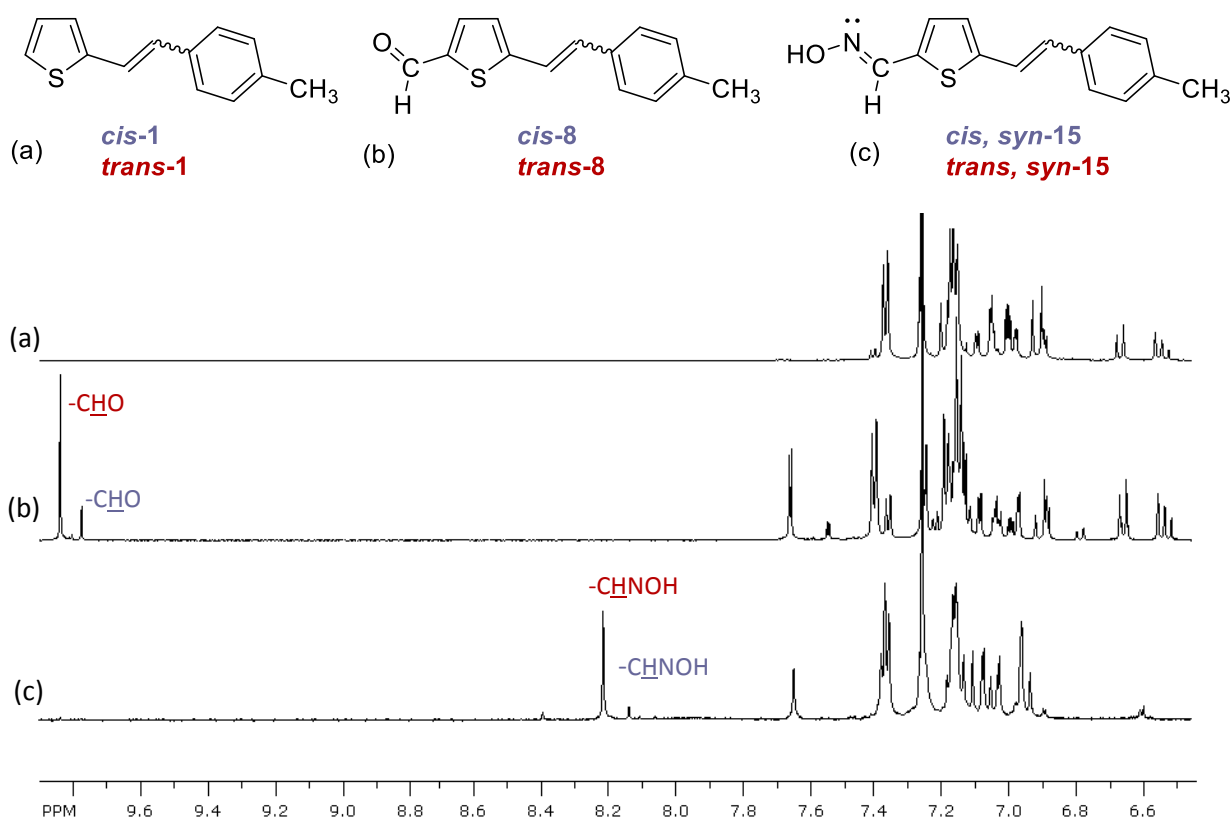
Slika 3.5. prikazuje optimizirane strukture oksimskog derivata stilbena s vezanom metilnom skupinom u *para*- položaju benzenskog prstena, kao primjer prikaza izomera iz skupine sintetiziranih spojeva. Na priloženim strukturama vidljivo je da se *trans*-izomeri u pravilu nalaze u ravnini, dok su *cis*- izomeri strukture izvijene iz ravnine. Također, ovisno o pojedinom izomeru, oksimska skupina je drugačije orijentirana.



Slika 3.5. Prikaz optimiziranih struktura PM3 semi-empirijskom metodom mogućih izomera spoja **15**.

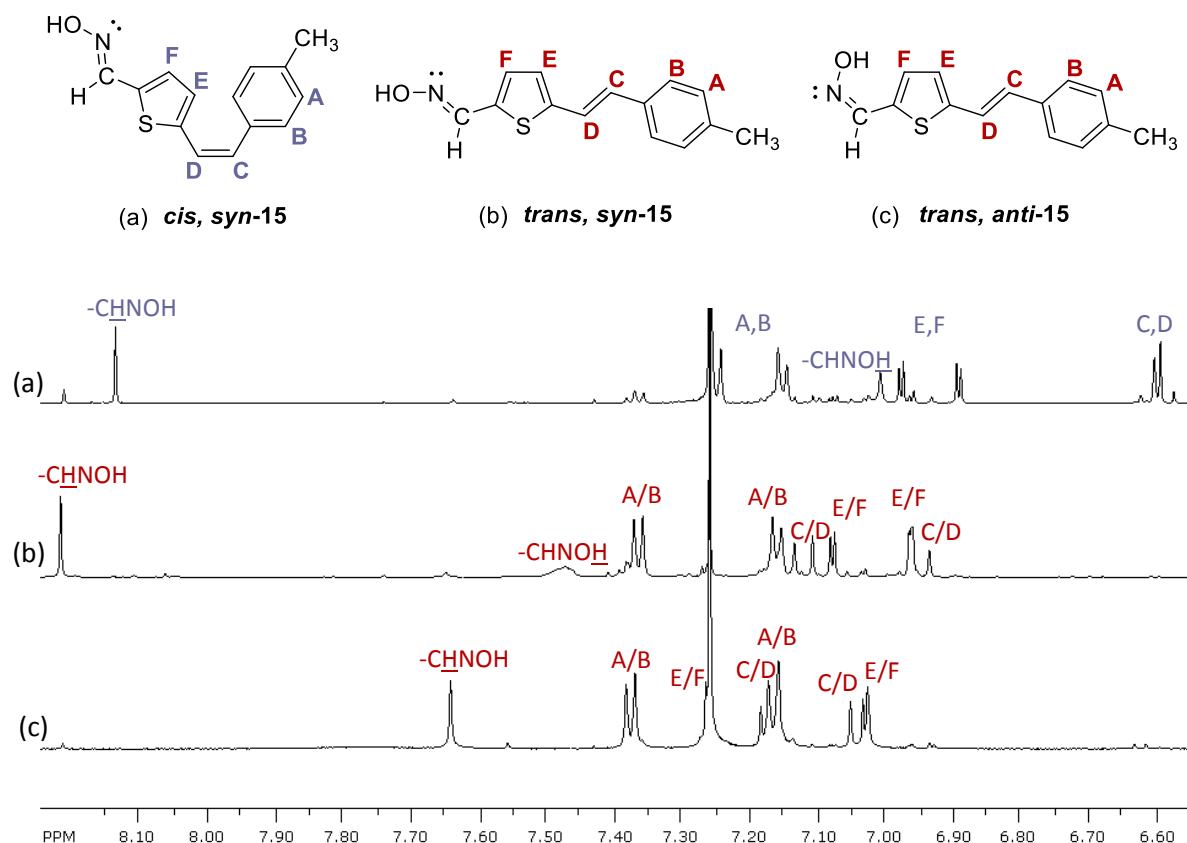
Svi izolirani oksimski derivati ili pripadajuće smjese izomera oksimskih derivata, kao i smjese izomera produkata dobivenih Wittigovom reakcijom i produkata formiliranja dani su na analizu masenom spektrometrijom.

3.3. Spektroskopska karakterizacija dobivenih spojeva 1 – 21



Slika 3.6. ¹H NMR spektri spojeva **1** (a), **8** (b), *syn*-**15** (c) kao smjesa izomera.

Na slici 3.6. uspoređeni su dijelovi ¹H NMR spektara dobivenih derivata s metilnom skupinom kao supstituentom u *para*- položaju benzenskog prstena heterostilbena, odnosno odgovarajućih derivata heterostilbena. ¹H NMR spektri predstavljaju smjesu *cis*- i *trans*- izomera dobivenih spojeva **1** (a), **8** (b) i *syn*-**15** (c). Potvrda formiliranja, odnosno sinteze aldehida **8**, iskazuje se singletima u očekivanom području za protone njegove funkcionalne skupine. Konkretno, radi se o dva singleta, od kojih jedan na 9,85 ppm, pripada spoju *trans*-**8**, a singlet na 9,79 ppm njegovom *cis*- izomeru. Temeljem omjera tih signala i usporedbom s omjerima signala protona dvostrukih veza, može se zaključiti da je prisutno više *trans*- izomera, u odnosu na količinu *cis*- izomera spoja **8**. U ¹H NMR spektru spoja *syn*-**15** vidljiva su također dva singleta, koji ukazuju na smjesu geometrijskih izomera ovog oksimskog derivata. Singletom na 8,22 ppm prikazuje se proton oksimske skupine spoja *trans, syn*-**15**, dok singlet manjeg intenziteta na 8,14 ppm proizlazi iz prisustva protona oksimske skupine spoja *cis, syn*-**15**. Opisani signali ukazuju na uspješnost provedbe pojedine reakcije i korisni su za utvrđivanje udjela pojedinog izomera u dobivenom produktu.

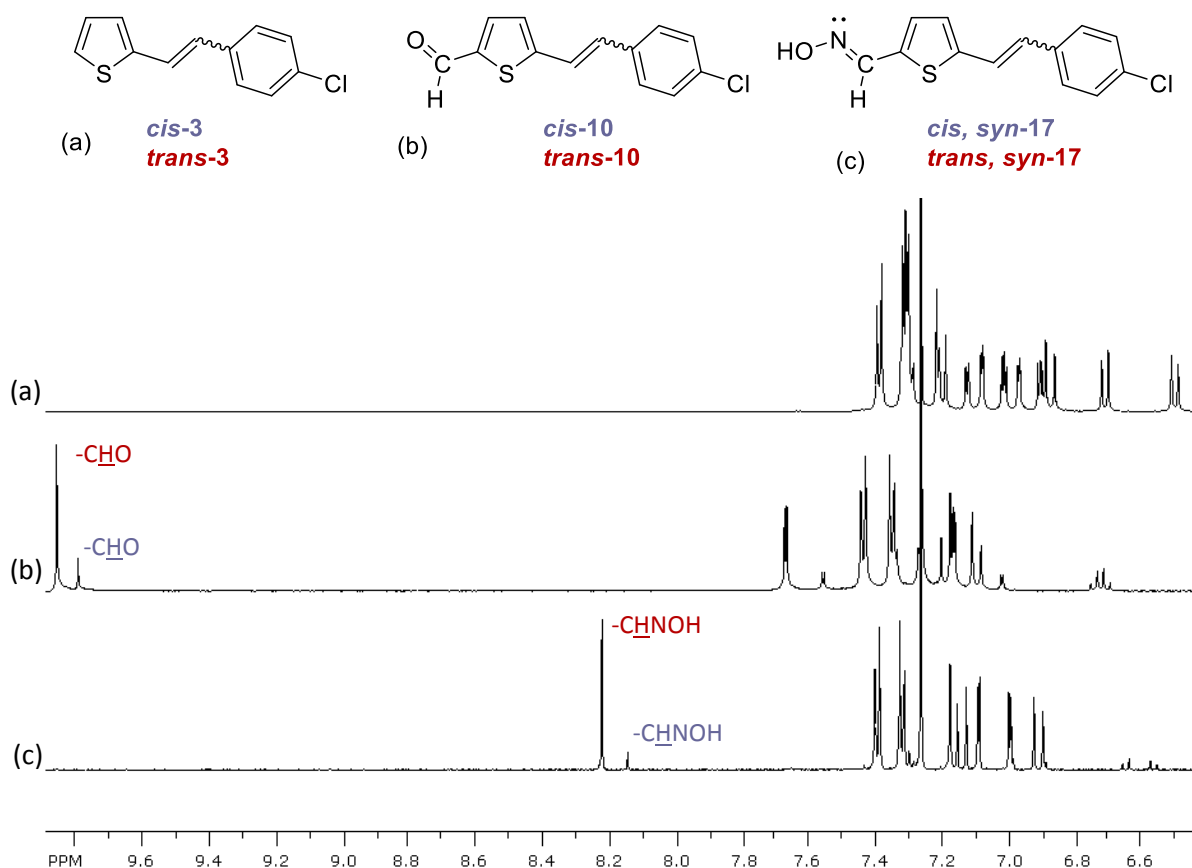


Slika 3.7. ^1H NMR spektri spojeva *cis, syn-15* (a), *trans, syn-15* (b) i *trans, anti-15* (c).

Iz smjese oksima *syn-15* uspješno je izdvojen *cis-* (a) i *trans-* izomer (b), te je njihov ^1H NMR spektar, odnosno područje u kojem se prikazuju aromatski protoni, protoni na dvostrukim vezama i proton funkcionalne skupine, međusobno uspoređen, te stavljen u odnos s istim područje ^1H NMR spektra spoja *trans, anti-15* (c) (slika 3.7.). U ovom području, za spoj *cis, syn-15*, vidljivi su signali kojima se prikazuju protoni na dvostrukoj vezi **C** i **D**, dubleti na 6,58 i 6,61 ppm i međusobno sprežu konstantom sprege od 12,3 Hz, koja je karakteristična za etenske protone *cis-* izomera. Protoni koji se nalaze na tiofenskom prstenu, protoni **E** i **F**, prikazuju se kao dubleti na 6,89 i 6,98 ppm, te je njihova konstanta sprege 3,6 ppm. Također, vidljiv je i široki singlet vodika $-\text{OH}$ skupine vezane za dušik na 7,0 ppm. Protoni *para-* supstituranog benzenskog prstena **A** i **B** prikazuju se kao dva dubleta sa integralima 2H na 7,15 i 7,25 ppm, sa karakterističnom konstantom sprege od 7,6 Hz. Karakterističan singlet protona oksimske skupine nalazi se na 8,14 ppm. U odnosu na protone spoja *cis, syn-15* (a), protoni spoja *trans, syn-15* manje su zasjenjeni, te se u pravilu svi nalaze na višem kemijskom pomaku. Ovdje se singlet protona oksimske skupine nalazi na 8,22 ppm. Aromatski protoni **A** i **B** također se prikazuju kao dva dubleta sa integralom 2H na kemijskom pomaku 7,16 i 7,36 ppm sa konstantom sprege od 7,9 Hz. Dubleti protona **E** i **F**, tiofenskog prstena, nalaze se na 6,96 i

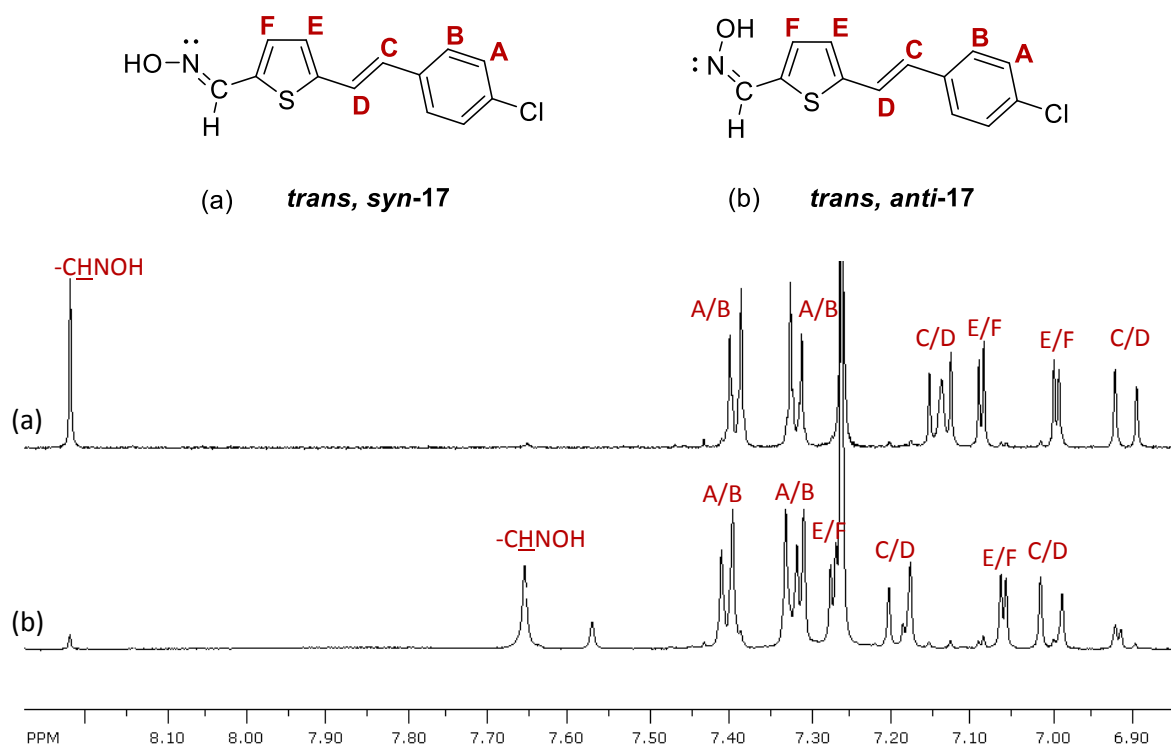
7,08 ppm sa konstantom sprege 3,5 Hz. Isto tako, konstanta sprege protona dvostruke veze **C** i **D** karakteristična je za *trans*- izomer i iznosi 15,9 Hz. U ^1H NMR spektru spoja *trans, anti*-**15** najznačajniji pomak signala vidljiv je za signal protona oksimske skupine koji se ovdje nalazi na 7,64 ppm, dok se ostali protoni prikazuju na relativno sličnim kemijskim pomacima kao i kod spoja *trans, syn*-**15**. Signal oksimske skupine ovdje se nalazi na znatno nižem pomaku od signala istog protona *syn*- oksima, što je upravo pokazatelj nastanka *anti*- izomera oksima. Konkretno radi se o spoju *trans, anti*-**15**, što zaključujemo na temelju konstante sprege protona na dvostrukoj vezi, **C** i **D**, koja iznosi 16,0 Hz.

Na slici 3.8. prikazani su ^1H NMR spektara početnog spoja, njegovog sintetiziranog aldehida i konačnog oksimskog derivata sa supstituiranim klorom u *para*- položaju benzenskog prstena.



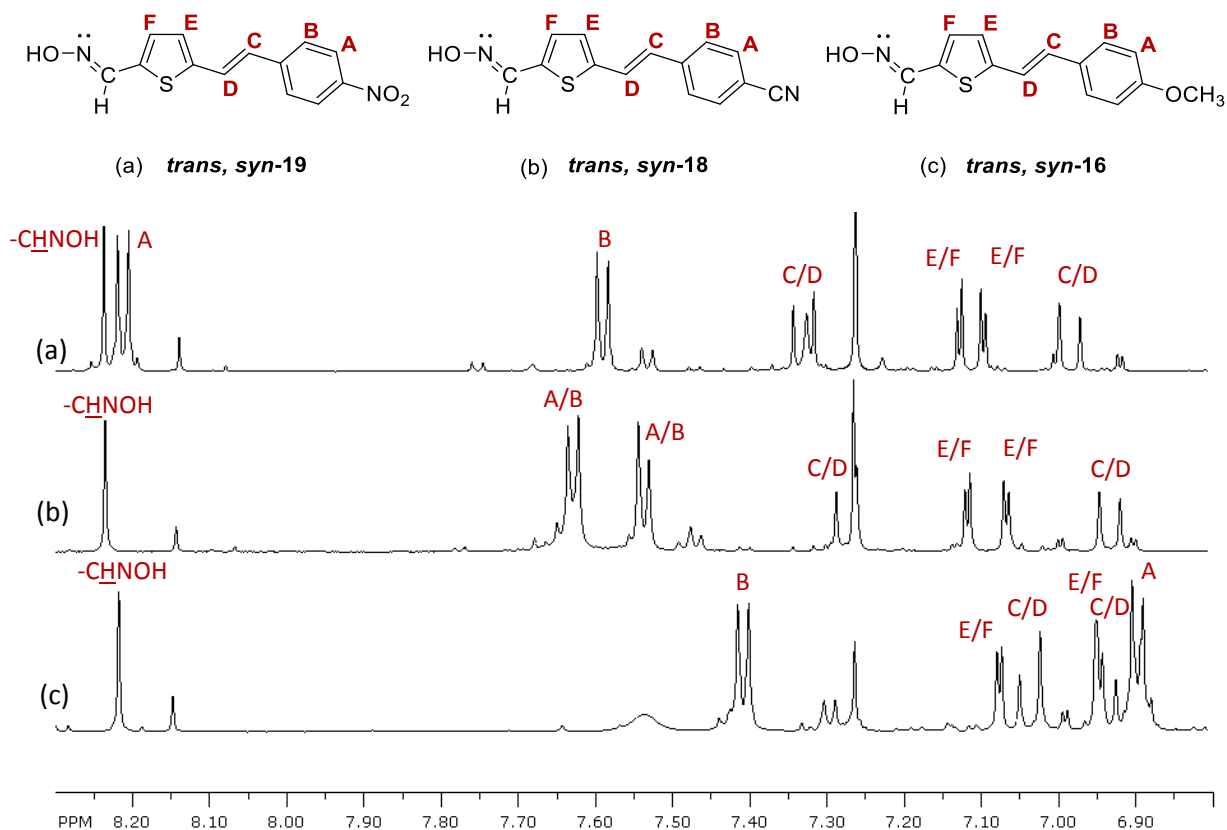
Slika 3.8. ^1H NMR spektri spojeva **3** (a), **10** (b), *syn*-**17** (c).

Ovdje je također riječ o smjesi *cis*- i *trans*- izomera opisanih spojeva **3**, **10**, *syn*-**17**, te je vidljiva pojava karakterističnih signala protona za pojedinu funkcionalnu skupinu. Aldehidni protoni spojeva *trans*-**10** i *cis*-**10** vide se kao singleti na 9,87 i 9,80 ppm, a singlet protona oksimske skupine spojeva *trans, syn*-**17** i *cis, syn*-**17** nalazi se na 8,22 i 8,15 ppm.



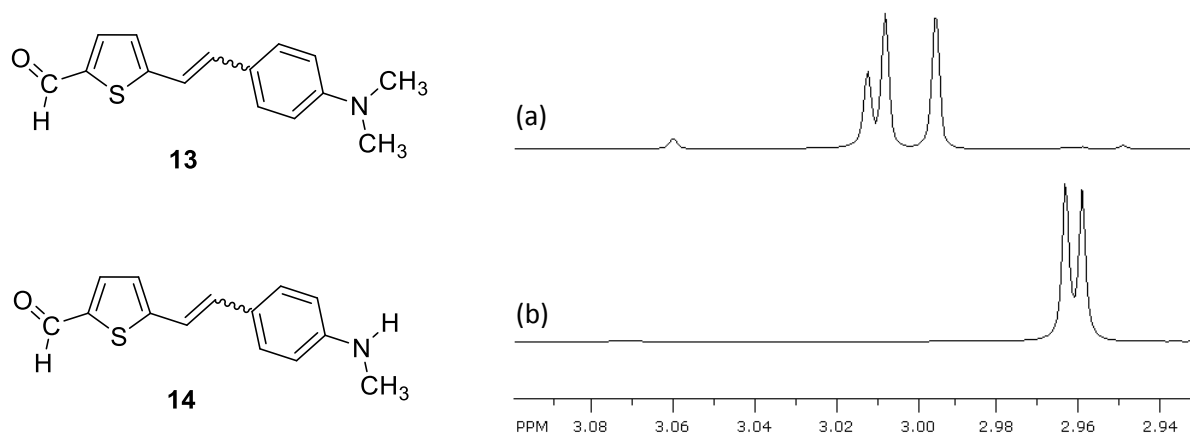
Slika 3.9. ^1H NMR spektri spojeva *trans, syn-17* (a) i *trans, anti-17* (b).

Iz smjese izomera spoja *syn-17* uspješno je izdvojen spoj *trans, syn-17*, čiji je ^1H NMR spektar na slici 3.9. uspoređen sa spojem *trans, anti-17*. Signali aromatskih protona **A** i **B** uspoređenih spojeva nalaze se na približno jednakom kemijskom pomaku. Protoni tiofenskog prstena **E** i **F**, kao i etenski protoni **C** i **D** spoja *trans, anti-17*, manje su zasijenjeni, pa su njihovi signali u ^1H NMR spektru pomaknuti prema većim kemijskim pomacima, u odnosu na signale istih protona spoja *trans, syn-17*. Također, zbog različite orijentacije elektronskog para dušika, proton unutar oksimske skupine spoja *trans, anti-17* zasjenjeniji je, nego u slučaju spoja *trans, syn-17*, pa se njegov singlet nalazi na manjoj vrijednosti kemijskog pomaka.



Slika 3.10. ^1H NMR spektri spojeva *trans, syn-19* (a), *trans, syn-18* (b) i *trans, syn-16* (c).

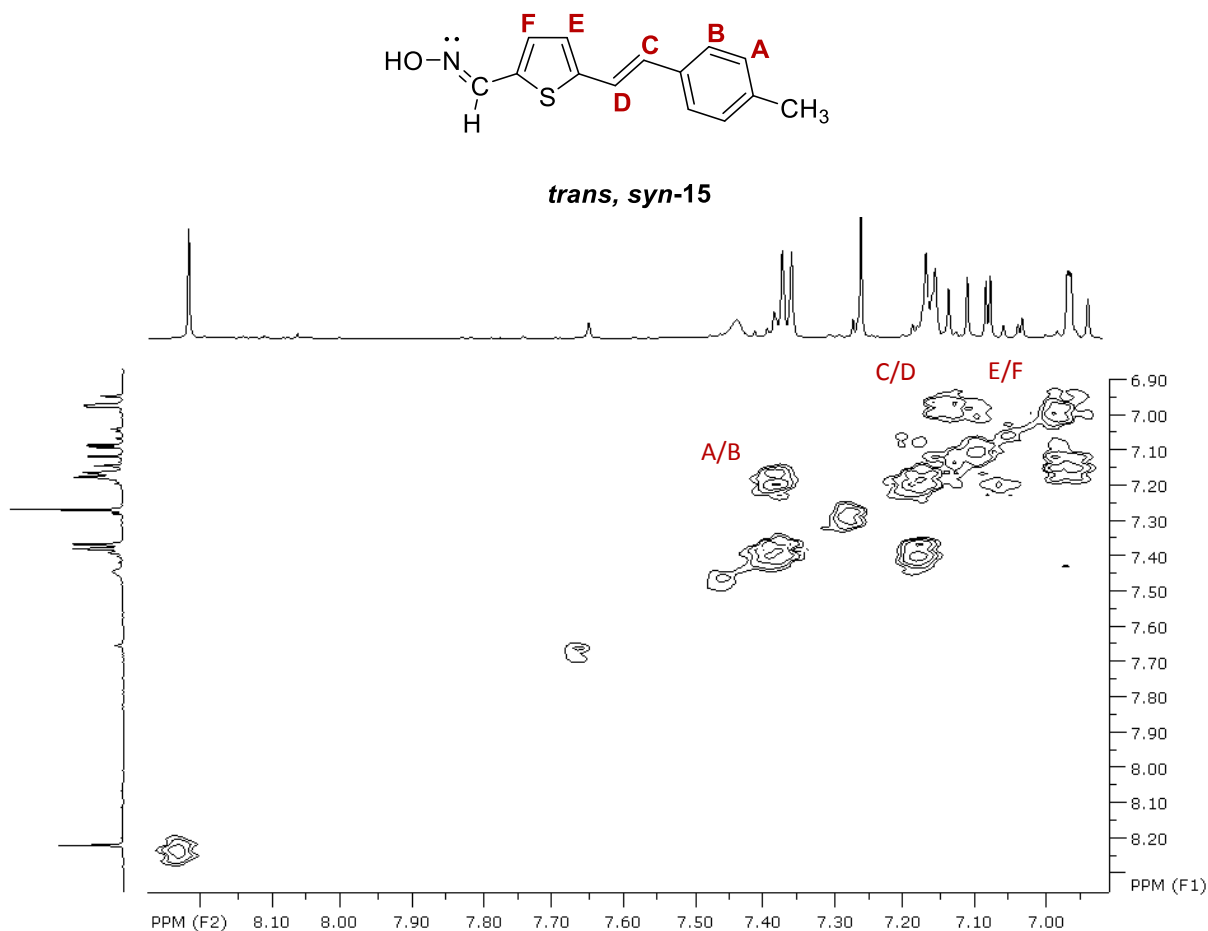
Provedene reakcije izvođene su s nizom različitih supstituenata vezanih u *para*- položaju benzenskog prstena, te je na slici 3.10. uspoređen utjecaj supstituenata na položaj signala aromatskih protona. Kod oksimskog derivata *trans, syn-18*, s vezanom cijano-skupinom na benzenskom prstenu, signali aromatskih vodika nalaze se u području kao i kod većine ostalih derivata, te su međusobno vrlo bliski. U slučaju spoja *trans, syn-19*, kada je benzenski prsten supstituiran nitro-skupinom, dublet aromatskih protona **A**, pomiče se prema nižem polju, odnosno nalazi se na većem kemijskom pomaku. Ovakav pomak signala u manje zasjenjeno područje posljedica je elektron-akceptorske prirode vezane nitro-skupine. S druge strane, kod spoja *trans, syn-16*, koji na benzenskom prstenu ima vezanu metoksi-skupinu, aromatski protoni **A** daju dublet na manjem kemijskom pomaku od ostalih sintetiziranih oksimskih derivata. Metoksi-skupina kao elektron-donorski supstituent u *para*- položaju benzenskog prstena djeluje na aromatske protone, zasjenjuje ih, te se njihov signal pomiče prema višem polju.



Slika 3.11. ^1H NMR spektri spojeva **13** i **14**.

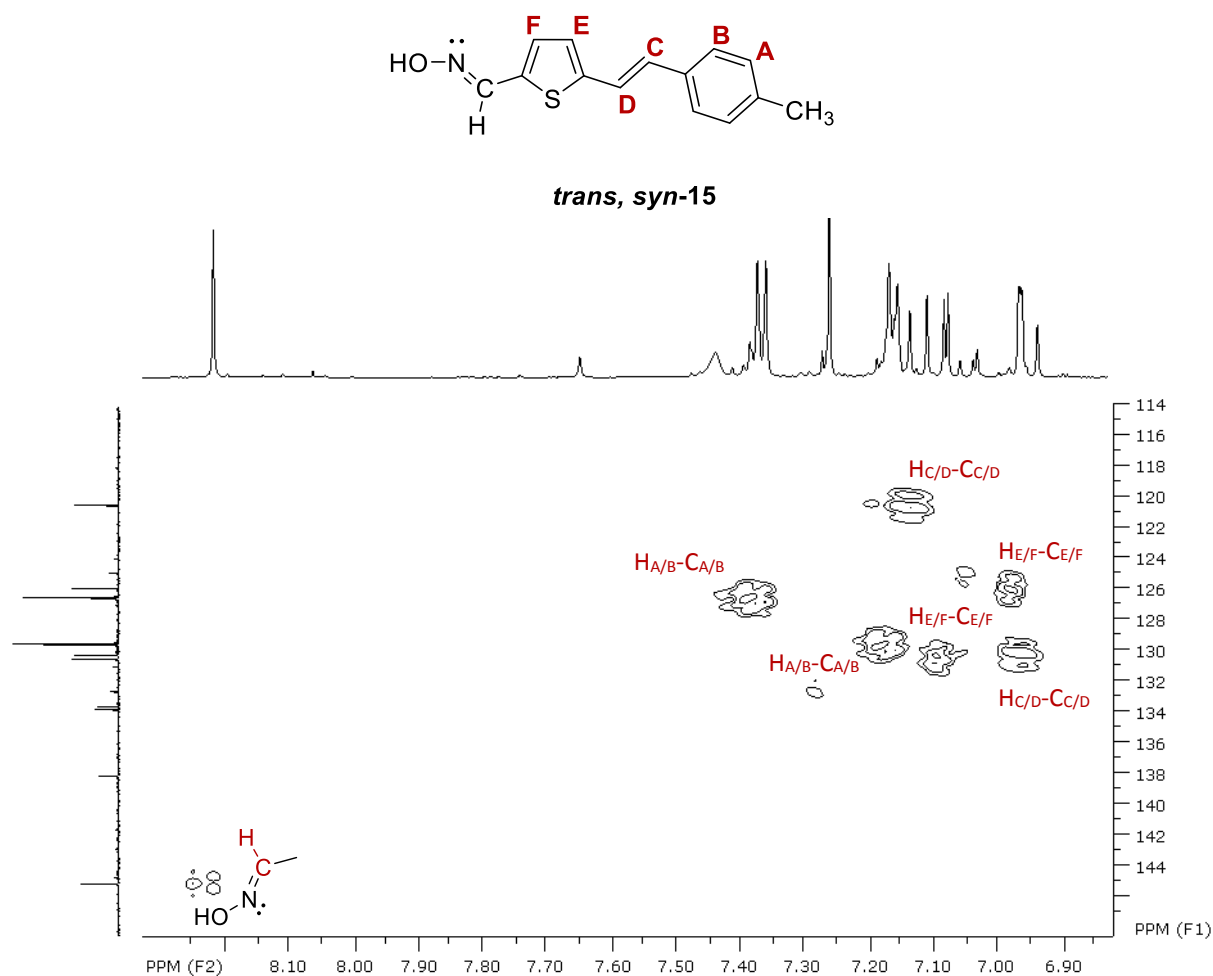
Upravo je ^1H NMR spektroskopskom analizom utvrđeno da je u reakcijama s ciljanom dimetil-amino skupinom u *para*- položaju benzenskog prstena heterostilbena i njegovih aldehydnih i oksimskih derivata, prisutna i monometil-amino skupina. Navedeno ukazuje na to da je početna kupovna kemikalija kod provedbe Wittigove reakcije sadržavala smjesu dimetil-amino- i monometil-amino-supstituiranog reagensa. U dijelu ^1H NMR spektra prikazanog na slici 3.11. pod (a), nalaze se dva singleta s integralima 6H i dublet integrala 3H, a u području prikazivanja aldehydnih protona, na istom ^1H NMR spektru vidljiva su dva singleta i jedan singlet manjeg intenziteta. Iz toga možemo zaključiti da se radi o smjesi *cis*- i *trans*- izomera aldehyda s vezanom dimetil-aminoskupinom (**13**) i zaostalim jednim izomerom aldehyda s vezanom monometil-amino-skupinom (**14**). Također, ^1H NMR spektar spoja **14** (slika 3.11., (b)) sadrži dva singleta aldehydne skupine, a u prikazanom području nalazi se dublet metilne skupine oba geometrijska izomera, s konstantom sprege od 2,5 Hz. S obzirom da je reakcija dobivanja oksima provedena na uzorku koji većinski sadrži smjesu *cis*- i *trans*- izomera spoja **13**, ali i zaostali jedan izomer spoja **14**, kao produkt je dobivena smjesa izomera spojeva **20** i **21**.

Dvodimenzijskim NMR tehnikama COSY i HSQC anaizirani su izolirani oksimski derivati u čistom obliku *cis*, *syn*-**15**, *trans*, *syn*-**15** – **19** i *trans*, *anti*-**15** – **18**, te je na slikama 3.12. i 3.13. predstavljen snimljeni COSY i HSQC NMR spektar spoja *trans*, *syn*-**15**, kao primjer spoja iz skupine sintetiziranih derivata heterostilbena.



Slika 3.12. COSY spektar spoja *trans, syn-15*.

Dvodimenzijском NMR tehnikom COSY dobiven je uvid u homonuklearna skalarna sprežanja (^1H - ^1H sprege), odnosno sprežanja protona kroz dvije ili tri veze, za spoj *trans, syn-15*. Vidljiva su sprežanja između protona aromatske jezgre **A** i **B**, protona **C** i **D** na dvostrukoj vezi i protona **E** i **F** koji se nalaze na tiofenskom prstenu (slika 3.12.). Navedena sprežanja protona vidljiva su i u ostalim sintetiziranim oksimskim derivatima heterostilbena.



Slika 3.13. HSQC spektar spoja *trans, syn-15*.

Za precizniju asignaciju ugljikovih atoma iz ¹³C NMR spektara snimljenih spojeva i određivanje korelacije protona i ugljikovih atoma korištena je dvodimenzijaska NMR tehnika HSQC. Slika 3.13. prikazuje HSQC NMR spektar spoja *trans, syn-15* s označenim heteronuklearnim korelacijama, koje su prisutne i u ostalim sintetiziranim oksimskim derivatima.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom (Fluka 0,063-0,2 nm i Fluka 60 Å, tehnički). Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je upotrebom ploča obloženih silikagelom (0,2 mm, 60 F₂₅₄, Merck). Organski slojevi rutinski su osušeni bezvodnim MgSO₄, te upareni pomoću rotacijskog uparivača pod sniženim tlakom.

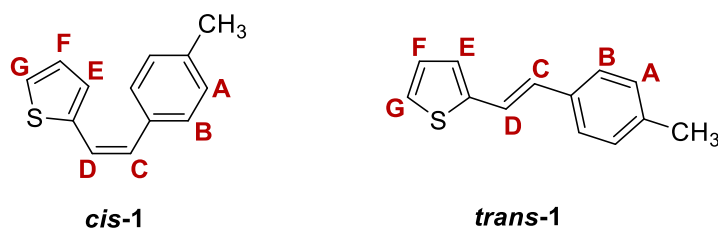
Za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće korištene su: nuklearna magnetska rezonancija (¹H i ¹³C NMR) i masena spektrometrija (MS). ¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV-600 koji radi na frekvenciji od 600 MHz za ¹H jezgre i frekvenciji od 150 MHz za ¹³C jezgre, na Institutu Ruđer Bošković. Svi NMR spektri snimani su u CDCl₃ kao otapalu, koristeći TMS kao unutarnji standard. Za asignaciju signala korištene su dodatne tehnike: 2D-CH korelacija (HSQC) i 2D-HH-COSY. Upotrijebljene su sljedeće kratice: s-singlet; d-dublet; t-triplet; q-kvartet; m-multiplet; dd-dublet dubleta i br-širok singlet. Maseni spektri su dobiveni na GC-MS sustavu. HRMS analiza provedena je na masenom spektrometru. UV spektri snimljeni su na UV/Vis spektrofotometru.

Početne fosfonijeve soli priređene su u laboratoriju, dok su ostali korišteni spojevi kupovne kemikalije.

4.2. Sinteza heterostilbena 1 – 7

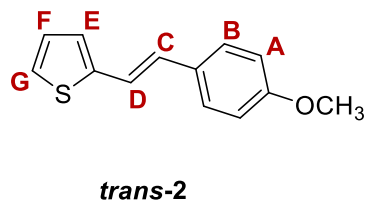
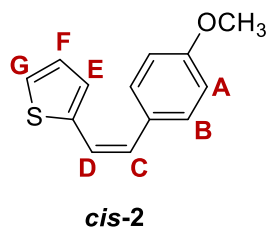
Heterostilbeni **1 – 7** pripravlja se Wittigovom reakcijom. Odgovarajuća fosfonijeva sol (11 mmol) otopi se u 130 mL EtOH, sušenog na 4 Å sitima, u trogroj tikvici. Dodaje se odgovarajući aldehid (10 mmol). Bitno je da sustav bude zatvoren, a sadržaj tikvice se miješa na magnetskoj miješalici i propuhuje dušikom. Reakcijska smjesa se grije na 40 °C, kroz 30 minuta. U lijevak za dokapavanje ulije se suhi EtOH (10 mL) kojem se dodaju manji komadići, izvagane količine Na (11 mmol). Nakon što sav Na izreagira, dobiveni NaOEt dokapava se u tikvicu. Po završetku dokapavanja, sustav se zatvara i reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici preko noći na sobnoj temperaturi. EtOH se uprava na rotacijskog uparivača pod sniženim tlakom. Zatim se provodi ekstrakcija u sustavu toluena i vode, nakon koje se organski sloj suši na MgSO₄, filtrira, te se otparava toluen. Suha reakcijska smjesa se pročišćava kolonskom kromatografijom na silikagelu korištenjem eluensa PE/E ili PE/DCM promjenjive polarnosti.

Time su dobivene smjese *cis*- i *trans*- izomera željenih produkata **1 - 7**, koji su korišteni kao reaktanti u reakcijama Vilsmeier-Haackog formiliranja.



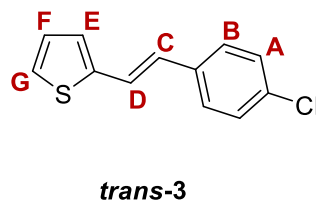
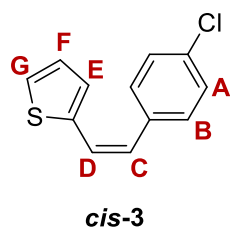
cis-2-(4-metilstiril)tiofen (cis-1): 183,33 mg (9,2%); R_f (petroleter) = 0,71; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7,14-7,21 (m, 4H, H_A, H_B), 7,09 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, H_{E/G}), 6,98 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H_{E/G}), 6,89 (dd, 1H, $J = 4,7; 3,6$ Hz, H_F), 6,66 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{C/D}), 6,54 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_{C/D}), 2,37 (s, 3H, -CH₃);

trans-2-(4-metilstiril)tiofen (trans-1): 366,67 mg (18,3%); R_f (petroleter) = 0,57; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7,37 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H_{A/B}), 7,26 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, H_{E/G}), 7,14-7,21 (m, 3H, H_{C/D}, H_{A/B}), 7,05 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H_{E/G}), 7,00 (dd, 1H, $J = 5,2; 3,6$ Hz, H_F), 6,91 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H_{C/D}), 2,36 (s, 3H, -CH₃);



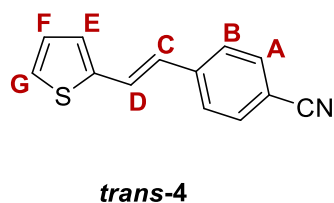
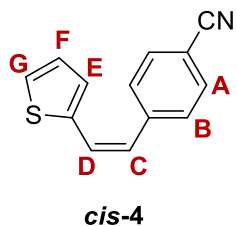
cis-2-(4-metoksistiril)tiofen (cis-2): 183 mg (8,5%); R_f (petroleter / dietil-eter (1%)) = 0,30; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,29 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,09 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,98 (dd, 1H, $J = 4,9; 3,6$ Hz, H_{F}), 6,98 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,87 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 6,63 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,51 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 3,83 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$)

trans-2-(4-metoksistiril)tiofen (trans-2): 366 mg (16,9%); R_f (petroleter / dietil-eter (1%)) = 0,23; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,40 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,15 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,10 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,02 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,01 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,89 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 6,88 (dd, 1H, $J = 4,9; 3,6$ Hz, H_{F}), 3,83 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$)



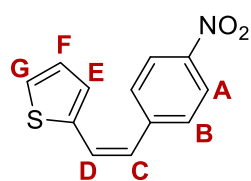
cis-2-(4-klorostiril)tiofen (cis-3): 360 mg (16,3%); R_f (petroleter) = 0,75; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,28-7,33 (m, 4H, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,12 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,97 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,90 (dd, 1H, $J = 5,0; 3,6$ Hz, H_{F}), 6,71 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,50 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);

trans-2-(4-klorostiril)tiofen (trans-3): 360 mg (16,3%); R_f (petroleter) = 0,65; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,39 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,28-7,33 (m, 2H, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,21 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,20 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,08 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,01 (dd, 1H, $J = 5,0; 3,4$ Hz, H_{F}), 6,87 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);

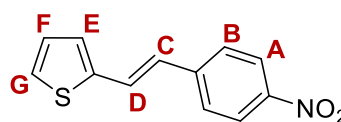


cis-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzonitril (cis-4): 757,33 mg (35,8%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,52; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,63 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,47 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,14 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,98 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,92 (dd, 1H, $J = 4,9; 3,6$ Hz, H_{F}), 6,79 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,52 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);

trans-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzonitril (trans-4): 533,33 mg (25,2%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,43; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,62 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,53 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,34 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,28 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,15 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,04 (dd, 1H, $J = 5,1; 3,5$ Hz, H_{F}), 6,90 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);



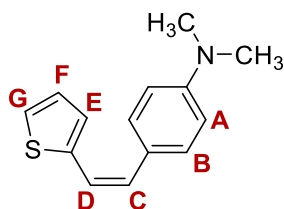
cis-5



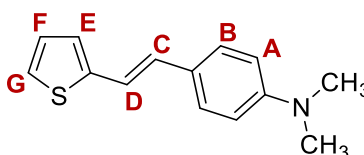
trans-5

cis-2-(4-nitrostiril)tiofen (cis-5): 529,88 mg (22,9%); R_f (petroleter / dietil-eter (15%)) = 0,63; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 8,19 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,53 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,17 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,99 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,99 (dd, 1H, $J = 5,2; 3,5$ Hz, H_{F}), 6,83 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,55 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);

trans-2-(4-nitrostiril)tiofen (trans-5): 528,56 mg (22,9%); R_f (petroleter / dietil-eter (15%)) = 0,51; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 8,21 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,58 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,39 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,30 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,18 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,05 (dd, 1H, $J = 5,2; 3,7$ Hz, H_{F}), 6,95 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);



cis-6



trans-6

cis-N,N-dimetil-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)anilin (cis-6): 318,18 mg (13,9%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,55; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,28 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,10 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 7,02 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/G}}$), 6,91 (dd, 1H, $J = 5,2; 3,6$ Hz, H_{F}),

6,69 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 6,54 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, $H_{C/D}$), 6,49 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, $H_{C/D}$), 2,98 (s, 6H, $-N(\underline{CH}_3)_2$);

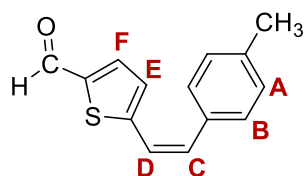
***trans*-*N,N*-dimetil-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)anilin (*trans*-6)**: 381,82 mg (16,7%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,47; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ /ppm: 7,37 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 7,12 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, $H_{E/G}$), 7,05 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, $H_{C/D}$), 6,99 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $H_{E/G}$), 6,98 (dd, 1H, $J = 4,7; 3,6$ Hz, H_F), 6,88 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, $H_{C/D}$), 6,71 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 2,99 (s, 6H, $-N(\underline{CH}_3)_2$);

4.3. Sinteza aldehida 8 – 14

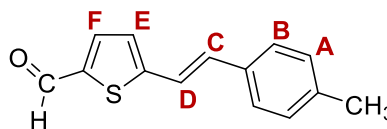
Dobiveni heterostilbeni, produkti Wittigove reakcije **1 - 7** podvrgnuti su Vilsmeier-Haackovom formiliranju.

Odabrani heterostilben otopi se u 2 ml DMF-a i miješa 10 minuta na temperaturi od 10°C. Ova temperatura se postiže korištenjem vodene kupelji s nekoliko kockica leda i prati termometrom. Kada se temperatura podigne za 1°C, kapaljkom se lagano dokapava izvagana količina $POCl_3$. Nakon 30 minuta uklanja se vodena kupelj i reakcijska smjesa se ostavlja da se miješa na sobnoj temperaturi. U reakcijama dobivanja spojeva **8 - 10**, reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 48 sati. No, reakcijska smjesa kod dobivanja spojeva **11 - 14** se nakon sat vremena miješanja na sobnoj temperaturi zagrijava. Razlog zagrijavanja i odabrana temperatura ovisi o supstituentu pojedinog derivata, pa se reakcijska smjesa dobivanja spojeva **11** i **12** zagrijava na 80°C, a reakcijska smjesa kod dobivanja spojeva **13** i **14** na 60°C. Zagrijavanje traje 3 sata, te se nakon toga reakcijska smjesa ostavlja 48 sati miješajući na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa se neutralizira korištenjem 10%-tnu otopinu NaOH. Bitno je prilikom dokapavanja otopine NaOH koristiti ledenu kupelj, a pH provjeravati uz pomoć lakmus papira kao indikatora pH vrijednosti reakcijske smjese. Kada je ostvarena neutralizacija, provodi se ekstrakcija u sustavu dietil-etera i vode. Sakupljeni organski sloj suši se na $MgSO_4$, filtrira, te se otparava dietil-eter na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Suha reakcijska smjesa se pročišćava kolonskom kromatografijom na silikagelu korištenjem eluensa PE/E ili PE/DCM promjenjive polarosti.

Time su dobivene smjese *cis*- i *trans*- izomera željenih produkata **8 - 14**, koji su korišteni kao reaktanti u reakcijama dobivanja oksima.



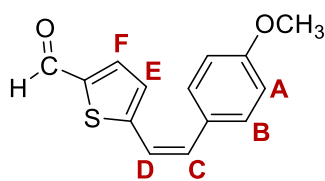
cis-8



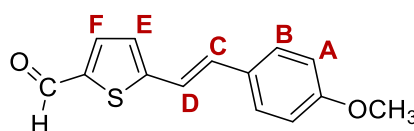
trans-8

cis-5-(4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid (cis-8): 75,08 mg (12,11%); R_f (petroleter / dietil-eter (10%)) = 0,41; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,79 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,36 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,18 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,18-7,12 (m, 3H, H_{E} , H_{F}), 6,65 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,54 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 2,36 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$)

trans-5-(4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid (trans-8): 150,19 mg (24,22%); R_f (petroleter / dietil-eter (10%)) = 0,27; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,85 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,66 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,40 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,16-7,12 (m, 1H, $\text{H}_{\text{C/D}}$) 7,15 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,13 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,90 (d, 1H, $J = 16,3$ Hz,), 2,37 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$)



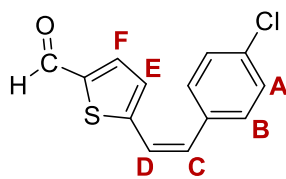
cis-9



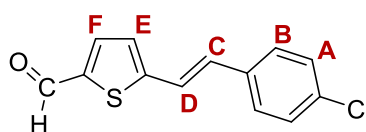
trans-9

cis-5-(4-metoksistiril)tiofen-2-karbaldehid (cis-9): 29,58 mg (4,8%); R_f (petroleter / dietil-eter (10%)) = 0,20; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,79 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,55 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,45 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,04 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,87 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 6,75 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,61 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 3,82 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$)

trans-5-(4-metoksistiril)tiofen-2-karbaldehid (trans-9): 118,34 mg (19,1%); R_f (petroleter / dietil-eter (10%)) = 0,15; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,83 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,65 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,45 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,11 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,10 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,07 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,91 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 3,84 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$)



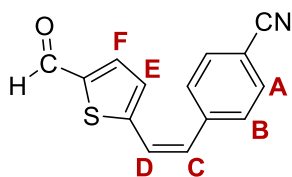
cis-10



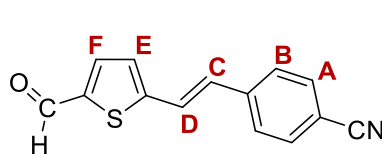
trans-10

cis-5-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid (cis-10): 31,33 mg (5,4%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,56; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,80 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,56 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,34 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,26 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,02 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,74 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,70 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)

trans-5-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid (trans-10): 153,67 mg (26,9%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,44; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,87 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,67 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,43 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,35 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,19 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,16 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,09 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)



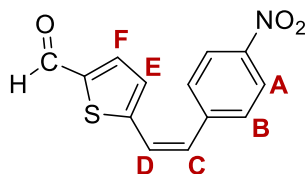
cis-11



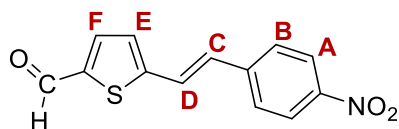
trans-11

cis-4-(2-(5-formiltiofen-2-il)vinil)benzonitril (cis-11): u tragovima; R_f (petroleter / diklormetan (50%)) = 0,17;

trans-4-(2-(5-formiltiofen-2-il)vinil)benzonitril (trans-11): 82 mg (29,4%); R_f (petroleter / diklormetan (50%)) = 0,16; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,90 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 7,70 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,67 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,59 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,32 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,23 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,12 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)



cis-12

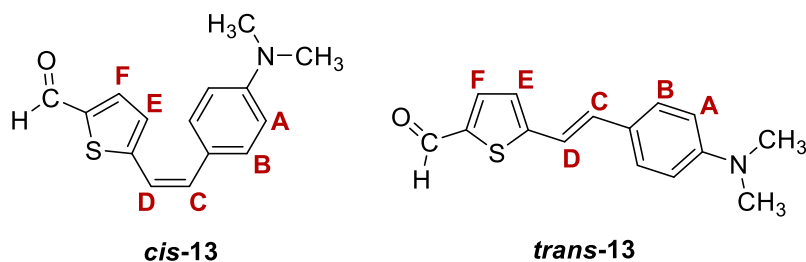


trans-12

cis-5-(4-nitrostiril)tiofen-2-karbaldehid (cis-12): 30 mg (9,02%) [smjesa sa *trans*-izomerom]; R_f (petroleter / dietil-eter (50%)) = 0,25; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,82 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 8,23 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,60 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,57 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,03 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,85 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,80 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)

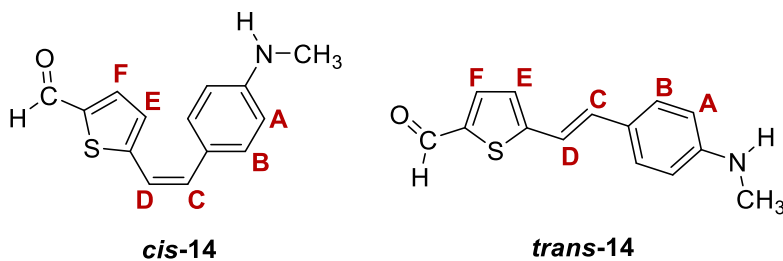
trans-5-(4-nitrostiril)tiofen-2-karbaldehid (trans-12): 30 mg (9,02%) [smjesa sa *cis*-izomerom]; R_f (petroleter / dietil-eter (50%)) = 0,20; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,91

(s, 1H, -CHO), 8,25 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 7,71 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $H_{E/F}$), 7,65 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 7,37 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $H_{C/D}$), 7,26 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $H_{E/F}$), 7,18 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $H_{C/D}$)



cis-5-(4-(dimetilamino)stiril)tiofen-2-karbaldehyd (cis-13): 71 mg (19,1%); R_f (diklormetan) = 0,51; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,63 (s, 1H, -CHO), 7,02 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, $H_{E/F}$), 6,70 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, $H_{E/F}$), 6,68 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, $H_{C/D}$), 6,66 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 6,55 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 6,49 (d, 1H, $J = 11,8$ Hz, $H_{C/D}$)

trans-5-(4-(dimetilamino)stiril)tiofen-2-karbaldehyd (trans-13): 71 mg (19,1%); R_f (diklormetan) = 0,44; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 9,80 (s, 1H, -CHO), 7,56 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $H_{E/F}$), 7,25 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 7,23 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $H_{A/B}$), 7,10 (d, 1H, $J = 16,5$ Hz, $H_{C/D}$), 7,09 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $H_{E/F}$), 7,00 (d, 1H, $J = 16,5$ Hz, $H_{C/D}$)



cis-5-(4-(metilamino)stiril)tiofen-2-karbaldehyd (cis-14): 51,7 mg (13,9%); R_f (diklormetan) = 0,62; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 10,15 (s, 1H, -CHO), 7,47 (dd, 1H, $J = 8,6; 2,4$ Hz, $H_{A/B}$), 7,11 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, $H_{E/F}$), 6,99 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $H_{E/F}$), 6,97 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 6,91 (dd, 1H, $J = 8,6; 3,6$ Hz, $H_{A/B}$), 6,66 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $H_{C/D}$), 6,48 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $H_{C/D}$), 2,96 (d, 3H, $J = 2,5$ Hz, -NHCH₃)

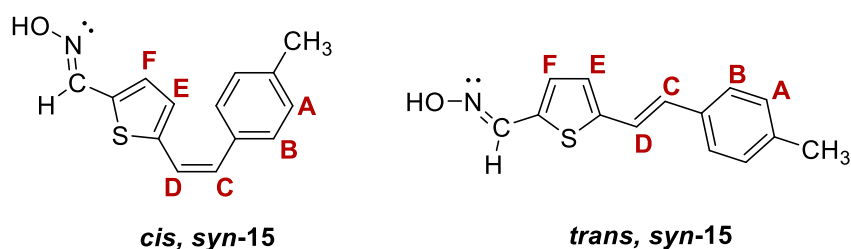
trans-5-(4-(metilamino)stiril)tiofen-2-karbaldehyd (trans-14): 51,7 mg (13,9%); R_f (diklormetan) = 0,62; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 10,22 (s, 1H, -CHO), 7,55 (dd, 1H, $J = 8,6; 2,4$ Hz, $H_{A/B}$), 7,18 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, $H_{E/F}$), 7,17 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $H_{C/D}$), 7,05 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, $H_{E/F}$), 7,02 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $H_{A/B}$), 7,00 (dd, 1H, $J = 8,5; 3,4$ Hz, $H_{A/B}$), 6,88 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $H_{C/D}$), 2,96 (d, 3H, $J = 2,5$ Hz, -NHCH₃)

4.4. Sinteza oksima 15 – 21

Dobiveni *cis*- i *trans*- izomeri aldehida, produkti Vilsmeier-Haackovog formiliranja **8** - **14** prevedeni su u oksime po uzoru na literaturnu proceduru⁹.

Kristali $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ otope se u pripremljenoj otopini sačinjenoj od 10 mL EtOH i 3 mL destilirane vode. Nakon što je dobivena homogena otopina navedenih komponenata, dodaje se odgovarajući prethodno pripremljeni aldehidni derivat heterostilbena. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na sobnoj temperaturi. Kada je reakcija završena, otapalo se uparava na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom. Suha reakcijska smjesa se pročišćava kolonskom kromatografijom na silikagelu korištenjem eluensa PE/DCM i DCM/MeOH promjenjive polarosti.

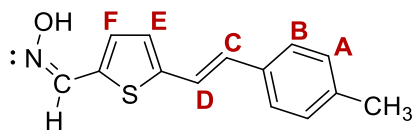
Time su izolirani željeni oksimski derivati heterostilbena **15** - **21**.



***cis, syn*-(1E)-5-(4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*cis, syn*-15):** 6 mg (2,5%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,33; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,14 (s, 1H, - $\text{CH}=\text{NOH}$), 7,25 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,15 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 6,98 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,89 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,61 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,58 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 2,17 (s, 3H, - CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 145,3 (d, - $\text{CH}=\text{NOH}$), 130,9 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 130,2 (s), 129,5 (s), 129,4 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 129,3 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 128,5 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 128,3 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 126,5 (s), 122,4 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 120,4 (s), 21,4 (q, - CH_3)

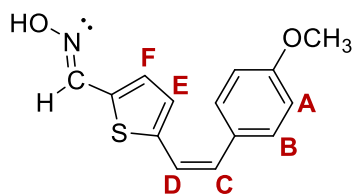
***trans, syn*-(1E)-5-(4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*trans, syn*-15):** 12 mg (5,0%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,33; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,22 (s, 1H, - $\text{CH}=\text{NOH}$), 7,47 (bs, 1H, =N-OH), 7,36 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,16 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,12 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,08 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,96 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz,

$H_{E/F}$), 6,94 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $H_{C/D}$), 2,36 (s, 3H, $-\underline{CH}_3$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm : 145,2 (d, $-\underline{CH}=\underline{NOH}$), 138,1 (s), 133,8 (s), 133,6 (s), 130,5 (d, $C_{E/F}$), 130,2 (d, $C_{C/D}$), 129,5 (2d, $C_{A/B}$), 126,5 (s), 126,4 (2d, $C_{A/B}$), 125,9 (d, $C_{E/F}$), 120,4 (d, $C_{C/D}$), 21,4 (q, $-\underline{CH}_3$)

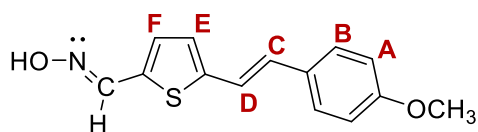


trans, anti-15

trans, anti-(1E)-5-(4-metilstiril)tiopen-2-karbalehid oksim (trans, anti-15): 95 mg (39,6%); R_f (petroleter / dietil-eter (30%)) = 0,20; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm : 7,64 (s, 1H, $-\underline{CH}=\underline{NOH}$), 7,38 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $H_{A/B}$), 7,17 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, $H_{C/D}$), 7,17 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $H_{A/B}$), 7,16 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, $H_{E/F}$), 7,04 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, $H_{C/D}$), 7,03 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, $H_{E/F}$), 2,36 (s, 3H, $-\underline{CH}_3$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm : 141,8 (d, $-\underline{CH}=\underline{NOH}$), 138,1 (s), 133,8 (s), 132,6 (d), 130,2 (d, $C_{C/D}$), 129,5 (2d, $C_{A/B}$), 128,9 (s), 126,5 (2d, $C_{A/B}$), 126,5 (s), 124,8 (s), 120,4 (d, $C_{C/D}$), 21,4 (q, $-\underline{CH}_3$)



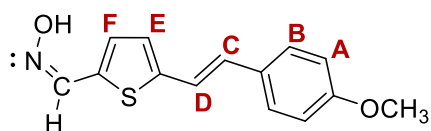
cis, syn-16



trans, syn-16

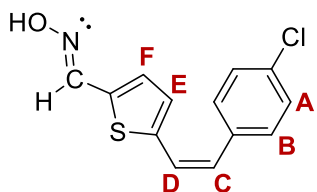
cis, syn-(1E)-5-(4-metoksistiril)tiopen-2-karbalehid oksim (cis, syn-16): 5 mg (3,2%); R_f (diklormetan) = 0,38; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm : 8,15 (s, 1H, $-\underline{CH}=\underline{NOH}$), 7,29 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 7,10 (bs, 1H, $=\underline{N}-\underline{OH}$), 6,98 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz, $H_{E/F}$), 6,90 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz, $H_{E/F}$), 6,88 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 6,58 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $H_{C/D}$), 6,55 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, $H_{C/D}$), 3,83 (s, 3H, $-\underline{CH}_3$);

trans, syn-(1E)-5-(4-metoksistiril)tiopen-2-karbalehid oksim (trans, syn-16): 13 mg (8,3%); R_f (diklormetan) = 0,38; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm : 8,22 (s, 1H, $-\underline{CH}=\underline{NOH}$), 7,54 (bs, 1H, $=\underline{N}-\underline{OH}$), 7,41 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 7,07 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, $H_{E/F}$), 7,04 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $H_{C/D}$), 6,94 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, $H_{E/F}$), 6,93 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $H_{C/D}$), 6,89 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $H_{A/B}$), 3,83 (s, 3H, $-\underline{CH}_3$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm : 145,2 (d, $-\underline{CH}=\underline{NOH}$), 133,3 (s), 130,7 (s), 130,4 (d, $C_{E/F}$), 129,9 (d, $C_{C/D}$), 129,4 (s), 127,8 (2d, $C_{A/B}$), 125,4 (d, $C_{E/F}$), 122,0 (s), 119,3 (d, $C_{C/D}$), 114,3 (2d, $C_{A/B}$), 55,2 (q, $-\underline{CH}_3$)

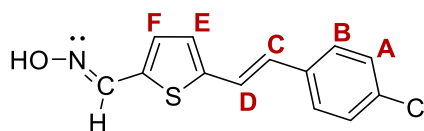


trans, anti-16

trans, anti-(1E)-5-(4-metoksistiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (trans, anti-16): 183 mg (116,6%); R_f (diklormetan) = 0,19; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,64 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,42 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,26 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,09 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,02 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,01 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,90 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 4,62 (bs, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 3,83 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 141,2 (d, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 132,1 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 129,4 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 127,4 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 124,0 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 118,8 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 113,8 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 54,9 (q, $-\text{CH}_3$)



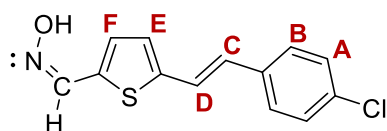
cis, syn-17



trans, syn-17

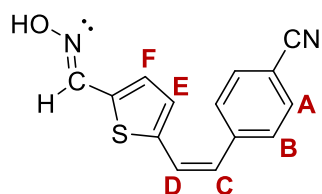
cis, syn-(1E)-5-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (cis, syn-17): 9 mg (4,6%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,58; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 8,15 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,32 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,29 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,14 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,89 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,64 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,56 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$);

trans, syn-(1E)-5-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (trans, syn-17): 30 mg (15,3%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 8,22 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,39 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,31 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,14 (bs, 1H, $=\text{N}-\text{OH}$), 7,14 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,09 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,99 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,91 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 145,2 (d, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 144,4 (s), 135,1 (s), 134,2 (s), 133,6 (s), 130,4 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 129,0 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 128,7 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 127,6 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 126,5 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 121,9 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$)

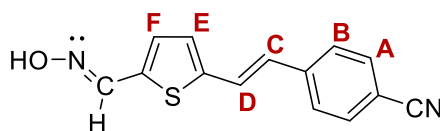


trans, anti-17

trans, anti-(1E)-5-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldhid oksim (trans, anti-17): 127 mg (64,6%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,20; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,66 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,40 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,32 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,27 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,19 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,06 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,00 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 141,6 (d, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 135,1 (s), 133,7 (s), 132,5 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 130,1 (s), 129,0 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 128,8 (s), 128,7 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 127,7 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 125,5 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 122,0 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$);



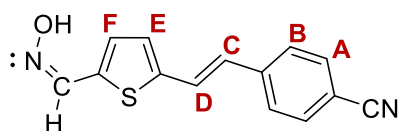
cis, syn-18



trans, syn-18

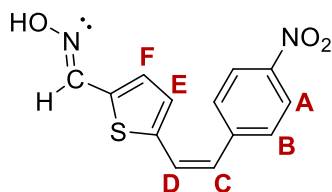
cis, syn-4-(2-(5-((E)-(hidroksiimino)metil)tiofen-2-il)vinil)benzonitril (cis, syn-18): 4 mg (3,5%); R_f (diklormetan / metanol (2,5%)) = 0,55; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,14 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,64 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,47 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,35 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 6,99 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,89 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,73 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,58 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)

trans, syn-4-(2-(5-((E)-(hidroksiimino)metil)tiofen-2-il)vinil)benzonitril (trans, syn-18): 18 mg (15,7%); R_f (diklormetan / metanol (2,5%)) = 0,55; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,23 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,62 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,53 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,43 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,27 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,11 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,06 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,93 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 144,9 (d, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 143,5 (s), 141,1 (s), 135,4 (s), 132,6 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 132,5 (s), 130,4 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 127,9 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 127,8 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 126,8 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 124,8 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 118,9 (s, $-\text{CN}$)

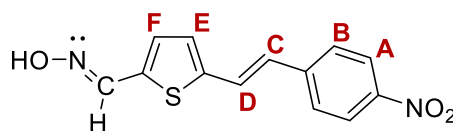


trans, anti-18

trans, anti-4-(2-(5-((E)-(hidroksiimino)metil)tiofen-2-il)vinil)benzonitril (trans, anti-18): 6 mg (5,2%); R_f (diklormetan / metanol (2,5%)) = 0,27; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,68 (s, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{NOH}$), 7,63 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,55 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,33 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,29 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,13 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,03 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 141,4 (d, $-\underline{\text{CH}}=\text{NOH}$), 141,1 (s), 132,7 (s), 132,6 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 132,5 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 129,6 (s), 127,8 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 127,2 (s), 126,8 (2d, $\text{C}_{\text{A/B}}$), 126,7 (d, $\text{C}_{\text{E/F}}$), 124,9 (d, $\text{C}_{\text{C/D}}$), 118,9 (s, $-\underline{\text{CN}}$);



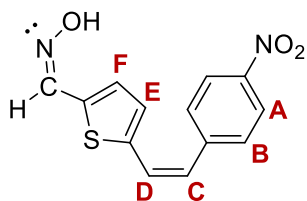
cis, syn-19



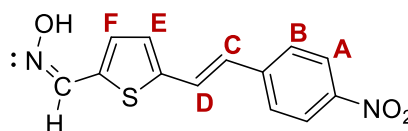
trans, syn-19

cis, syn-(1E)-5-(4-nitrostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (cis, syn-19): 10 mg (9,1%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,27; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,21 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 8,14 (s, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{NOH}$), 7,53 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,22 (bs, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{NOH}$), 7,00 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,92 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,78 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,62 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)

trans, syn-(1E)-5-(4-nitrostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (trans, syn-19): 20 mg (18,2%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,27; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,24 (s, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{NOH}$), 8,21 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,59 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,33 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,32 (bs, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{NOH}$), 7,13 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,10 (d, 1H, $J = 3,7$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,98 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)



cis, anti-19



trans, anti-19

cis, anti-(1E)-5-(4-nitrostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (cis, anti-19): 6,67 mg (8,3%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,45; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,20 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,58 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,54 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,19 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,94 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6,81 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 6,65 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)

trans, anti-(1E)-5-(4-nitrostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (trans, anti-19): 13,33 mg (16,6%); R_f (diklormetan / metanol (1%)) = 0,45; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,22 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,68 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{NOH}$), 7,60 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7,38 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$), 7,30 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,16 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7,08 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C/D}}$)

5. ZAKLJUČAK

Heterostilbeni **1 – 7**, s nizom vezanih supstituenata u *para*- položaju benzenskog prstena sintetizirani su Wittigovom reakcijom ključnom za formiranje dvostruke veze, kao osnove strukture početnih spojeva. Zatim je smjesa geometrijskih izomera spojeva **1 – 7**, Vilsmeier-Haackovim formiliranjem prevedena u aldehide **8 – 14**, koji su se koristili kao supstrat za dobivanje oksimskih derivata **15 – 21**, uz primjenu hidroksilamin-hidroklorida. Dobivena je smjesa izomera oksima, koji s obzirom na etensku skupinu mogu biti *cis*- ili *trans*-konfiguracije, a s obzirom na položaj elektronskog para dušika unutar oksimske skupine mogu biti *syn*- ili *anti*-, što u konačnici daje četiri moguća produkta. Većina izomera oksimskih derivata heterostilbena uspješno je izolirana. Za identifikaciju dobivenih produkata korištene su moderne spektroskopske metode, koje se koriste u organskoj kemiji, te su signali protona pojedine funkcionalne skupine bili pokazatelj uspješnosti provedene reakcije. Sintetizirani i okarakterizirani spojevi bit će korišteni za ispitivanje reaktivacije na humanim enzimima AChE i BChE. Izneseni rezultati, na temelju eksperimentalno dobivenih spojeva, mogu se iskoristiti za daljnje istraživanje i širenje spoznaja o biološkoj aktivnosti oksimskih derivata.

6. LITERATURA

1. Bosak, A., Katalinić, M., Kovarik, Z., *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **62**(2) (2011) 175–190.
2. Taylor, P., Radić, Z., *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **34** (1994) 281-320.
3. Stryer, L., Biokemija. Zagreb: Školska knjiga; 1991.
4. Katzung, B. G., Basic, and clinical pharmacology; The McGraw Hill Companies: Columbus, USA, 2001, pp. 75-91.
5. Barnard, E.A., In: *The Peripheral Nervous System*; Hubbard, J.I., Ed.; Plenum: New York, 1974; pp. 201-224.
6. Čolović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., Vasić, V. M., *Curr. Neuropharmacol.*, **11**(3) (2013) 315–335.
7. Giacobini, E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **920** (2000) 321-327.
8. Holas, O., Musilek, K., Pohanka, M., Kuca, K., *Expert Opin. Drug Disc.*, **7** (2012) 1207-1223.
9. Ribeiro, T. S., Prates, A., Alves, S. R., Oliveira-Silva, J. J., Riehlcand, C. A. S., Figueroa-Villar, J. D., *J. Braz. Chem.*, **23** (2012) 1216-1225.
10. Lockridge, O., Masson, P., *Neurotoxicology*, **21** (2000) 113-26.
11. Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., Lockridge, O., *Neuroscience*, **110** (2002) 627–639.
12. Kumar, V., In: *R. Becker, E. Giacobini (Eds.), Alzheimer Disease: Therapeutic Strategies*. Birkäuser, Boston, 1994, pp. 99–102.
13. Aldridge, W. N., Reiner, E., In: *Enzyme Inhibitors as Substrates*, Neuberger, A., Tatum, E.L., Eds., North-Holland Publishing Company: Amsterdam, (1972) pp. 170-175.
14. Yurumez, Y., Cemek, M., Yavuz, Y., Birdane, Y. O., Buyukokuroglu, M. E., *Biol. Pharm. Bull.*, **30** (2007) 490-494.
15. Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S., Fournier, D., *Protein Eng. Des. Sel.*, **15** (2002) 43-50.
16. Effects of organophosphorus insecticides on the nervous system. In: *Organophosphorus Insecticides: a General Introduction*; World Health Organization (WHO): Geneva, (1986) pp. 58-69.
17. Hayden, K. M., Norton, M. C., Darcey, D., Ostbye, T., Zandi, P. P., Breitner, J. C. S., Welsh-Bohmer, K. A., *Neurology*, **74** (2010) 1524-1530.
18. Costa, L. G., *Clin. Chim. Acta*, **366** (2006) 1-13.

19. Kneevi-Jugovi, Z. D., Enzimsko inženjerstvo; Tehnološko- metalurški fakultet: Beograd, (2008)
20. Zorbaz, T., Malinak, D., Kuca, K., Musilek, K., Kovarika, Z., *Chemico-Biological Interactions*, **307** (2019) 16-20.
21. Eyer, P., *Toxicol. Rev.*, **22** (2003) 165-190.
22. Bajgar, J., Fusek, J., Kuca, K., Bartosova, L., Jun, D., *Mini-Rev. Med. Chem.*, **7**(5) (2007) 461-466.
23. Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radić, Z., Taylor, P. et al., *Biochemistry*, **38** (1999) 9937–9947.
24. Kovarik, Z., Katalinić, M., Bosak, A., Šinko, G., *Current Bioactive Compounds*, **6** (2010) 9-15.
25. Childs, A. F., Davies, D. R., Green, A.L., Rutland, J. P., *Br. J. Pharmacol.*, **10** (1955) 462-465.
26. Wilson, I. B., Ginsburg, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **18** (1955) 168-170.
27. Poziomek, E. J., Hackley, B. E., Steinberg, G. M., *J. Org. Chem.*, **23** (1958) 714-717.
28. Lüttringhaus, A., Hagedorn, I., *Arzneim. Forsch/Drug Res.*, **14** (1964) 1-5.
29. Oldiges, H., Schoene, K., *Arch. Toxikol.*, **26** (1970) 293-305.
30. Dawson, R. M., *J. Appl. Toxicol.*, **14** (1994) 317-331.
31. Musilek, K., Holas, O., Horova, A., Pohanka, M., Zdarova-Karasova, J., Jun, D., Kuca, K., In: *Pesticides in the Modern World-Effects of Pesticides Exposure*; Stoytcheva, M., Ed.; InTech: Croatia, 2011; pp. 341-358.
32. Herkert, N. M., Freude, G., Kunz, U., Thiermann, H., Worek, F., *Toxicol. Lett.*, **209** (2012) 173-178.
33. Kovarik, Z., Radić, Z., Berman, H. A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P., *Biochemistry*, **43** (2004) 3222–3229.
34. Millard, C. B., Koellner, G., Ordentlich, A., Shafferman, A., Silman, I., Sussman, J. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 9883–9884.
35. Wong, L., Radić, Z., Brüggemann, R. J. M., Hosea, N., Berman, H. A., Taylor, P., *Biochemistry*, **39**(19) (2000) 5750–5757.
36. Kovarik, Z., Cibian, N., Radic, Z., Simeon-Rudolf, V., Taylor, P., *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **342** (2006) 973–978.
37. Kovarik, Z., Čalić, M., Šinko, G., Bosak, A., Berend, S., Lucić Vrdoljak, A., Radić, B., *Chem. Biol. Interact.*, **175** (2008) 173–179.
38. Ekström, F., Akfur, C., Tunemalm, A. K., Lundberg, S., *Biochemistry*, **45** (2006) 74–81.

39. Ekström, F., Pang, Y. P., Boman, M., Artursson, E., Akfur, C., Börjegen, S., *Biochem. Pharmacol.*, **72** (2006) 597–607.
40. Kovarik, Z., Kalisiak, J., Maček Hrvat, N., Katalinić, M., Zorbaz, T., Žunec, S., Green, C., Radić, Z., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P., *Chem. Eur. J.*, **25**(16) (2019) 4100–4114.
41. Kovarik, Z., Maček Hrvat, N., Kalisiak, J., Katalinić, M., Sit, R. K., Zorbaz, T., Radić, Z., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P., *Toxicol Appl Pharmacol.*, **372** (2019) 40-46.
42. Maček Hrvat, N., Kalisiak, J., Šinko, G., Radić, Z., Sharpless, K. B., Taylor, P., Kovarik, Z., *Toxicol Lett.*, **321** (2020) 83-89.
43. Zorbaz, T., Malinak, D., Maraković, N., Maček Hrvat, N., Zandona, A., Novotny, M., Skarka, A., Andrys, R., Benkova, M., Soukup, O., Katalinić, M., Kuca, K., Kovarik, Z., Musilek, K., *J. Med. Chem.*, **61** (2018) 10753–10766.
44. Taylor, P., Yan-Jye, S., Momper, J., Hou, W., Camacho-Hernandez, G. A., Radic, Z., Rosenberg, Y., Kovarik, Z., Sit, R., Sharpless, K. B., *Chemico-Biological Interactions* **308** (2019) 194–197.
45. Ripoll, D. R., Faerman, C. H., Axelson, P. H., Silman, I., Sussman, J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* **90** (1993) 5128–5132.
46. Sit, R., Kovarik, Z., Maček-Hrvat, N., Zunec, S., Green, C., Fokin, V. V., Radić, Z., Taylor, P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **367** (2018) 363–372.
47. Kovarik, Z., Maček, N., Sit, R. K., Radić, Z., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P., *Chem.-Biol. Interact.*, **203** (2013) 77–80.
48. Giacomini, K., Sugiyama, Y., Membrane transporters and drug response, Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, thirteenth ed., LL Brunton Ed, 2018, pp. 65–83.
49. Kovarik, Z., Maček Hrvat, N., *Neuropharmacology*, **171** (2020), 108111.
50. Šaguda, I., Maček Hrvat, N., Grgičević, A., Čadež, T., Hodaka, J., Dragojević, M., Lasić, K., Kovarik, Z., Škorić, I., *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, **35** (2020) 460–467.
51. Fu, W., Feng, Y., Fang, Z., Chen, Q., Tang, T., Yua, Q., Tang, T., *Chem. Commun.*, **52** (2016) 3115—3118.
52. Vasseur, A., Muzart, J., Le Bras, J., *Chem. Eur. J.*, **17** (2011) 12556 – 12560.
53. Vasseur, A., Harakat, D., Muzart, J., Le Brasa, J., *Adv. Synth. Catal.*, **355** (2013) 59 – 67.
54. Kumar, N., Kumar, J., Kumar Hota, P., *J Fluoresc.*, **27**(5) (2017), 1729-1728.

55. Kumar, N., Paramasivam, M., Kumar, J., Gusain, A., Kumar Hota, P., *Journal of Fluorescence*, **28** (2018), 1207–1216.
56. Robiette, R., Richardson, J., Aggarwal, V. K., Harvey, J. N., *Journal of the American Chemical Society*, **128** (2006) 2394–2409.
57. Porcheddu, A., Giacomelli, G., Synthesis of Oximes and Hydroxamic Acids, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., *The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids*, New York, John Wiley & Sons, (2009) 163-231.

ŽIVOTOPIS

Ivana Puček [REDACTED] Završila je osnovnoškolsko obrazovanje u OŠ Eugena Kvaternika u Velikoj Gorici, te započela svoje srednjoškolsko obrazovanje u Gimnaziji Velika Gorica, prirodoslovno-matematički smjer. Pohađala je Umjetničku školu „Franje Lučića“ gdje je završila osnovnu školu na puhačkom odjelu za instrument flauta, te započela srednju školu na smjeru za solo pjevanje. Godine 2015. po završetku gimnazije, upisala je preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu studija odradila je stručnu praksu u tvrtki PLIVA HRVATSKA d.o.o., u organizacijskoj jedinici R&D TAPI Pilot. Na trećoj godini preddiplomskog studija ostvarila je pravo na državnu stipendiju u STEM područjima znanosti. Završni rad radila je na Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić. Nakon završetka preddiplomskog studija 2018. godine upisala je diplomski studij na istom fakultetu, modul Primijenjena organska kemija, te na drugoj godini ostvarila pravo na stipendiju grada Velike Gorice.