

Novi 3-tienostilbenski oksimi - sinteza i spektroskopska karakterizacija

Ernečić, Amalija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:294639>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Amalija Ernečić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Amalija Ernečić

**NOVI 3-TIENOSTILBENSKI OKSIMI – SINTEZA I
SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Neposredni voditelj rada: Milena Mlakić, mag. appl. chem.

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

prof. dr. sc. Sandra Babić

Zagreb, rujan 2021.

SAŽETAK

Novi 3-tienostilbenski oksimi – sinteza i spektroskopska karakterizacija

S ciljem pronalaska novih potencijalnih reaktivatora enzima acetilkolinesteraze inhibiranog djelovanjem organofosfornih živčanih agenasa sintetizirani su novi derivati 3-tienostilbenskih oksima. Wittigovom reakcijom sintetizirani su *cis*- i *trans*-heterostilbeni iz 3-tienilnog aldehida i *p*-supstituiranih fosfonijevih soli kao polazne strukture s ciljem prevođenja u oksim. Tri odabrane soli kao supstituente na benzenskom prstenu sadržavale su metilnu skupinu, klor i cijano-skupinu. Heterostilbeni su funkcionalizirani Vilsmeierovim formiliranjem čime su dobiveni karbaldehidi. Karbaldehidi su u zadnjem sintetskom koraku prevedeni u oksime reakcijom oksimiranja uz hidroksilamin hidroklorid kao reagens. Ukupno je dobiveno i izolirano dvanaest oksima od kojih su četiri oksima s metilnim supstuentom i dva oksima s cijano-supstuentom dobiveni u dovoljnoj količini za biološka istraživanja reaktivacije enzima acetilkolinesteraze.

Svi međuprodukti i produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom, a strukture su im okarakterizirane i potvrđene ^1H i ^{13}C NMR spektrima.

Ključne riječi: heterostilbeni, oksimi, acetilkolinesteraza, Wittig, Vilsmeier, spektroskopija

SUMMARY

New 3-thienostilbene oximes - synthesis and spectroscopic characterization

In order to find new potential reactivators of the enzyme acetylcholinesterase inhibited by the organophosphorus nerve agents, new derivatives of 3-thienostilbene oximes were synthesized. Wittig reaction yielded *cis* and *trans* heterostilbene isomers that were synthesized from 3-thienyl aldehyde and *p*-substituted phosphonium salts as the starting structures with the aim of conversion to the oxime. The three selected salts contained methyl, chlorine and a cyano group as a substituent on the benzene ring. Heterostilbenes were functionalized by Vilsmeier formylation to give carbaldehydes. In the last synthetic step, the carbaldehydes were converted to oximes by an oximation reaction with hydroxylamine hydrochloride as a reagent. A total of twelve oximes were obtained and isolated of which four oximes with methyl substituent and two oximes with cyano substituent were obtained in sufficient quantity for biological studies of acetylcholinesterase enzyme reactivation.

All intermediates and products were purified by column chromatography and their structures were characterized and confirmed by ^1H and ^{13}C NMR spectra.

Key words: heterostilbenes, oximes, acetylcholinesterase, Wittig, Vilsmeier, spectroscopy

Zahvala

Ovaj završni 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 ukazanom povjerenju, savjetima, mogućnosti širenja moga znanja iz organske kemije i svoj pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Također puno zahvaljujem asistentici mag. appl. chem. Mileni Mlakić na pomoći, strpljenju, pristupačnosti i uvijek ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i podržavali me tijekom cijelog preddiplomskog studija.

I naravno na kraju zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji na podršci, motivaciji i vjeri u mene i moje znanje.

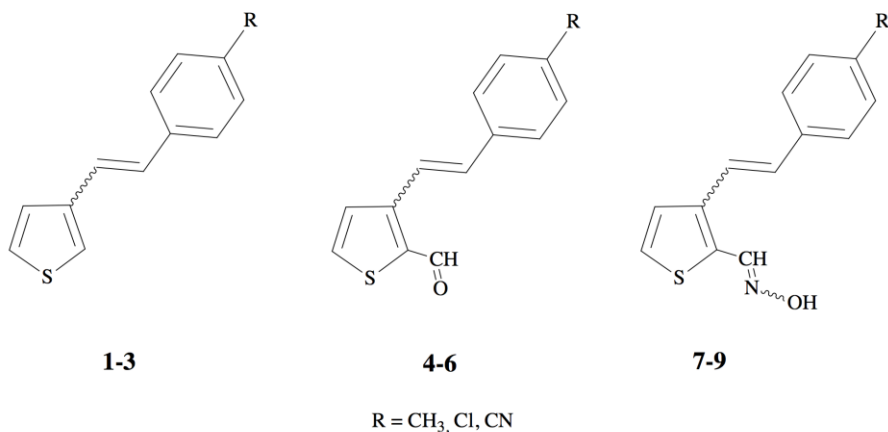
Hvala vam svima.

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. ORGANOFOSFORNI SPOJEVI (OP)	2
1.2. INHIBICIJA ACETILKOLINESTERAZE ORGANOFOSFORNIM ŽIVČANIM AGENSIMA	2
1.3. OKSIMI	3
1.4. KRVNO-MOŽDANA BARIJERA (BBB).....	4
1.5. STRATEGIJE ZA POBOLJŠANJE PROBIJANJA OKSIMA KROZ BBB	5
1.5.1. Razvoj novih strukturnih oksima	6
1.5.2. Razvoj nenabijenih oksima	9
1.5.3. Konjugacija oksima i lipofilnih spojeva.....	14
1.6. REAKTIVACIJA NAŠIH OKSIMA	15
2. REZULTATI I RASPRAVA	17
2.1. UVOD.....	17
2.2. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 1-3	19
2.3. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 4-6.....	25
2.4. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 7-9.....	29
3. EKSPERIMENTALNI DIO	38
3.1. OPĆE NAPOMENE.....	38
3.2. SINTEZA WITTIGOVIIH PRODUKATA 3-TIOFEN-STIRILA	39
3.2.1. Priprava Wittigova reagensa <i>p</i> -cijano fosfonijeve soli.....	41
3.3. SINTEZA VILSMEIEROVIIH PRODUKATA KARBALDEHIDA	42
3.4. SINTEZA OKSIMA.....	47
4. ZAKLJUČAK	53
5. LITERATURA.....	54
6. ŽIVOTOPIS.....	56

UVOD

Organofosforni spojevi poznati su nervni bojni otrovi često primijenjivani u ratnim sukobima i terorističkim napadima čija trovanja uglavnom rezultiraju teškom i bolnom smrću. Uzrok ovakvog ishoda je trenutno nepoznavanje lijeka koji bi dovoljno brzo i učinkovito mogao reaktivirati enzim acetilkolinesterazu inhibiranu organofosfornim spojevima u centralnom živčanom sustavu čime bi se zaustavio napadaj, a time najvjerojatnije izbjegao i smrtni ishod. Oksimi su spojevi poznati unazad nekoliko desetljeća po svojoj sposobnosti reaktivacije enzima acetilkolinesteraze. Trenutno je u primjeni nekoliko piridinijevih oksima koji su pokazali dobru sposobnost reaktivacije, no ne i najbolju sposobnost probijanja selektivne krvno-moždane barijere zato što se radi o nabijenim molekulama. Aktivno područje istraživanja upravo podrazumijeva pronalazak oksimskih struktura pojačane moći reaktivacije i poboljšane sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru tako što se istraživanja fokusiraju na osmišljavanje novih struktura oksima određenih karakteristika. Također, traga se i za univerzalnim oksimom koji bi imao sposobnost reaktivirati enzim nakon djelovanja nekoliko različitih organofosfornih spojeva. S tim ciljevima u sklopu ovog završnog rada sintetizirane su i spektroskopski okarakterizirane nove strukture 3-tienostilbenskih oksima s različitim supstituentima na benzenskom prstenu na kojima će se kasnije provesti i biološka ispitivanja.



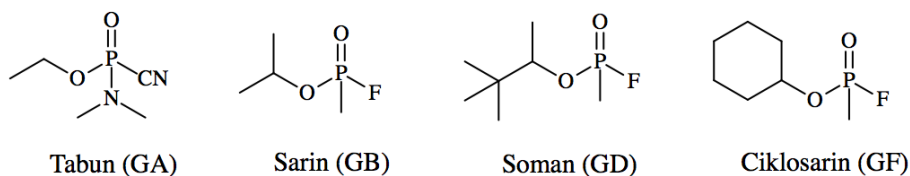
Cijela sinteza sastoji se od tri jednostavna sintetska koraka: Wittigove reakcije, Vilsmeierovog formiliranja i prevođenja u oksim. Glavnu strukturnu jedinicu ovih oksima čine heterostilbeni **1-3** koji sadrže tiofenski heterocikl. Heterostilbeni su u drugom sintetskom koraku prevedeni u aldehide **4-6** kako bi se iz karbonilne funkcionalne skupine lako mogla dobiti oksimska funkcionalna skupina ciljanih oksima **7-9**.

1. OPĆI DIO

1.1. ORGANOFOSFORNI SPOJEVI (OP)

Organofosforne spojevi, prvo primjenjivani kao pesticidi 30-ih godina prošlog stoljeća, a zatim razvijani kao bojni otrovi, visoko su toksični spojevi koji negativno utječu na centralni živčani sustav (CNS) već u jako malim dozama tako što gotovo ireverzibilno inhibiraju enzim acetilkolinesterazu (AChE). Inhibicija ovog enzima u centralnom živčanom sustavu može dovesti do napadaja koji, ako se na vrijeme ne zaustave, uzrokuju ozbiljna oštećenja mozga, a vrlo brzo i smrt.^{1,2}

G-serija i V-serija dvije su najpoznatije skupine organofosforne živčane agensa, a razvijali su ih njemački i ruski znanstvenici tijekom i nakon Drugog svjetskog rata. Ovi spojevi obično su opisani kao bistro tekućine i plinovi bez boje, okusa i mirisa koji imaju sposobnost lako prodrijeti kroz odjeću i kožu.³ Neki od poznatijih organofosforne spojeva G-serije, koji su čest uzrok trovanja, su tabun, sarin, soman i ciklosarin (slika 1).

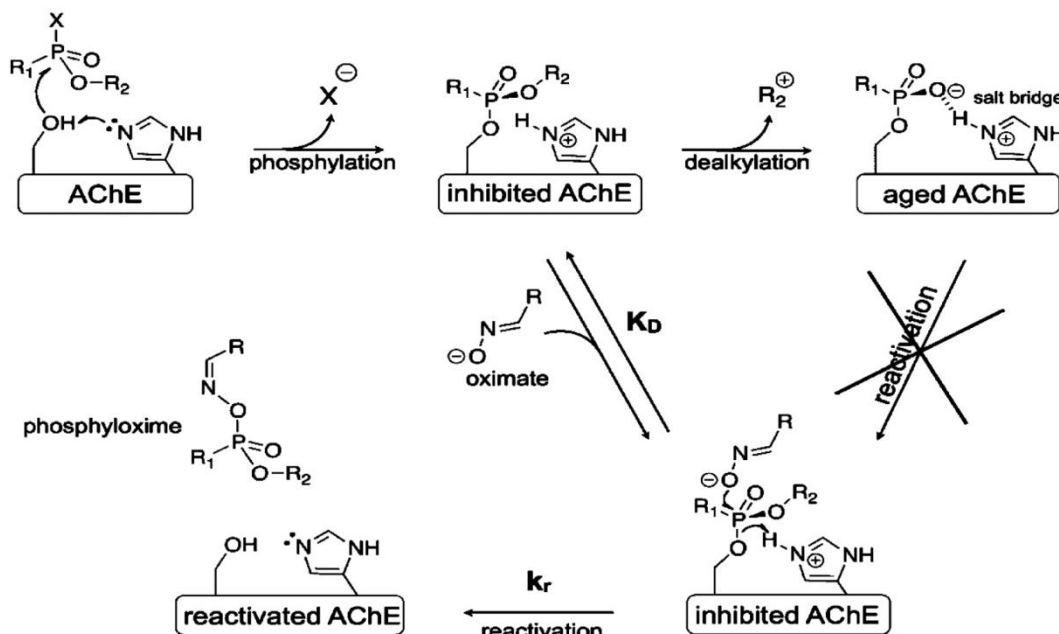


Slika 1. Strukture organofosforne nervne agensa G-serije.

1.2. INHIBICIJA ACETILKOLINESTERAZE ORGANOFOSFORNIM ŽIVČANIM AGENSIMA

Trovanje ovim živčanim agensima mijenja mehanizam djelovanja enzima acetilkolinesteraze tako što inhibira reakciju hidrolize acetilkolina u kolin i octenu kiselinu što dovodi do nakupljanja acetilkolina u sinapsama. Inhibicijsko djelovanje uključuje kemijske procese fosforilacije i dealkilacije (slika 2). Nakon reakcije fosforilacije postoji mogućnost reaktivacije inhibiranog enzima, no daljnjom reakcijom dealkilacije stvara se ostarjeli adukt

koji je u potpunosti nereaktivan i prema tome za njega još nisu otkriveni spojevi koji bi bili u mogućnosti reaktivirati ga.^{1,4}

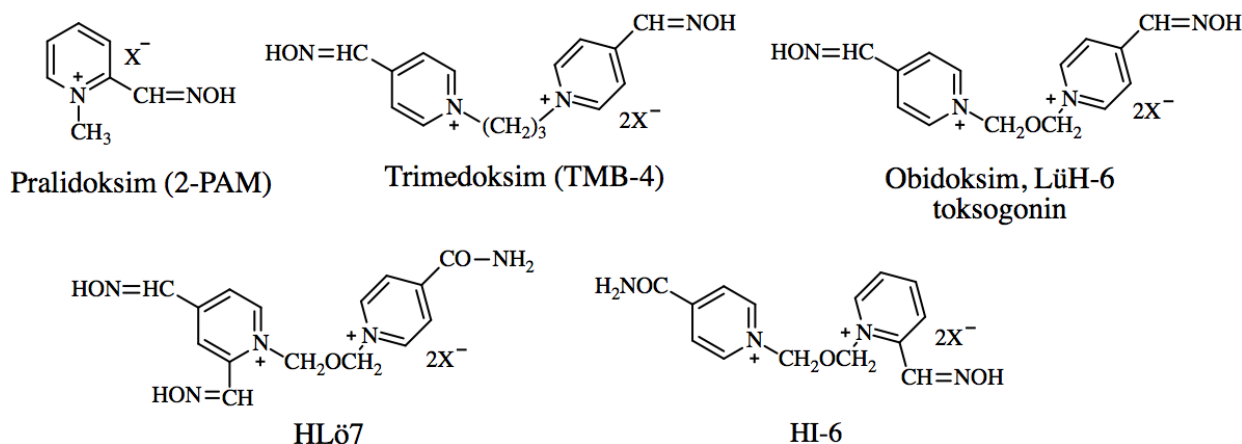


Slika 2. Mehanizam inhibicije acetilkolinesteraze organofosfornim spojevima i reaktivacije oksimima.⁵

Od svih akutnih trovanja godišnje čak 10% završi smrtnim slučajem što sve više potiče znanstvenike na sintezu i proučavanje spojeva koji bi se potencijalno koristili u liječenju nakon trovanja. Trenutno antidotalno liječenje sastoji se od primjene lijekova atropina i diazepamima u kombinaciji s nekim reaktivatorom koji obnavlja fiziološku funkciju enzima AChE.^{5,6} Kao dobri reaktivatori enzima upravo su se pokazali spojevi koji sadrže oksimsku funkcionalnu skupinu.

1.3. OKSIMI

Oksimski derivati upotrebljavaju se unazad nekoliko desetljeća kao protuotrovi u terapiji prilikom izlaganja organofosfornim otrovima. Trenutno odobrenu primjenu na ljudima ima ukupno pet piridinijevih oksima (slika 3) od kojih je tek 2-PAM jedini prihvaćen od strane FDA-a (Food and Drug Administration). Također, važno je napomenuti da trenutno ni jedan od primjenjivanih oksima nije u potpunosti sposoban zaštititi od svih organofosfornih živčanih otrova istodobno te je potraga za univerzalnim oksimom još u tijeku.^{7,8}



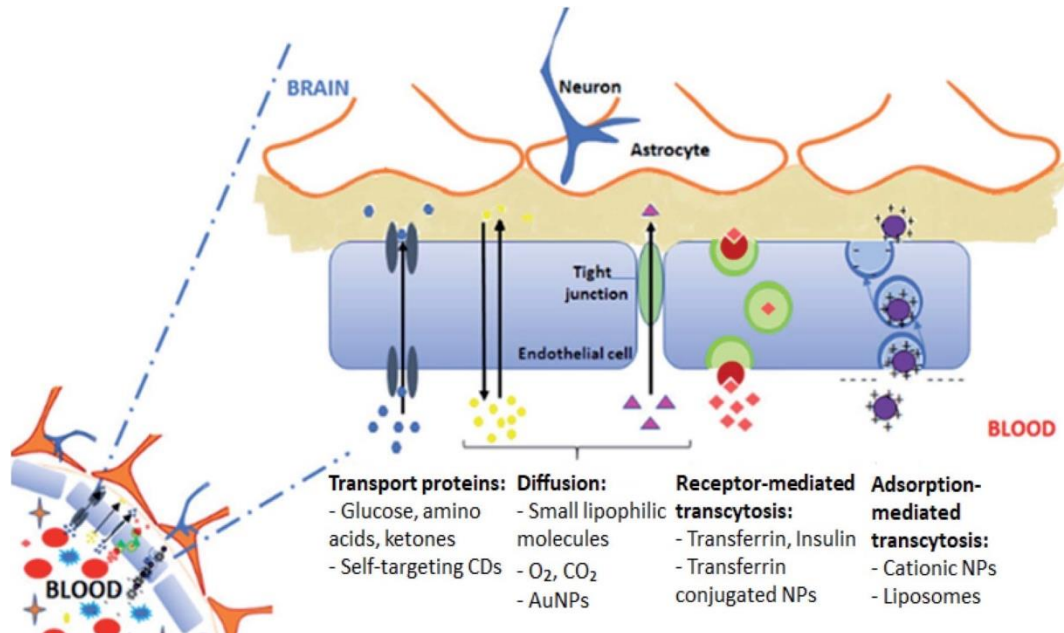
Slika 3. Strukture piridinijevih oksima koji se trenutno koriste u liječenju nakon trovanja organofosforim spojevima. X označava anion.

Zbog pokazanih dobrih djelotvornih svojstava pri poništavanju djelovanja živčanih bojnih otrova, molekule s oksimskom skupinom vrlo su raširena tema proučavanja među istraživačima kojima je cilj unaprijediti svojstva ovih molekula. Glavna problematika kod postojećih piridinijevih oksima je ta da su oni polarni organski spojevi s velikim negativnim lipofilnim vrijednostima i stoga svi teško probijaju krvno-moždanu barijeru (BBB). Prema tome nedavna istraživanja bave se upravo ovom problematikom bioraspodivnosti, tj. učinkovitosti oksima da prodru kroz tu barijeru, a što posljedično rezultira i s poboljšanjem potencije oksima za reaktivaciju samog enzima.¹

1.4. KRVNO-MOŽDANA BARIJERA (BBB)

Krvno-moždana barijera je vrlo selektivan, dinamičan, propustan membranski sustav zadužen za održavanje homeostaze regulacijom kemijske okoline, transporta imunoloških stanica i ulaska toksina u centralni živčani sustav (slika 4). Ovaj neurovaskularni filter omogućuje lak prolazak hranjivim tvarima do mozga kao što su kisik i glukoza dok istovremeno onemogućuje prolazak toksinima kao što su mikroorganizmi, virusi i kemikalije pod koje bi između ostalog trebali spadati i organofosfori spojevi.^{9,10} Međutim, organofosfori spojevi su male lipofilne molekule koje se lako mogu probiti kroz ovu barijeru mehanizmom slobodne difuzije.¹

Ova barijera je u nekim slučajevima preselektivna zato što sprečava ulazak većine lijekova iz krvi u mozak što stvara temeljni problem koji općenito usporava napredak u razvoju novih terapija za poremećaje mozga.^{11,12}



Slika 4. Krvno-moždana barijera.¹²

Ograničenja koja BBB nameće uključuje veličinu molekula, hidrofilitnost, polarnost, specifičnost supstrata i aktivni mehanizam efuzije, a upravo ta svojstva nedostaju većini poznatih oksima.¹³ Samo jedan od primjera je prolazak trenutno primjenjivanog monopiridinijevog oksima 2-PAM-a za reaktivaciju enzima u CNS-u kojeg od ukupno dozirane količine prolazi svega 10%.¹⁴ Posljedica slabog prolaska svih oksima kroz barijeru je onemogućeno efektivno reaktiviranje enzima acetilkolinesteraze.

1.5. STRATEGIJE ZA POBOLJŠANJE PROBIJANJA OKSIMA KROZ BBB

Razvoj novih struktura oksima s poboljšanim fizikalno-kemijskim svojstvima koji će lakše moći probiti krvno-moždanu barijeru i uz to biti dovoljno snažni reaktivatori enzima velik je izazov i trenutno područje istraživanja povezanih sa živčanim trovanjima.

Nedavnim istraživanjima različitih timova^{1,2,5,13,14,15} utvrđene su glavne fizikalno-kemijske karakteristike molekula koje koče probijanje lijeka kroz krvno-moždanu membranu i koje

stoga zahtijevaju optimizaciju. Prijedlozi optimizacije prolaska molekula kroz krvno-moždanu barijeru sažeti su u tri glavna pristupa direktno usmjerena na planiranje kemijskih struktura oksima:¹

- a) razvoj novih strukturnih oksima
- b) razvoj nenabijenih oksima
- c) konjugacija oksima i lipofilnih spojeva

Istovremeno u razvoju novih potencijalnih lijekova važno je uzeti u obzir te dobro ispitati i ADME-Tox svojstva novih oksima.

ADME-Tox skraćenica je za apsorpciju, distribuciju, metabolizam, ekskreciju i toksikologiju, a ova svojstva koraci su kojima se bavi farmakokinetika. ADME-Tox studijama utvrđuju se metabolizam i aktivnost kemijskog spoja, tj. lijeka u tijelu s ciljem procjene sigurnosti i toksičnosti. Ova ispitivanja mogu se provoditi *in vitro*, *in situ*, *in vivo* ili *in silico* tehnikama. Prikupljeni podaci govore je li lijek održiv i pruža li specifične ciljeve za buduća istraživanja i razvoj.¹⁶

Tradicionalno, ADME-Tox svojstva bila su predviđena na kraju otkrića lijeka, međutim napretkom *in silico* tehnika ona se mogu predvidjeti već i u ranoj fazi. Prednost ranog predviđanja je značajno smanjenje troškova na polju istraživanja lijekova jer ova svojstva mogu objasniti neuspjeh 60% molekula tijekom procesa razvoja lijeka.¹⁷

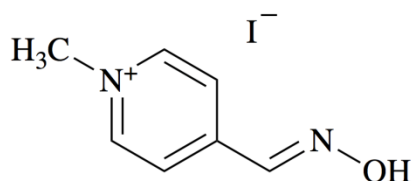
1.5.1. Razvoj novih strukturnih oksima

Ovaj pristup uglavnom je usmjeren na sinteze struktura koje i dalje većinom u sebi sadrže piridinski prsten s prisutnim pozitivnim nabojem na dušiku kao i trenutno prihvaćeni oksimi za liječenje. Biološkim ispitivanjima novo-sintetiziranih piridinijevih oksima htjelo se utvrditi kako strukturne karakteristike utječu na prolazak molekule kroz BBB.

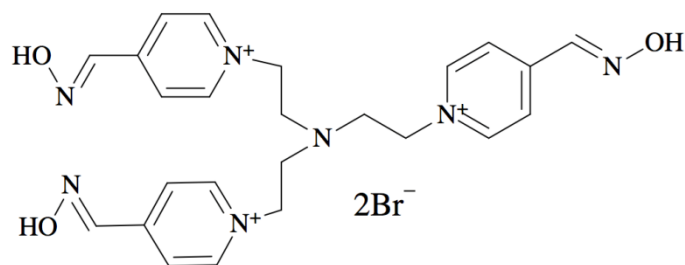
Tako je utvrđeno da monokvaterni oksimi postižu bolji prolazak kroz BBB od biskvaternih zato što imaju samo jedan nabijeni kvaterni dušik i manju molarnu masu. Također, spojevi kod kojih je oksimska skupina u *para*-položaju na piridinskom prstenu, spojevi manje molarne mase, spojevi s kraćim ugljikovodičnim lancem bez dodatno ugrađenih funkcionalnih skupina između dva piridinska prstena, *cis*-izomeri te spojevi s manjim brojem oksimskih funkcionalnih skupina bolje prolaze kroz BBB.¹⁵

Zaključeno je da se prilikom planiranja novih struktura oksima trebaju uzeti u obzir sljedeće strukturne karakteristike:

- 1) broj kvaternih amonijevih skupina (mono, bis ili trikvatarni oksimi)
- 2) položaj oksimske funkcionalne skupine (*ortho*, *meta*, *para*)
- 3) molarna masa spoja
- 4) duljina veze između dva piridinska prstena
- 5) *cis/trans* konfiguracija dvostruke veze spoja
- 6) vrsta supstituenta i položaj na piridinskom prstenu



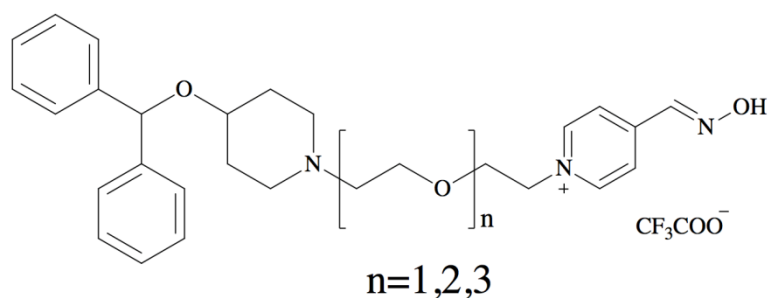
Slika 5. Primjer strukture oksima koja dobro probija BBB.



Slika 6. Primjer strukture oksima koja loše probija BBB.

No, i dalje prisutan pozitivan naboj u strukturama smanjuje lipofilnost oksima i stoga otežava prolazak kroz BBB. Sljedeći pokušaj optimiranja struktura uključivao je dodatak fenoksialkilog dijela u strukture koji se pokazao kao dosta dobar faktor za povećanje lipofilnosti.¹⁸

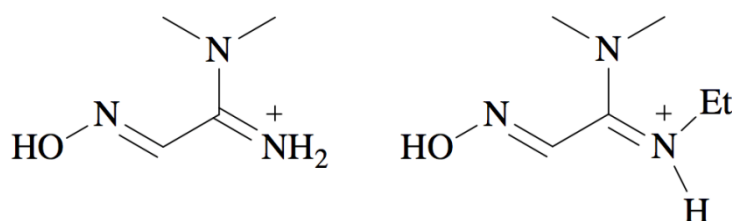
Osim sposobnosti probijanja kroz BBB, potrebno je uzeti u obzir i afinitet vezanja oksima prema aktivnoj strani enzima što je također direktno povezano s reaktivacijskom snagom enzima. Ovo svojstvo poboljšano je uvođenjem liganda perifernog mjesta (PSL) koji se kovalentno veže na oksim (slika 7).¹⁹ Ovakav koncept pokazao je jako dobre rezultate i stoga se sve češće može pronaći u novijim publikacijama.



Slika 7. Jedni od prvih oksima poboljšanog afiniteta prema enzimu koji sadrže ligand perifernog mjesta.

Sljedeći korak u razvoju struktura bila je sinteza i dizajn nove skupine nekvaternih amidinskih oksima koji su pokazali pojačanu sposobnost probijanja BBB. Amidinska skupina uvedena je u strukturu kao PSL (slika 8). Ova skupina često je korištena u lijekovima zbog ne-toksičnih svojstava i dobre topljivosti u vodi, a u ovom slučaju poželjna je i zato što predstavlja pseudo-pozitivan naboj u strukturi oksima koji je zapravo sličan piridinskom kvaternom dušiku čije je prisutstvo potrebno za učinkovito vezanje oksima za inhibirani enzim. Amidinski oksimi pokazali su sljedeći niz povoljnih svojstava: poboljšanu kemijsku stabilnost u usporedbi s 2-PAM-om, jako poboljšanu lipofilnost u usporedbi sa svim kvaternim oksimima, povećanu *in vitro* učinkovitost reaktivacije OP-inhibirane acetilkolinesteraze i značajnu zaštitu od *in vivo* toksičnih učinaka organofosfornih spojeva. *In vivo* istraživanja pokazala su da su ovi oksimi sposobni efektivno zaštititi protiv toksičnih OP-spojeva bez obzira koriste li se prije ili poslije izloženosti.²⁰

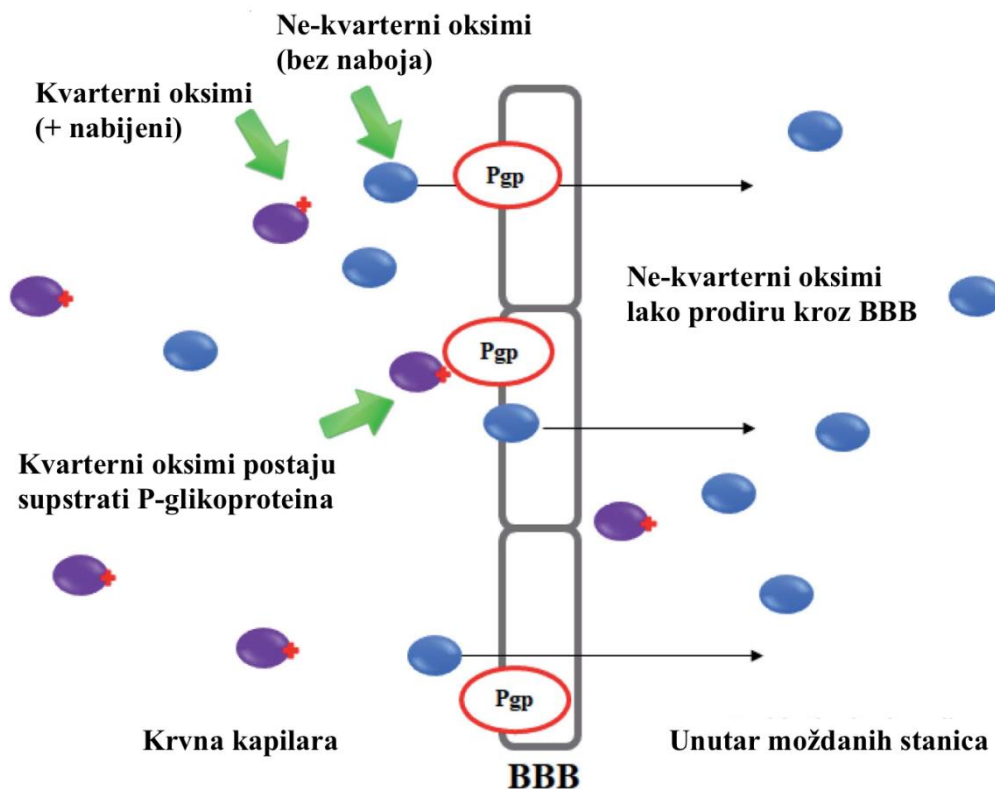
Ista istraživačka grupa nastavila se baviti razvojem novih nenabijenih cikličkih amidinskih oksima koji su također pokazali relativno poboljšanu snagu reaktivacije enzima. Dokazano je da razvoj ovih nenabijenih amidinskih oksima ne samo da poboljšava probijanje kroz BBB, već također povećava i afinitet vezanja oksima i inhibirane acetilkolinesteraze.²¹



Slika 8. Amidin-oksimske strukture.

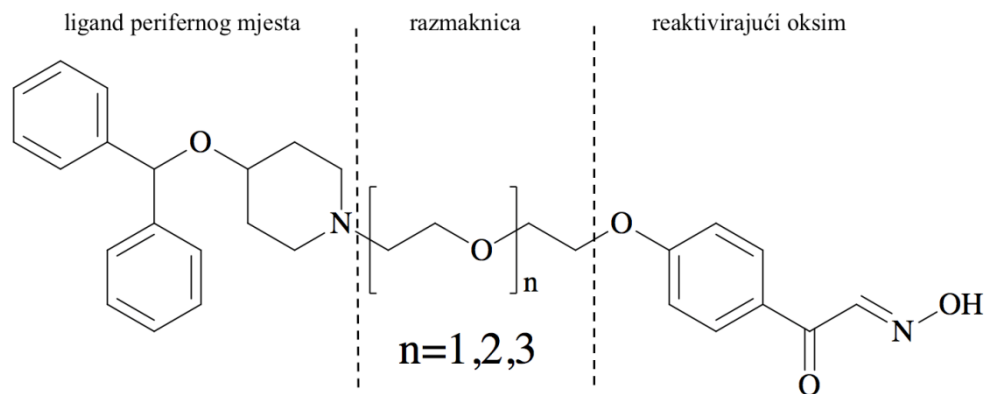
1.5.2. Razvoj nenabijenih oksima

Pristup koji se pokazao kao najviše obećavajući upravo je razvoj nenabijenih oksima. Trenutno primjenjivanim oksimima najveći je strukturni nedostatak taj što imaju stalno prisutan pozitivni naboj na dušiku. Nenabijeni oksimi obično su se pokazali puno boljim od nabijenih kada je riječ o probijanju BBB zbog povećane lipofilnosti.¹ Ali isto tako, izostanak pozitivnog naboja smanjuje afinitet oksima prema aktivnoj strani AChE.²² Ovdje zato dolazi do izražaja koncept s uvođenjem liganda perifernog mjesta u strukturu oksima kao kompenzacija pozitivno nabijenom dušiku kako bi se očuvao, ako ne i povećao afinitet prema enzimu.



Slika 9. Shematski prikaz prolaska nabijenih i nenabijenih oksima kroz BBB.¹

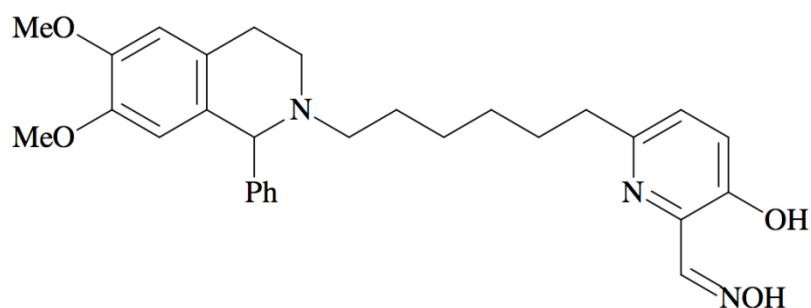
Ista istraživačka grupa, koja je prva razvila PSL koncept na nabijenim piridinijevim oksimima, tako je prva primijenila ovaj koncept i na nenabijenim piridinijevim oksimima koji su također pokazali poboljšani afinitet za enzim kao i snagu reaktivacije. Time su potaknuta mnoga istraživanja u području nenabijenih oksima.¹⁹



Slika 10. Jedni od prvih nenabijenih oksima s ligandom perifernog mjesta u strukturi.

Sljedeća velika promjena u istraživanjima novih struktura oksima bila je sinteza nenabijenih nekvaternih oksima koji u strukturi sadrže 3-hidroksi-2-piridinaldoksime uz različite PSL dijelove.

Prvi ovako dizajnirani spojevi pokazali su poboljšani afinitet vezanja između oksima i inhibirane AChE kao i izrazito pojačanu sposobnost reaktivacije. Najdojmljiviji napredak postignut je kod reaktivacije tabunom inhibirane AChE jer tabun glasi kao jedan od najjačih inhibitora koji uveliko otežava reaktivaciju. Istraživanja za prolazak kroz BBB još se trebaju provesti.²³

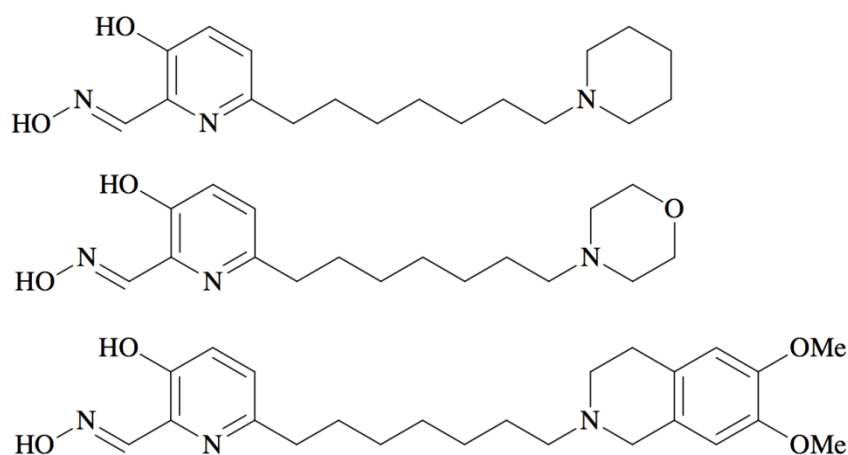


Slika 11. Strukture nekvaternih oksima koji sadrže 3-hidroksi-2-piridinaldoksimski dio.

Kako su se ovakve nove nekvaternne strukture pokazale vrlo obećavajućima, još dvije istraživačke skupine nastavile su se baviti 3-hidroksi-2-piridinaldoksima.^{2,24}

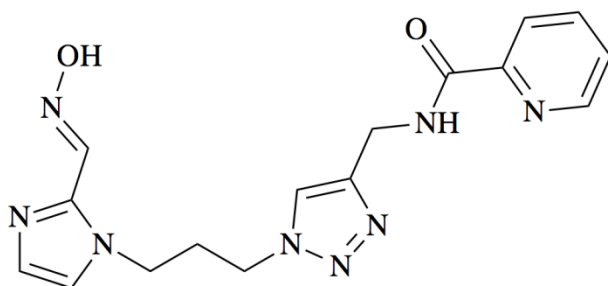
Prva istraživačka skupina sintetizirala je seriju od sedam novih oksima čije se strukture sastoje od dva dijela: α -nukleofila (3-hidroksi-2-piridinaldoksime) i različitih PSL koji su zajedno povezani pomoću ugljikovodičnog lanca različitih duljina. *In vitro* ispitivanja pokazala su neke bolje, a neke lošije rezultate usporedno s trenutno primjenjivanim oksimima.²

Druga istraživačka skupina sintetizirala je seriju od pet novih 3-hidroksi-2-piridinaldoksima koji su povezani alifatskim ugljikovodičnim lancem za jednostavne tercijarne amine sklone protoniranju (morfolin, piperidin) koji mogu biti spojeni s dimetoksibenzenom ili dodatno supstituirani s N,N-dimetilanilinom, a koji predstavljaju PSL (slika 12). Većina ovih oksima pokazala se boljim reaktivatorima od trenutno primjenjivanih oksima, a isto tako ponovio se napredak kod reaktivacije tabunom inhibirane AChE. Računalnim predviđanjima na temelju fizikalno-kemijskih svojstava oksima i *in vitro* ispitivanjima za neke oksime utvrđeno je da bi mogli dobro probijati BBB.²⁴



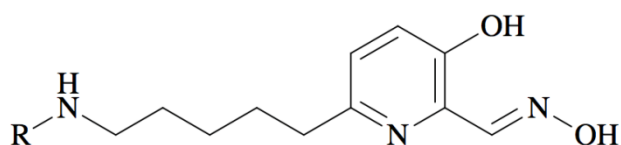
Slika 12. Strukture nekvaternih oksima koji sadrže 3-hidroksi-2-piridinaldoksimski dio.

Sljedeća poboljšanja rađena su na novo sintetiziranoj seriji nenabijenih oksima koji u strukturi sadrže tercijarni amin ili imidazolnu funkcionalnu skupinu sklonu protoniranju.²⁵ Opisano je ukupno trideset novih struktura od kojih se posebno istaknula ona s triazolnim prstenom kao PSL na određenoj udaljenosti od oksimske skupine (slika 13). Uočeno je da uvedeni triazolni dio u strukturi uvelike poboljšava afinitet spoja prema inhibiranoj AChE.²⁵



Slika 13. Struktura oksima koji sadrži triazolni prsten.

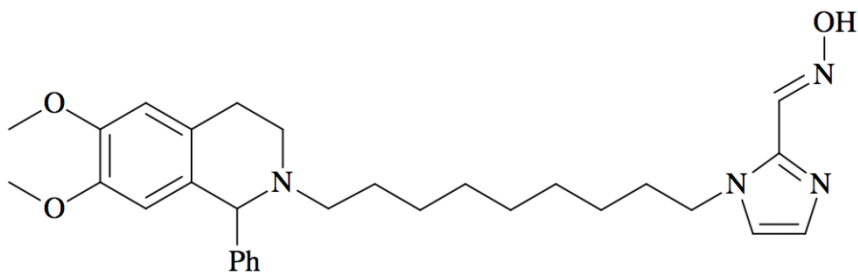
Nadalje, novi tetrahidroakridinski piridinski oksimi također su se pokazali kao efektivni reaktivatori. Tetrahidroakridinski, tj. takrinski dio strukture kao PSL pokazao je dobro vezanje za AChE. Ovaj PSL u strukturama različito je povezan na 3-hidroksi-2-piridinski aldoksim ili amidoksim. *In vitro* ispitivanjima utvrdilo se kako su dvije aldoksimske strukture posebno pokazale bolju efikasnost reaktivacije od nekih trenutno primjenjivanih oksima (slika 14). Također, ovdje je bitno naglasiti da ni jedan oksim ove serije nema ni trajni naboj, a ni tercijarni amin što im omogućuje vrlo učinkovit prolazak kroz BBB.²⁶



Slika 14. Aldoksimska struktura (R=tetrahidroakridin).

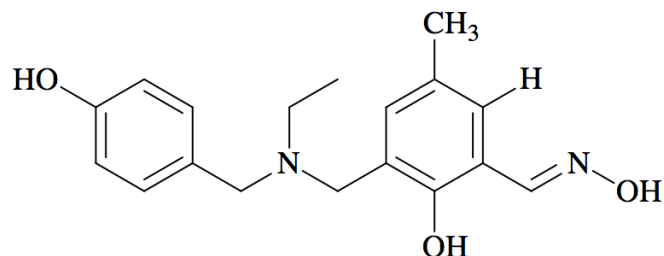
Uvođenje strategije dvostrukog vezivanja u sintezu nenabijenih ne-piridinskih oksima otvorilo je mnoge opcije za nove strukture oksima. Sinteza dvostrukim vezivanjem uključuje spajanje oksima s različitim PSL preko alkilnih lanaca. Ova strategija se pokazala odličnom iz više razloga: pojednostavljuje sintezu oksima, pokazuje ekonomsku superiornost i obećava daljnja poboljšanja dizajna oksima kao reaktivatora.²⁷ Istraživačka skupina, koja je uvela strategiju dvostrukog vezivanja, objavila je više različitih serija novih oksima kroz više radova od kojih su neki pokazali izvrsne, neki jednake, a neki lošije rezultate usporedno s trenutno primjenjivanim oksimima.

Prva serija uključivala je razvoj imidazolnih aldoksima od kojih su se istaknule dvije strukture (slika 15). Ova dva oksima pokazala su se kao prvi učinkoviti ne-piridinski oksimi koji imaju sposobnost uspješno reaktivirati AChE inhibiranu od strane više različitih OP-spojeva (sarin, VX, tabun).²⁷



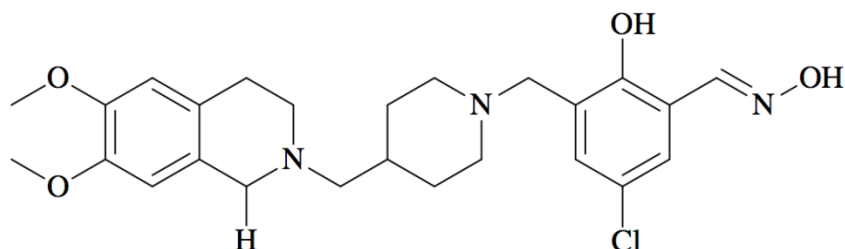
Slika 15. Imidazolni aldoksimi kao reaktivatori više različitih OP-spojeva.

Druga serija uključivala je oksime s jednostavnim aromatskim skupinama kao na primjer 4-hidroksibenzilnom korištenom kao PSL (slika 16). *In vitro* ispitivanjima pokazalo se da su neki od ovih oksima snažni reaktivatori kod kojih se očekuje dobro probijanje BBB.²⁸



Slika 16. Strukture oksima koji sadrže 4-hidroksibenzilni dio kao PSL.

Treća serija uključivala je konjugate salicilaldoksima i PSL (slika 17). Ovi novi oksimi pokazali su sljedeća unaprijeđena svojstva: poboljšanu kemijsku stabilnost i lakšu sintezu ako se uspoređuje s piridin-aldoksimskim konjugatima, veoma poboljšanu lipofilnost te relativno pojačanu *in vitro* učinkovitost reaktivacije inhibirane AChE. Također, ovi oksimi pokazali su ekonomsku superiornost zbog svoje jednostavne sinteze.²⁹



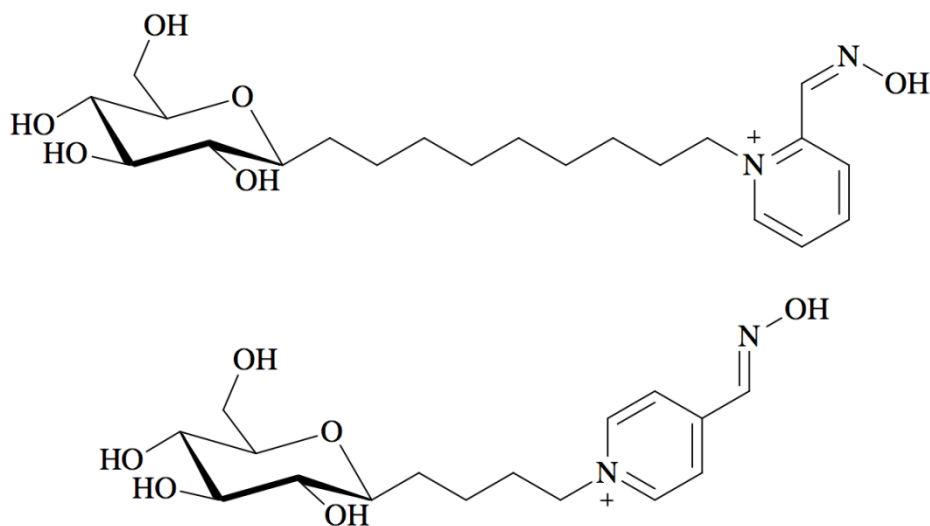
Slika 17. Konjugati salicilaldoksima i PSL s piperidinskom poveznicom.

U većini slučajeva nenabijenih oksima *in vitro* ispitivanja pokazala su pozitivne rezultate, dok se još kod mnogih trebaju provesti *in vivo* ispitivanja za prolazak BBB. Za sada su dobiveni rezultati obećavajući i zasigurno je uočen veliki napredak za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru kod nenabijenih oksima. Međutim, otvoreno je još mnogo prostora za razvoj novih molekula oksima koji bi potencijalno mogli pokazati još bolja svojstva prolaska kroz BBB kao i snagu reaktivacije i to za više različitih OP-spojeva istodobno.

1.5.3. Konjugacija oksima i lipofilnih spojeva

Relativno slabo istražen, ali vrlo perspektivan pristup optimiranja oksima je spajanje oksima s nekom lipofilnom molekulom (npr. peptidima, proteinima, kofeinom, vitaminima, šećerima...). Pretpostavka ovog pristupa je da će se sposobnost probijanja kroz BBB povećati zbog olakšanog transporta oksima mehanizmima pasivne difuzije ili selektivnim transportom molekula. Transport pasivne difuzije javio bi se zbog toga što BBB lako dopušta prolaz molekulama topivima u lipidima dok bi se selektivni transport javio kada bi transportni proteini unutar BBB prepoznali određenu molekulu koju mogu prenijeti (npr. glukozu i aminokiseline). Tako na primjer GLUT transportni proteini, koji su koncentrirani unutar endotelnih stanica u BBB, prepoznaju glukozu koja pomoću njih lako ulazi iz krvi u mozak.³⁰ Konjugacija glukoze s nekim lijekovima, uključujući oksime, mogla bi biti vrlo obećavajuća metoda za reaktivaciju inhibirane acetilkolinesteraze u CNS-u.¹

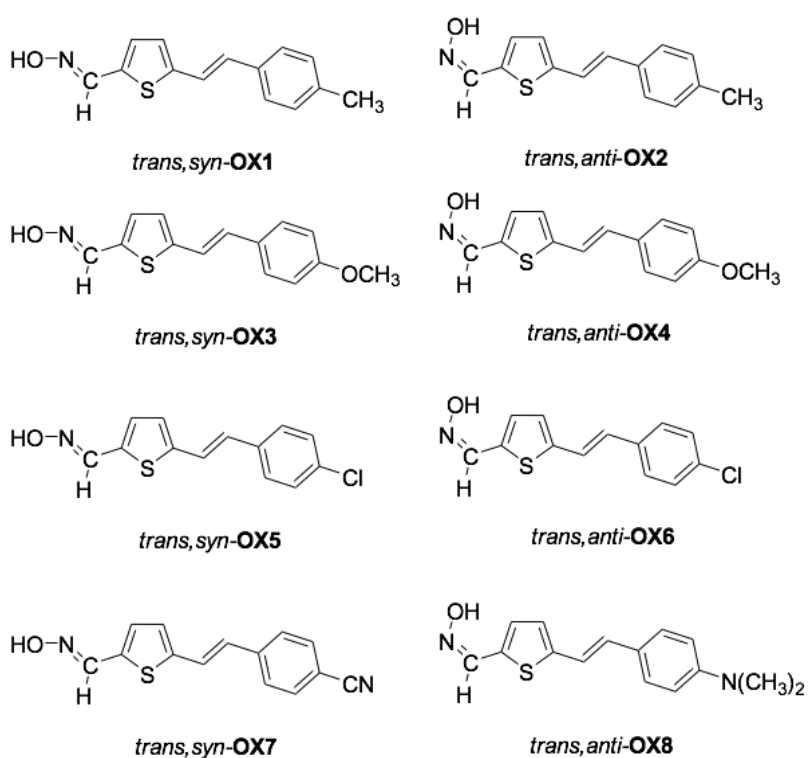
Do sada je jedna istraživačka skupina uspjela sintetizirati nove šećer-oksimske konjugate koji su pokazali dobre rezultate u biološkim testiranjima (slika 18). Uz dobru reaktivacijsku snagu enzima, ovi spojevi pokazali su izrazito nisku toksičnost što je velika prednost nad ostatkom oksima. Smanjena toksičnost povezana je s jednostavnom biološkom razgradnjom glukoznog dijela konjugata unutar moždane stanice.³¹



Slika 18. Strukture šećer-oksimskog konjugata.

1.6. REAKTIVACIJA NAŠIH OKSIMA

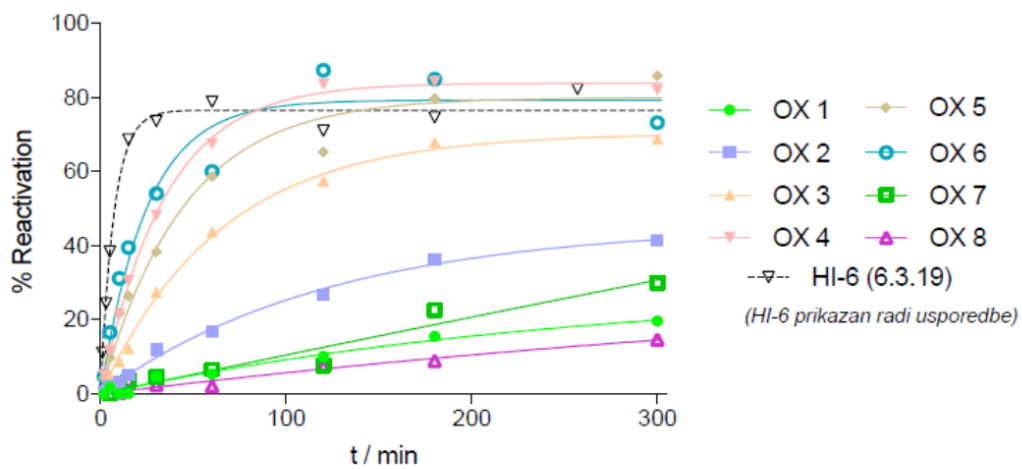
U našem laboratoriju priređen je niz neutralnih različito supstituiranih 2-tienilnih heterostilbenskih oksima **OX1-OX8** (Slika 19)³² te su na njima provedena istraživanja njihovog potencijala kao reaktivatora. Kako se vidi na slici 19, u ovom nizu oksima, kao glavni produkti prevladavaju *trans*-izomeri oksima s različitim konfiguracijama na C=N-OH dvostrukoj vezi, *anti*-, odnosno *syn*-. Dobiveni spojevi **OX1-OX8** sintetizirani su nizom od tri reakcijska stupnja, koji čine Wittigova reakcija, Vilsmeierovo formiliranje te prevođenjem u oksimske strukture.



Slika 19. 2-tienilni heterostilbenski oksimi **OX1-OX8**.

Preliminarni eksperimentalni rezultati pokazali su da su oksimi **OX3-OX6** reaktivatori ciklosarinom inhibirane butirilkolinesteraze (Slika 20), što je izvrsna polazna informacija za sintezu novih sličnih 3-tienilnih heterostilbenskih oksima **7-9**, novih potencijalnih reaktivatora kolinesteraza obuhvaćenih ovim završnim radom.

**Reactivation screens of cyclosarin-inhibited hBChE_{WT}
by OX1-OX8 oximes (0.1mM)**

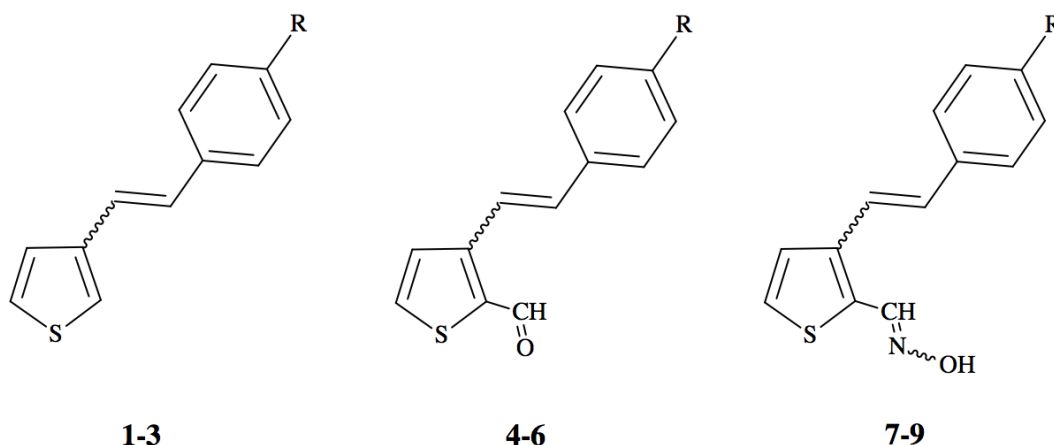


Slika 20. Profil reaktivacije ciklosarinom inhibirane BChE oksimima **OX1-OX8** u usporedbi s reaktivacijskim potencijalom HI-6.

2. REZULTATI I RASPRAVA

2.1. UVOD

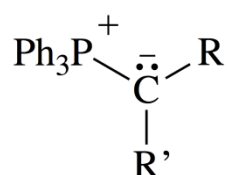
U ovom završnom radu dobiveni su oksimi **7-9** kroz tri jednostavna sintetska koraka. Pri tome kao prvi korak korištena je Wittigova reakcija u kojoj su produkti **1-3** sintetizirani iz 3-tienilnog aldehida i *p*-supstituirane fosfonijeve soli. Tri izabrane soli u svojoj strukturi sadržavale su metilnu skupinu, klor i cijano-skupinu kao supstituente. Kao drugi korak korištena je reakcija Vilsmeierovog formiliranja za sintezu produkata **4-6**. Taj drugi korak sinteze proveden je s pročišćenim i odvojenim *cis*- i *trans*-produktima Wittigovih reakcija, a ne sa smjesom čime je olakšano i poboljšano odvajanje daljnjih produkata. Kao treći i zadnji korak provedena je reakcija prevođenja aldehida u oksime pri čemu su dobiveni produkti **7-9**. Oksimi **7-9** dobiveni su kao smjese *syn*- i *anti*-produkata. Ukupno je dobiveno 12 oksima od kojih su četiri oksima s metilnim supstytutentom i dva oksima s cijano supstytutentom dobiveni u dovoljnoj količini (50 mg) za biološka istraživanja reaktivacije enzima acetilkolinesteraze. Druga polovica oksima dobivena je u dovoljnoj količini za potvrdu spektroskopskim metodama (NMR).



Slika 1. Strukture dobivenih spojeva u ovom završnom radu (R = CH₃, Cl, CN).

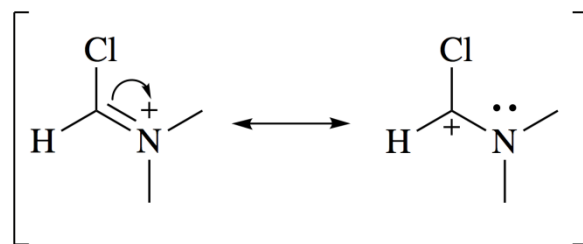
Wittigova reakcija jedna je od najvažnijih i najjednostavnijih reakcija u organskoj sintezi za dobivanje odgovarajuće dvostruke veze. Za ovu reakciju potrebni su karbonilni spoj (aldehid ili keton) i fosforni ilid (slika 2), tj. fosfonijeva sol s odgovarajućim supstytutentima. Ilidi su neutralne molekule s pozitivnim i negativnim nabojem na susjednim atomima, a vrlo jednostavno se mogu dobiti u laboratoriju. Oni međusobno reagiraju u tri stupnja adicijskim

mehanizmom preko dva nestabilna intermedijera betaina i oksafosfetana. Prvi stupanj je nukleofilni napad ilida na djelomično pozitivan karbonilni ugljik polarizirane karbonilne skupine pri čemu nastaje betain. Betain se zatim u drugom stupnju zatvara u četveročlani prsten oksafosfetan koji se u trećem stupnju raspada na produkte. Kao produkti nastaju izomeri željenog alkena i vrlo stabilan nusprodukt trifenil-fosfin oksid čiji je nastanak upravo i pokretačka sila ove reakcije. Za potrebe ovog završnog rada bilo je potrebno napraviti fosfonijevu sol s cijano-supstuentom dok su ostale dvije korištene soli bile već sintetizirane od prije u laboratoriju.



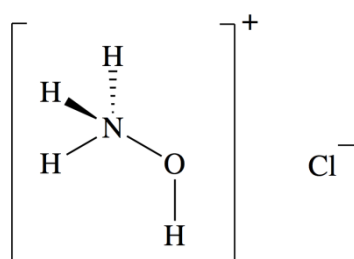
Slika 2. Strukturna shema fosfornog ilida.

Vilsmeier-Haackova reakcija spada u reakcije formiliranja koje služe za funkcionaliziranje aromatskog spoja formilnom skupinom (CHO). U ovom slučaju funkcionaliziran je tiofenski prsten koji kao peteročlani heterocikl ima relativno jako izraženu aromatičnost zbog manje elektronegativnosti atoma sumpora što znači da su sumporovi elektroni bolje delokalizirani po cijelom prstenu. Do funkcionalizacije dolazi na položaju 2 koji je uz položaj 5 najreaktivniji zato što se nalazi uz heteroatom sumpora koji odvlačenjem elektrona iz veze povećava nukleofilnost susjednih položaja, tj. čini ga reaktivnijima. Upravo zato je u ovom koraku sinteze bio očekivan i nastanak nusprodukata koji sadrže formilnu skupinu u položaju 5, a koji se mogu ukloniti kolonskom kromatografijom. Ova reakcija provodi se u otapalu dimetilformamidu (DMF) uz reagens fosfor-oksiklorid (POCl₃) kako bi u reakcijskoj smjesi *in situ* mogao nastati elektrofilan Vilsmeierov reagens (slika 3) koji vodi do formiliranja. Dalje ovaj reagens stupa u reakciju elektrofilne aromatske supstitucije s tiofenskim prstenom. Najnukleofilniji ugljik tiofena napada elektrofilan reagens pri čemu uz izlazak atoma klora dolazi do nastajanja iminijeva iona. Kao posljednji korak ove reakcije obavezno je prilikom obrade reakcije pokrenuti hidrolizu dodatkom 10 %-tne otopine NaOH kako bi u konačnici nastao aldehid.



Slika 3. Vilsmeierov reagens.

Reakcija oksimiranja provedena je vrlo jednostavno dodatkom reagensa hidroksilamin hidroklorida (slika 4) pročišćenom aldehidu. Reakcijski mehanizam odvija se u četiri stupnja. U prvome stupnju nukleofilni reagens napada djelomično pozitivan karbonilni ugljik svojim slobodnim elektronskim parom što rezultira nastajanjem nestabilnog nabijenog tetraedarskog intermedijera. Zatim dolazi do intramolekularnog protoniranja atoma kisika čime nastaje neutralni tetraedarski intermedijer koji također nije previše stabilan pa se stoga reakcija nastavlja stupnjem u kojem izlazi hidroksilna skupina, a dušik stvara dvostruku vezu s bivšim karbonilnim ugljikom čime se vraća njegova stabilna sp^2 konfiguracija. Zadnji stupanj mehanizma je deprotoniranje s dušikova atoma uz izdvajanje molekule vode i nastajanje stabilne neutralne molekule oksima.

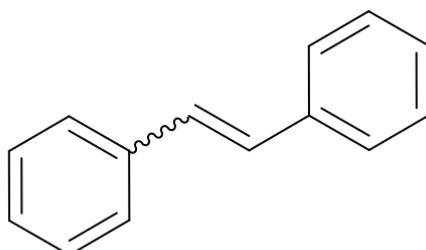


Slika 4. Reagens hidroksilamin hidroklorid.

2.2. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 1-3

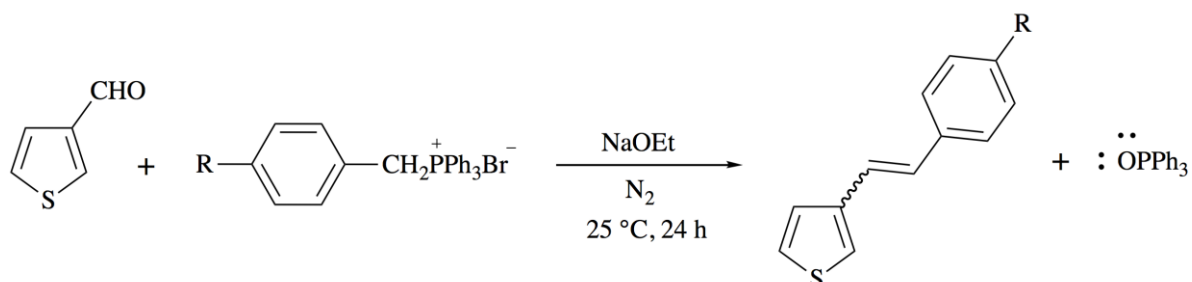
Sinteza heterostilbena **1-3** provedena je Wittigovom reakcijom. Heterostilbeni su molekule u kojima je jedan benzen stilbena (slika 5) zamijenjen nekim heterociklom kao što je to ovdje tiofen. Molekule heterostilbena s različitim supstituentima na benzenskom dijelu u ovome radu bile su polazne strukture s ciljem prevođenja u oksim, a zanimljive su bile upravo iz razloga što se ovom reakcijom dobivaju dva nenabijena izomera koja su potencijalni

reaktivatori inhibiranog enzima acetilkolinesteraze. Drugim riječima, postoji mogućnost da se odjednom i to na vrlo jednostavan način dobiju dvije potpuno različite molekule s različitim svojstvima i sposobnostima reaktivacije te prolaska kroz krvno-moždanu barijeru što uvelike proširuje daljnja biološka ispitivanja.



Slika 5. Struktura stilbena.

Za sintezu su bili potrebni 3-tienilni aldehid i *p*-supstituirana fosfonijeva sol uz dodatak natrijeva etanoata koji se dobije reakcijom elementarnog natrija i apsolutnog etanola. Reakcija dobivanja heterostilbena prikazana je na shemi 1.



Shema 1. Wittigova reakcija dobivanja heterostilbena (R = CH₃, Cl, CN).

Najbolje iskorištenje od 96.4 % pokazala je reakcija s *p*-metilnom fosfonijevom soli, a razlog tome su vjerojatno najmanja sterička ometanja metilne skupine. Najlošije iskorištenje od 23.3 % pri navedenim reakcijskim uvjetima pokazala je reakcija s *p*-klorovom fosfonijevom soli te je stoga reakcija ponovljena u toluenu kako bi se vidjelo ima li promjena otapala kakav utjecaj na iskorištenje reakcije. Iskorištenje ponovljene reakcije iznosilo je 55.8 % što se pokazalo boljim i njome je dobiveno dovoljno produkata za slijedeće sintetske korake. Iskorištenje reakcije s *p*-cijano-fosfonijevom soli iznosilo je 68.5 %.

Niti jedna od reakcija nije pokazala stereospecifično nastajanje samo jednog od produkata već su nastala oba izomera u različitim omjerima. U svim reakcijama većinski produkti bili su *cis*-izomeri čime se pokazalo da su sve provedene reakcije kinetički kontrolirane. Najveću selektivnost pokazala je reakcija s cijano-supstituentom na fosfonijevoj soli gdje je *cis*-

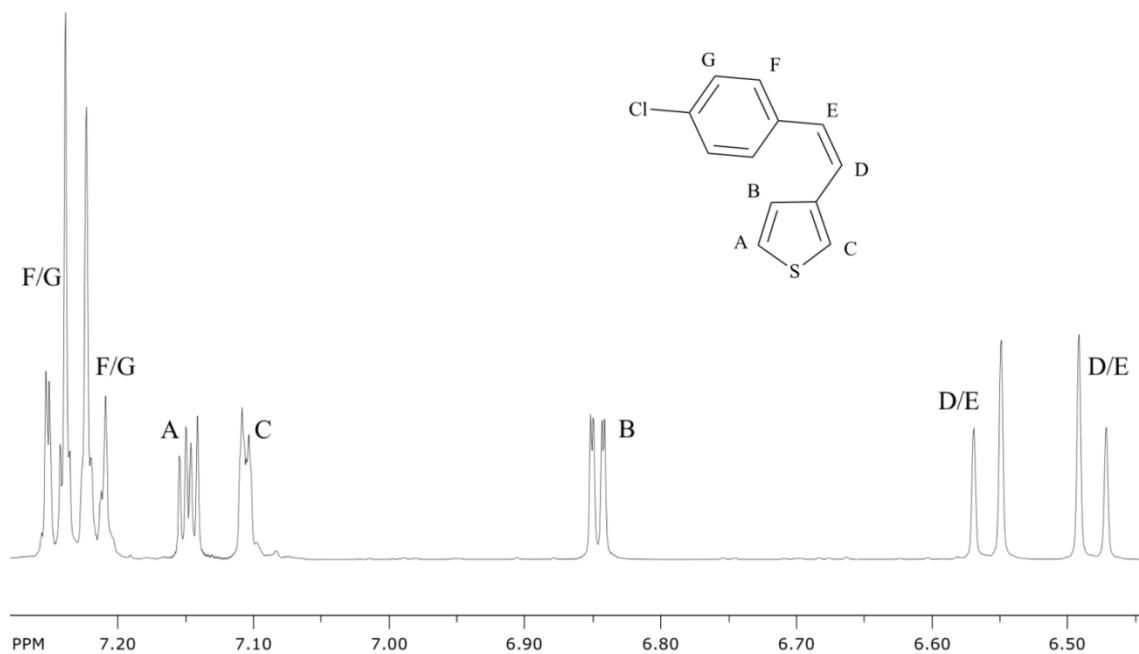
izomera nastalo čak tri puta više od *trans*-izomera dok je u ostale dvije reakcije omjer nastalih izomera u smjesi bio približno 1:1. Ovaj ishod povoljan je zbog činjenice da su u pravilu *cis*-izomeri manje stabilne molekule zbog čega su manje poznati te stoga i manje opisani u literaturi.

Dobiveni produkti Wittigove reakcije odvojeni su i pročišćeni kolonskom kromatografijom, a strukture su im okarakterizirane i potvrđene ^1H i ^{13}C NMR spektrima. Osim za potvrdu struktura spojeva, spektri sirovih smjesa korišteni su i za određivanje omjera dobivenih *cis*- i *trans*-produkata. U ovom prvom sintetskom koraku najvažnije je bilo ^1H NMR spektrima dokazati nastanak dvostruke veze što je uz potvrdu integralima i konstantama sprege dokaz nastanka spojeva **1-3**. Protoni dvostruke veze potvrđeni su pomoću dva dubleta koji su međusobno u sprezi i u svakom spektru pokazuju izraženi krovni efekt te jednake karakteristične iznose konstanti sprege za *cis*- i *trans*-izomere. Kod *cis*-izomera svi dubleti se nalaze u rasponu pomaka od 6.68 do 5.52 ppm, a iznos konstante sprege kod spoja *cis*-**1** je 12.3 Hz, dok je kod spojeva *cis*-**2** i *cis*-**3** 12.1 Hz. Kod svih *trans*-izomera primjećuje se mali pomak prema odsjenjenijem dijelu spektra pa se tako svi dubleti nalaze u rasponu pomaka od 7.23 do 6.89 ppm, a iznosi konstanti sprege kod svih *trans*-izomera (*trans*-**1**, *trans*-**2**, *trans*-**3**) su 16.3 Hz.

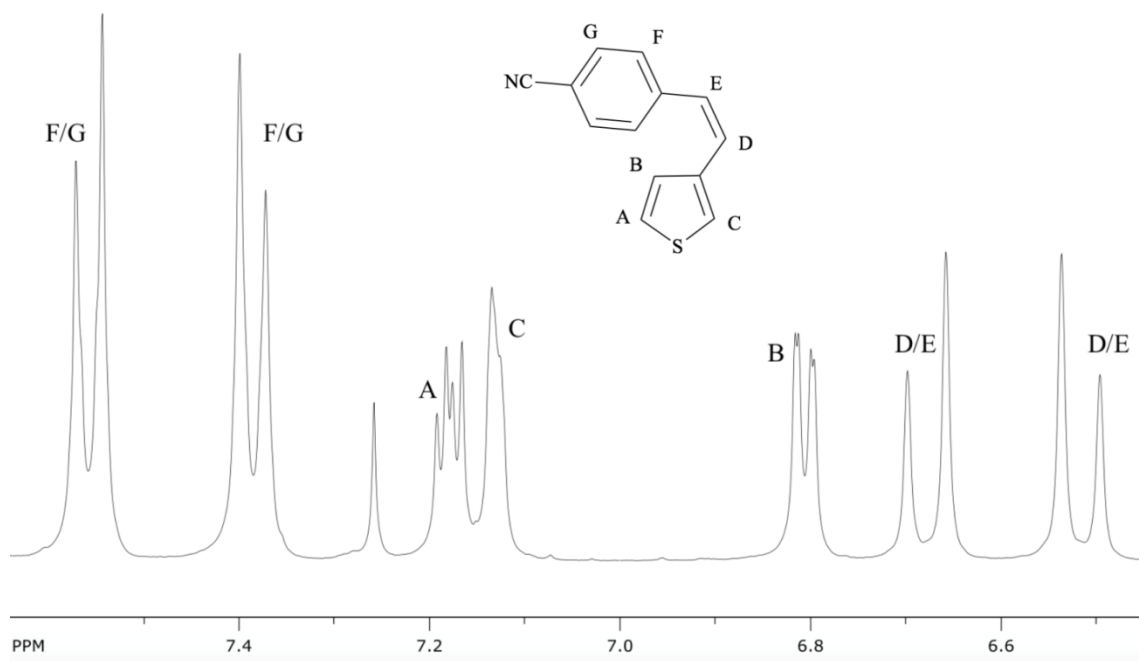
Još neki karakteristični signali na spektrima spojeva **1-3** signali su tiofenskih i benzenskih protona. Potvrda benzenskih protona su dubleti integrala 2 i konstanta sprege koja uvijek iznosi oko 8 Hz. Zbog promjene supstituenata na benzenu može se uočiti utjecaj induktivnog efekta pa se tako protoni benzena uz klor nalaze na nešto malo višim pomacima od protona uz metil, a na najvišim pomacima, tj. najodsjenjeniji su aromatski protoni uz cijano-skupinu. Također, ponovo se primjećuje trend odsjenjenja signala i kod benzenskih protona između samih izomera (signali *trans*-izomera nalaze se pri većim pomacima). Potvrda tiofenskih protona je konstanta sprege koja iznosi oko 5 Hz za protone A i B, konstanta sprege od oko 3 Hz za protone A i C te je u nekim slučajevima došlo i do daleke sprege protona A i C preko 5 veza čija konstanta iznosi oko 1 Hz. Dakle, u nekim je spektrima bilo omogućeno potpuno assigniranje svih tiofenskih protona pomoću konstanti sprege (slika 6 i slika 7). U slučaju kada to nije moguće utvrditi konstantama sprege, dublet protona A uvijek je onaj odsjenjeniji od dubleta protona B zato što se nalazi uz heteroatom sumpora koji zbog induktivnog efekta odsjenjuje proton u svojoj blizini.

Kod spektara spoja *cis*-**1** i *trans*-**1** karakterističan je singlet integrala 3 na pomaku od otprilike 2.3 ppm. Također, u svim spektrima bio je izražen singlet na 7.26 ppm koji predstavlja nedeuterirani dio otapala kloroforma.

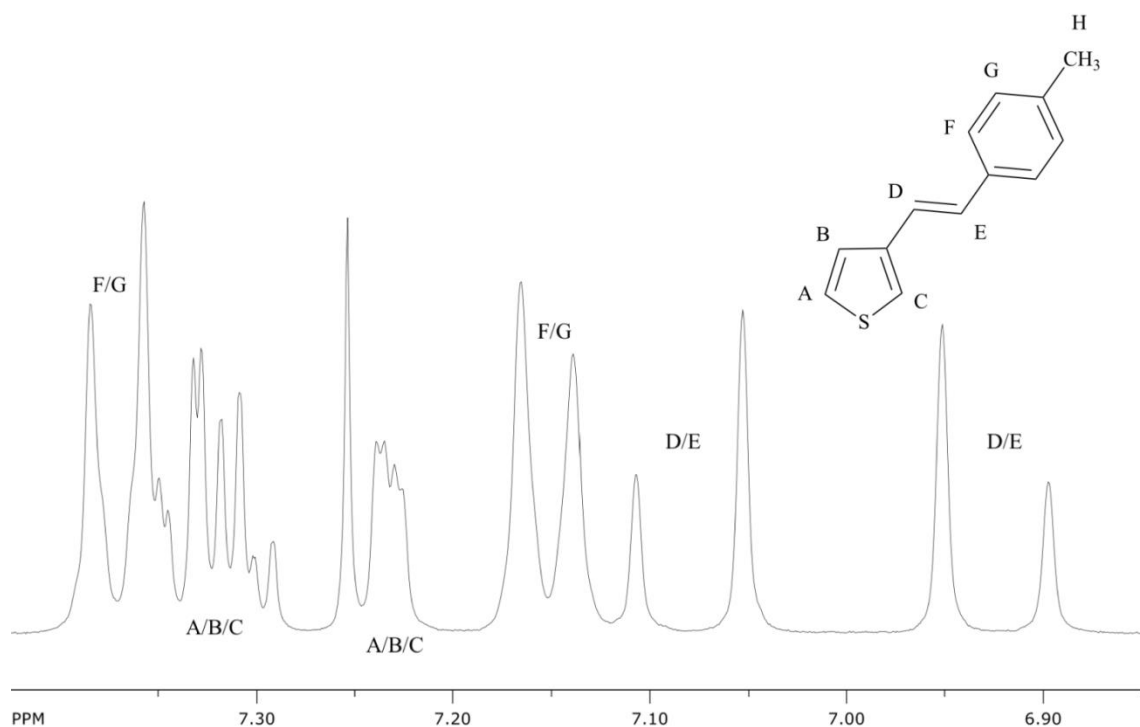
Reprezentativni ^1H NMR spektri spojeva **1-3** prikazani su na slikama 6, 7 i 8.



Slika 6. ^1H NMR spektar (Z)-3-(4-klorostiril)tiofena (*cis-2*).

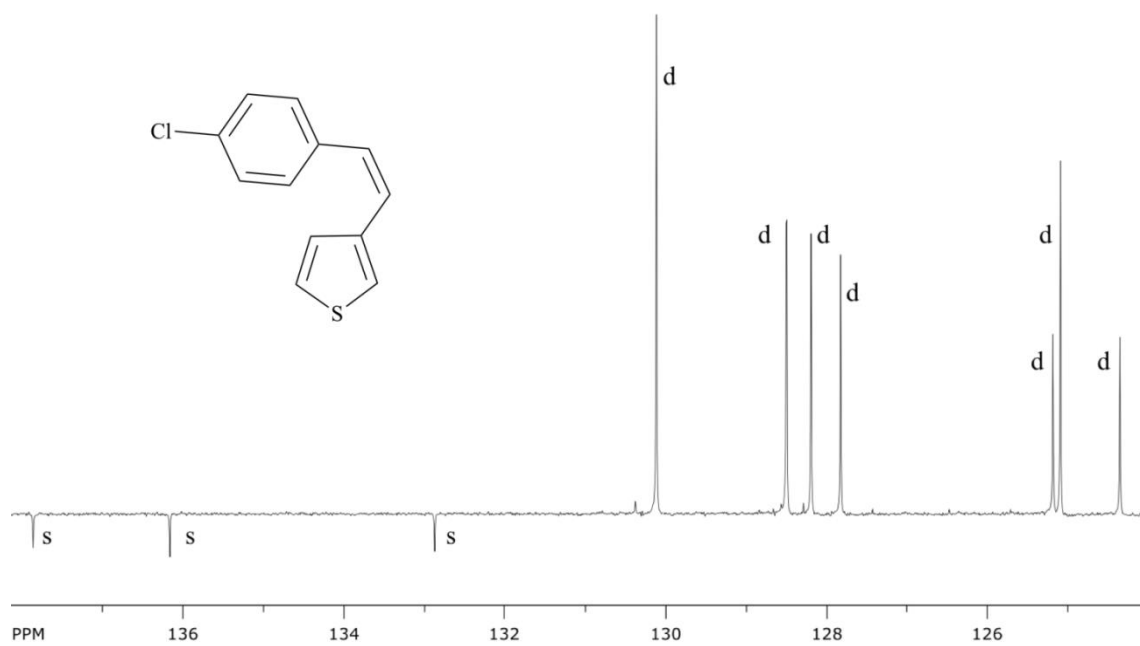


Slika 7. ^1H NMR spektar (Z)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)benzotrila (*cis-3*).

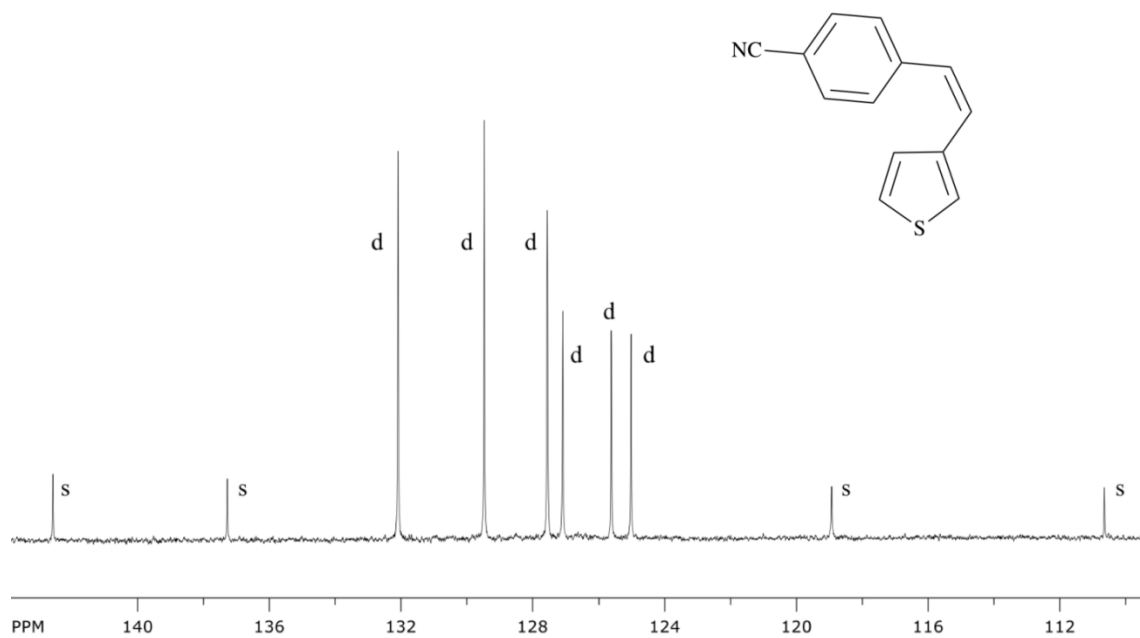


Slika 8. ^1H NMR spektar aromatskog dijela (*E*)-3-(4-metilstiliril)tiofena (*trans*-1).

^{13}C NMR spektri poslužili su kao dodatna potvrda struktura zato što je kod njih teže razlikovati i potpuno asignirati aromatske jezgre i jezgre dvostruke veze jer im se pomaci nalaze u istom području. U ^{13}C NMR spektrima spojeva *cis*-1 i *trans*-1 ukupno je 11 signala od kojih tri pripadaju kvaternim ugljikovim jezgrama. U ^{13}C NMR spektrima spojeva *cis*-2 i *trans*-2 ukupno je 10 signala od kojih su tri za kvaterne jezgre (slika 9). U ^{13}C NMR spektrima spojeva *cis*-3 i *trans*-3 ukupno je 11 signala od kojih su četiri za kvaterne jezgre. Od ovih kvaternih jezgri dva signala nalaze se na najvišim pomacima u odsjenjenijem području dok se ostala dva nalaze pri manjim pomacima i zasjenjeniji su (slika 10). Signali za kvaternu jezgru cijano-skupine nalaze se na očekivanom području pomaka od 115 do 120 ppm. Signali kvaternih jezgri u svim spektrima niskog su intenziteta i uglavnom su odsjenjeniji u odnosu na ostale signale. Također, u svim spektrima izražene su tri linije na oko 77.0 ppm koje predstavljaju kloroform kao otapalo u kojem je sniman spektar.



Slika 9. APT spektar (Z)-3-(4-klorostiril)tiofena (*cis-2*).

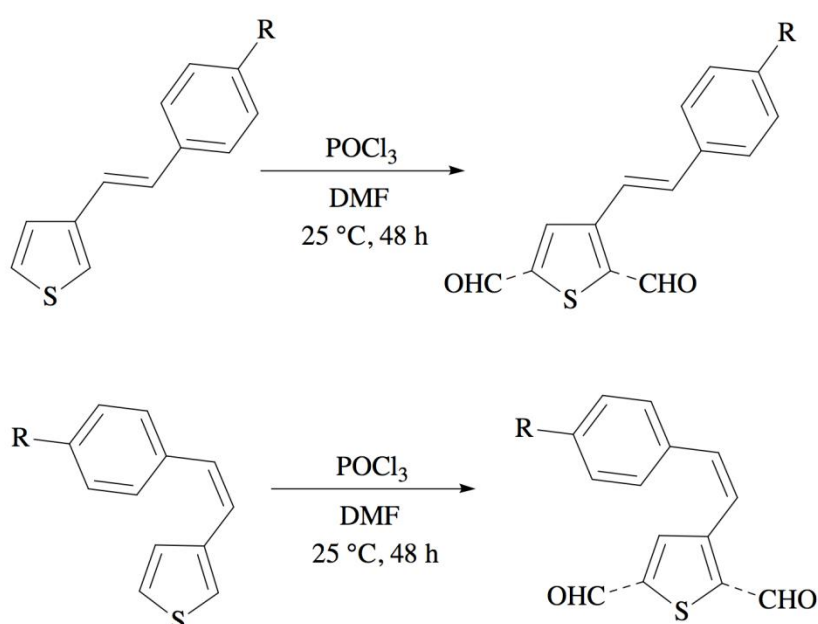


Slika 10. ^{13}C NMR spektar (Z)-4-(2-(tiofen-3-il)vinil)benzonitrila (*cis-3*).

2.3. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 4-6

Sinteza aldehida **4-6** provedena je Vilsmeierovim formiliranjem. Ovaj sintetski korak bio je potreban kako bi se prethodno dobiveni spojevi funkcionalizirali i stoga lako mogli prevesti u oksime.

Za sintezu su bili potrebni pročišćeni i odvojeni izomeri heterostilbena, otapalo DMF i reagens POCl_3 . Reakcija dobivanja aldehida prikazana je na shemi 2.



Shema 2. Reakcija dobivanja aldehida Vilsmeierovim formiliranjem ($\text{R} = \text{CH}_3, \text{Cl}, \text{CN}$).

Ovaj korak sinteze dao je najlošija iskorištenja te se stoga pokazao kao najviše problematičan. Reakcije formiliranja spojeva *cis-2* i *cis-3* ponovljene su i dva puta kako bi se dobilo dovoljno produkata za sljedeći korak oksimiranja. Iskorištenje formiliranja spoja *cis-1* iznosilo je 25.6 %, a spoja *trans-1* 56.5 %. Iskorištenje prvog formiliranja spoja *cis-2* iznosilo je 16.4 %, drugog 46.8 %, a spoja *trans-2* 45.8 %. Ovdje je bitno naglasiti da u prvom formiliranju spoja *cis-2* reagens POCl_3 nije uzet u suvišku dok je u drugom formiliranju uzet u 10 %-tnom suvišku što se pokazalo kao bolji uvjet reakcije. Razlog smanjivanja količine POCl_3 je taj što su u reakciji formiliranja spojeva **1** uz 30 %-tni suvišak POCl_3 dobiveni i nusprodukti, tj. formilna skupina ušla je u neželjeni položaj što je potvrđeno NMR spektrima. Iskorištenje

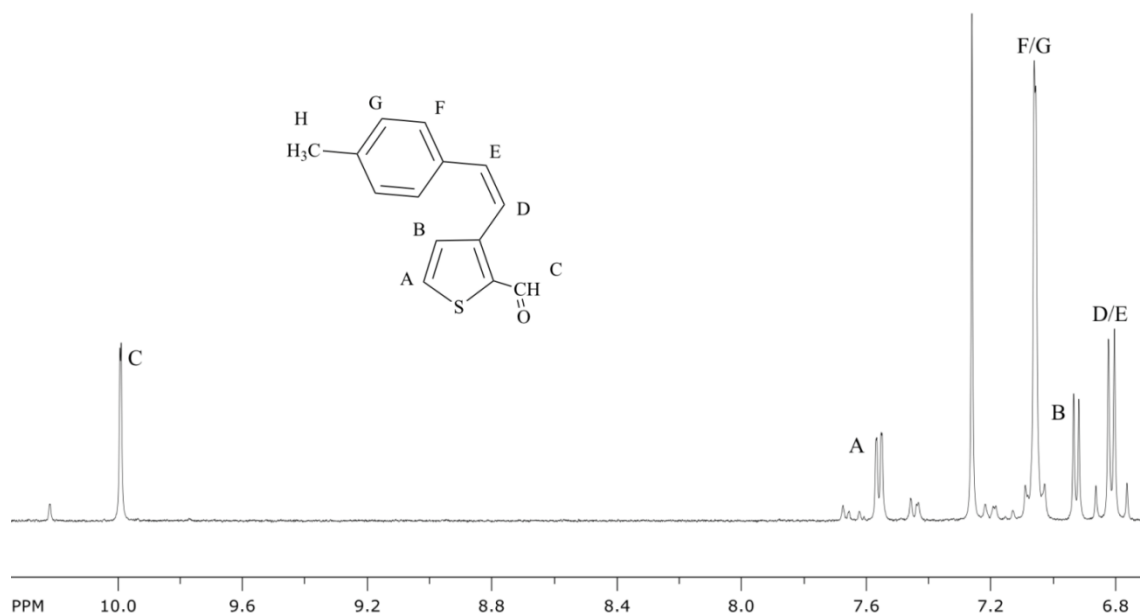
prvog formiliranja spoja *cis*-**3** iznosilo je 29.1 %, drugog 23.8 %, a spoja *trans*-**3** 17.3 %. Kod oba formiliranja spoja *cis*-**3** korištena je jednaka količina početnog spoja.

Kod spojeva koji imaju metilnu skupinu i klor kao supstituent primjećuju se veća iskorištenja kod formiliranja *trans*-izomera, no kako je njih u prvom koraku sinteze nastalo manje, tako su i ovdje dobivene relativno male količine spojeva za sljedeću reakciju. Jedna od pretpostavki zašto su ove reakcije bile slabijeg iskorištenja jest potencijalna sporedna Cannizzarova reakcija aldehida u lužnatom mediju do alkohola tijekom obrade reakcije, no ova tvrdnja nije bila dalje ispitivana.

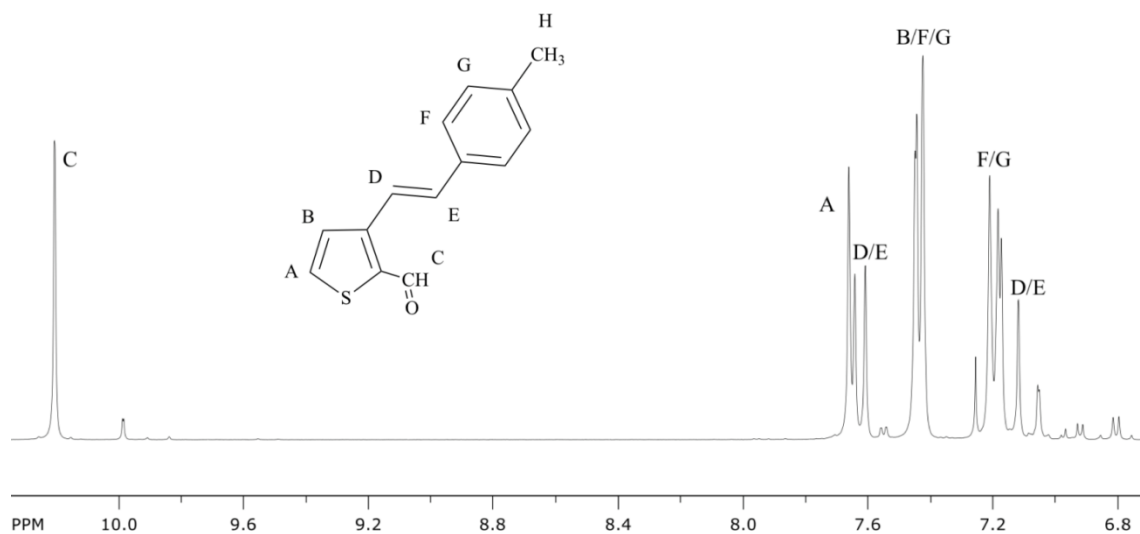
Dobiveni produkti Vilsmeierovog formiliranja pročišćeni su kolonskom kromatografijom, a strukture su im okarakterizirane i potvrđene ^1H i ^{13}C NMR spektrima. U ovom drugom sintetskom koraku najvažnije je bilo ^1H NMR spektrima dokazati prisutnost formilne skupine što je uz potvrdu integralima dokaz nastanka spojeva **4-6**. Formilnu skupinu lako je detektirati na spektrima jer se vidi kao karakteristični singlet integrala 1 u području pomaka od 9.5 do 12 ppm. Kod svih *cis*-izomera spojeva **4-6** singleti karbonilnog protona nalazili su se na oko 9.99 ppm, a kod svih *trans*-izomera isti singleti nalazili su se na oko 10.20 ppm. Također, uočen je trend utjecaja formilne skupine na pomake ostalih signala u spektrima. Nakon uvođenja CHO skupine u strukturu, signali benzenskih protona F/G kod svih *cis*-izomera pokazali su blagi pomak u zasjenjeniji dio spektra, dok su signali kod *trans*-izomera bili blago pomaknuti u odsjenjeniji dio spektra. Isto tako signali protona dvostruke veze D/E i tiofenskih protona A i B kod svih spojeva **4-6** blago su bili pomaknuti u odsjenjeniji dio spektra.

Osim potvrde nastanka aldehida, ^1H NMR spektrima dokazala se željena supstituiranost na tiofenskom prstenu. Dokaz za nastanak željenih 2,3-disupstituiranih aldehida je prisutnost dva dubleta protona A i B u spektrima koji pokazuju karakterističnu konstantu sprege od oko 5 Hz dok bi se u spektrima nusprodukata 2,5-disupstituiranih aldehida vidjela dva singleta. Jedan od tako supstituiranih nusprodukata dobiven je u dovoljnoj količini i također potvrđen ^1H NMR spektrom.

Reprezentativni ^1H NMR spektri spojeva **4-6** prikazani su na slikama 11 i 12. Bitno je naglasiti kako se na izdvojenim dijelovima spektara ne vide singleti metilnog supstituenta koji se nalaze na oko 2.3 ppm.



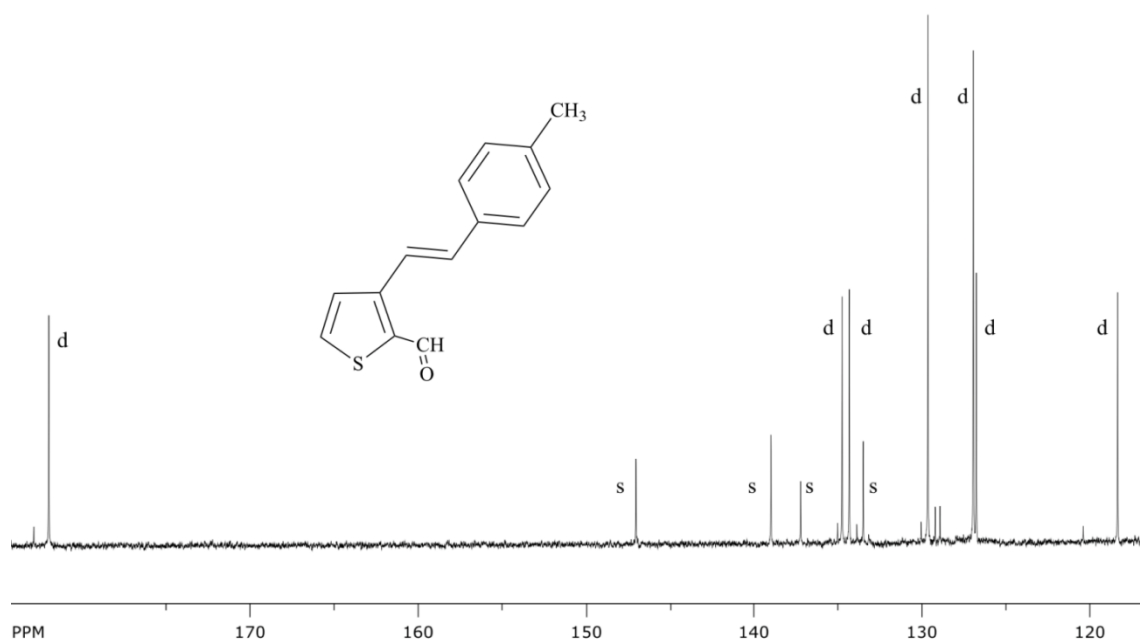
Slika 11. ^1H NMR spektar (*Z*)-3-(4-metilstil)tiofen-2-karbaldehida (*cis*-4).



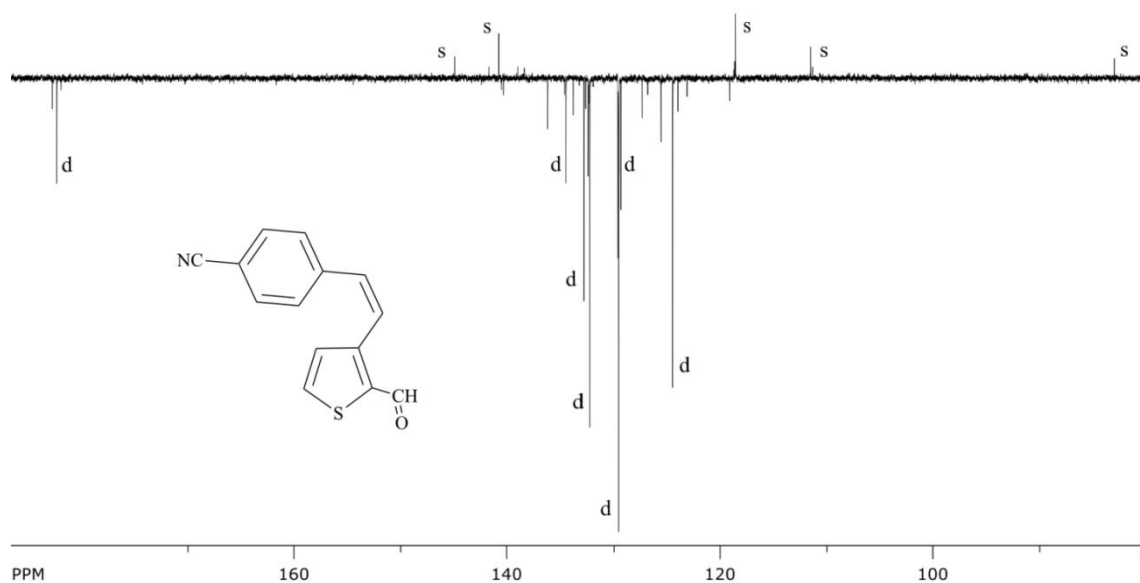
Slika 12. ^1H NMR spektar (*E*)-3-(4-metilstil)tiofen-2-karbaldehida (*trans*-4).

^{13}C NMR spektri poslužili su kao dodatna potvrda prisutnosti formilne skupine u strukturama. Razlika sa spektrima spojeva **1-3** je ta što u spektrima spojeva **4-6** postoji jedan signal više koji predstavlja signal karbonilne jezgre. Signali karbonilne ^{13}C jezgre očekivani su u odsjenjenom području spektra pri pomacima od 190 do 220 ppm, no analizom spektara očitane su malo manje vrijednosti pomaka što ukazuje na blagu zasjenjenost s obzirom na očekivane vrijednosti. Tako se signal za spoj *cis*-4 nalazi na 182.9 ppm, a za *trans*-4 na 182.0 ppm (slika13). Za *trans*-5 signal se nalazi na 182.6 ppm. Za spoj *cis*-6 signal se nalazi na

182.3 ppm (slika 14), a za *trans*-**6** nalazi se na 181.9 ppm. Prema iznosima pomaka vidi se da različiti supstituenti nisu imali prevelikog utjecaja na formilnu skupinu. Svi ostali signali za aromatske jezgre i jezgre dvostruke veze nalazili su se na očekivanom karakterističnom području pomaka od oko 110 do 150 ppm.



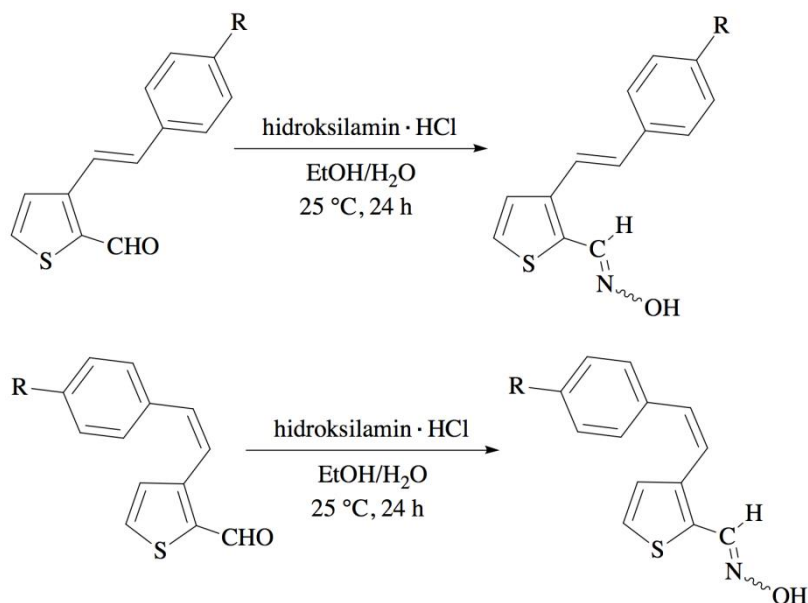
Slika 13. ^{13}C NMR spektar (*E*)-3-(4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehida (*trans*-**4**).



Slika 14. APT spektar (*Z*)-4-(2-(2-formiltiofen-3-il)vinil)benzonitrila (*cis*-**6**).

2.4. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA 7-9

Sinteza oksima **7-9** provedena je reakcijom oksimiranja uz pomoć reagensa hidroksilamin hidroklorida. Za sintezu su bili potrebni pročišćeni aldehidi, apsolutni etanol, voda i hidroksilamin hidroklorid. Reakcija dobivanja oksima prikazana je na shemi 3.



Shema 3. Reakcija dobivanja oksima (R = CH₃, Cl, CN).

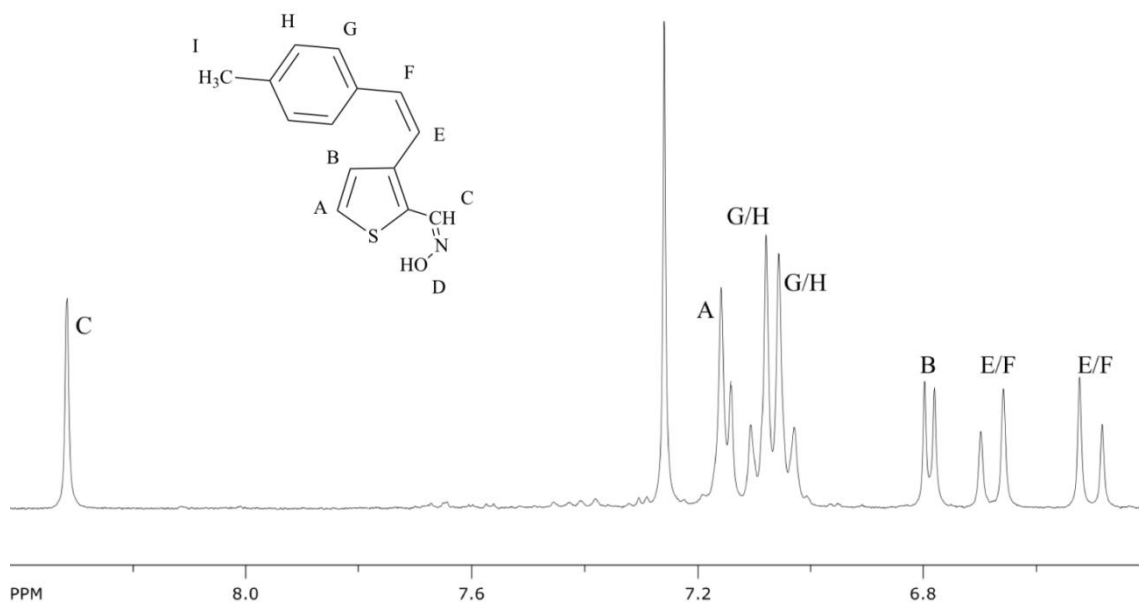
Ovaj zadnji sintetski korak pokazao je vrlo visoka iskorištenja. Kao produkti reakcija dobivene su smjese *syn*- i *anti*-izomera oksima. Iskorištenje reakcije oksimiranja spoja *cis*-**4** iznosilo je 84.6 %, a omjer nastalih izomera bio je približno 1:1 uz to što je stereoselektivno nastalo nešto više *anti*-izomera. Oksimi *cis,syn*-**7** i *cis,anti*-**7** u potpunosti su se uspjeli odvojiti kolonskom kromatografijom. Iskorištenje reakcije oksimiranja spoja *trans*-**4** iznosilo je 86.4 %, a omjer nastalih izomera bio je približno 1:1 uz to što je stereoselektivno nastalo nešto više *syn*-izomera. Dio oksima *trans,syn*-**7** i *trans,anti*-**7** ostao je u smjesi nakon provedene kolonske kromatografije uz to što također nije izoliran potpuno čisti oksim *trans,anti*-**7**. Iskorištenje reakcije oksimiranja spoja *cis*-**5** iznosilo je 66.3 %, a omjer nastalih izomera bio je približno 1:1 uz nastajanje nešto više *anti*-izomera. Dio oksima *cis,syn*-**8** i *cis,anti*-**8** ostao je u smjesi nakon provedene kolonske kromatografije uz to što također nisu izolirana potpuno čista oba oksima. Ovakvo slabo razdvajanje posljedica je korištenja smjese željenog aldehida i nusprodukta u reakciji. Iskorištenje reakcije oksimiranja spoja *trans*-**5**

iznosilo je više od 100 % prema dobivenim podacima mjerenja masa, no ovdje se treba uzeti u obzir mogućnost sustavne pogreške mjernog instrumenta. Omjer nastalih izomera bio je približno 1:1 uz što je stereoselektivno nastalo nešto više *anti* izomera. Dio oksima *trans,syn-8* i *trans,anti-8* ostao je u smjesi nakon provedene kolonske kromatografije uz to što također nije izoliran potpuno čisti oksim *trans,anti-8*. Iskorištenje reakcije oksimiranja spoja *cis-6* iznosilo je 94.1 %, a omjer nastalih izomera bio je približno 1:1 uz nastajanje nešto više *syn*-izomera. Dio oksima *cis,syn-9* i *cis,anti-9* ostao je u smjesi nakon provedene kolonske kromatografije i nije izoliran potpuno čisti oksim *cis,syn-9*. U smjesama su se također nalazili i oksimi nastali iz nusprodukta nakon formiliranja. Iskorištenje reakcije oksimiranja spoja *trans-6* iznosilo je 79.0 %, a omjer nastalih izomera bio je približno 1:1 uz stereoselektivno nastajanje nešto više *anti*-izomera. Oba izolirana oksima *trans,syn-9* i *trans,anti-9* nisu u potpunosti čista nakon provedene kolonske kromatografije zato što se nalaze u smjesi s oksimima nastalima iz nusprodukata reakcije formiliranja.

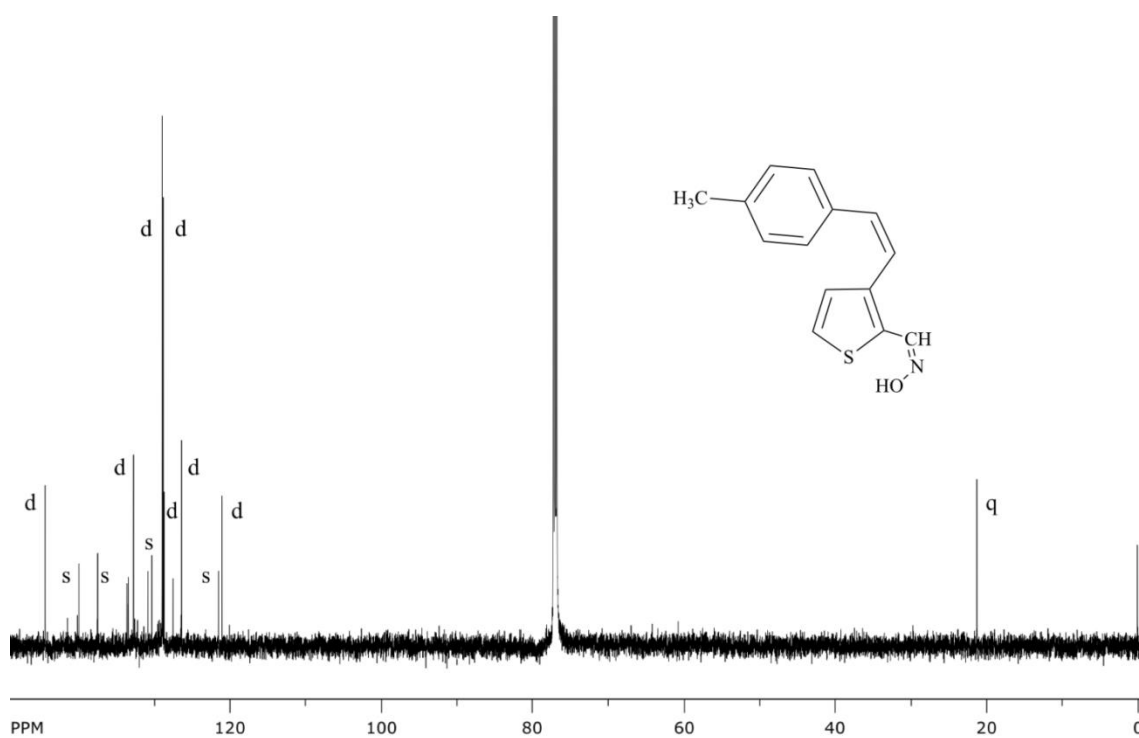
Dobiveni produkti oksimiranja odvojeni su i pročišćeni kolonskom kromatografijom, a strukture su im okarakterizirane i potvrđene ¹H i ¹³C NMR spektrima. Svih 12 predviđenih oksima uspješno je izolirano u dovoljnim količinama za spektroskopsku potvrdu. Osim za potvrdu struktura spojeva, spektri oksima korišteni su i za određivanje čistoće izoliranih *syn*- i *anti*-izomera. U ovom zadnjem sintetskom koraku najvažnije je bilo ¹H NMR spektrima dokazati nastanak oksima pomoću karakterističnog singleta što je uz potvrdu integralima dokaz nastanka spojeva **7-9**. Svi karakteristični singleti protona C nalaze se u području pomaka od 7.50 do 8.60 ppm. Kod oksima *cis,syn-7* singlet se nalazi na 8.32 ppm, a kod *cis,anti-7* na 7.81 ppm. Kod oksima *trans,syn-7* singlet se nalazi na 8.55 ppm, a kod *trans,anti-7* na 8.02 ppm. Primjećuje se da se singlet *syn*-oksima nalazi na većim pomacima od singleta *anti*-oksima i to za otprilike 0.5 ppm što znači da je C proton *syn*-oksima odsjenjeniji. Ovakav trend pomaka ponavlja se i kod oksima **8** i **9**.

¹³C NMR spektri poslužili su kao dodatna potvrda struktura oksima. Razlika sa spektrima spojeva **4-6** je ta što se u spektrima oksima **7-9** novi signali ugljika oksimske skupine nalaze na manjim kemijskim pomacima u odnosu na signale karbonilnih ugljika, tj. u zasjenjenijem su području.

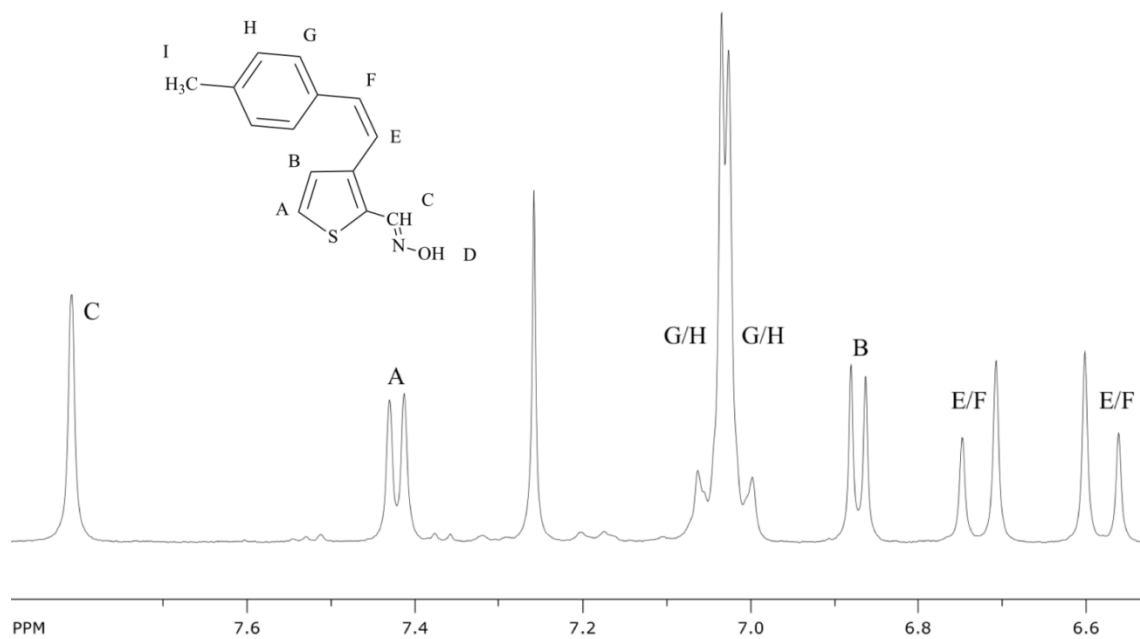
Na slikama 15-26 prikazani su ¹H i ¹³C NMR spektri onih oksima koji su dobiveni u dovoljnim količinama za biološka ispitivanja. Točnije, to su svi oksimi s metilnim supstituentom i *cis*-oksimi s cijano-skupinom kao supstituentom.



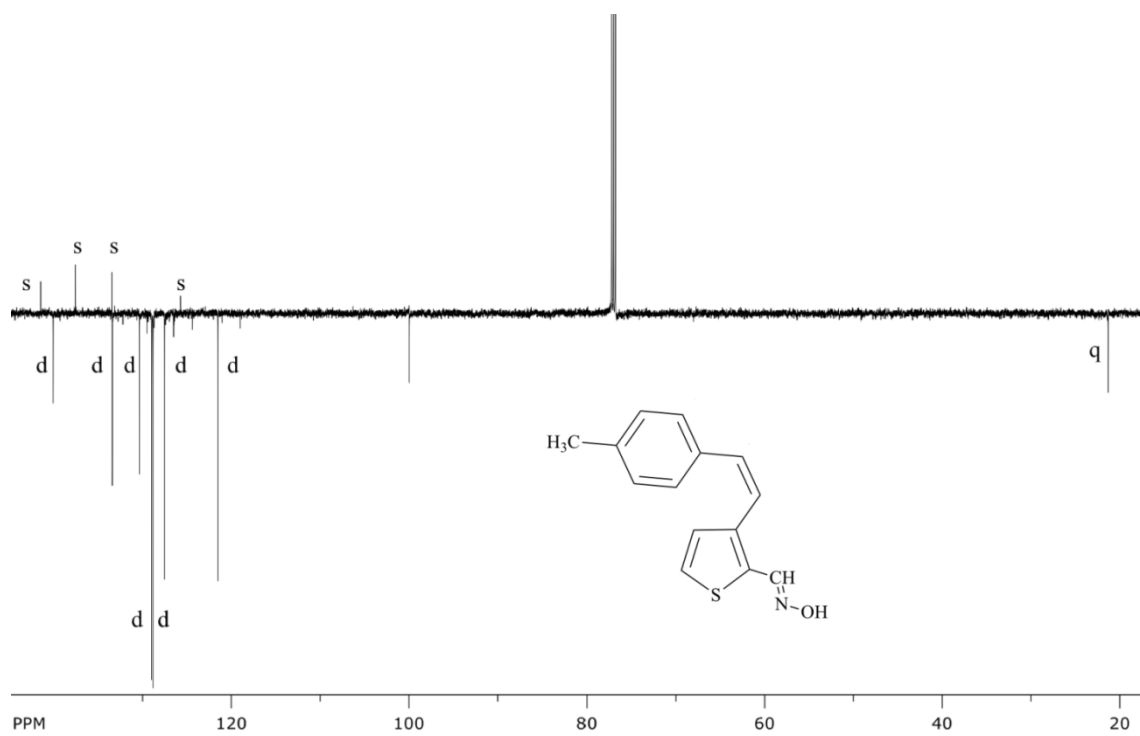
Slika 15. ¹H NMR spektar (Z)-3-((Z)-4-metilstil)tiofen-2-karbaldehid oksima (*cis,syn-7*).



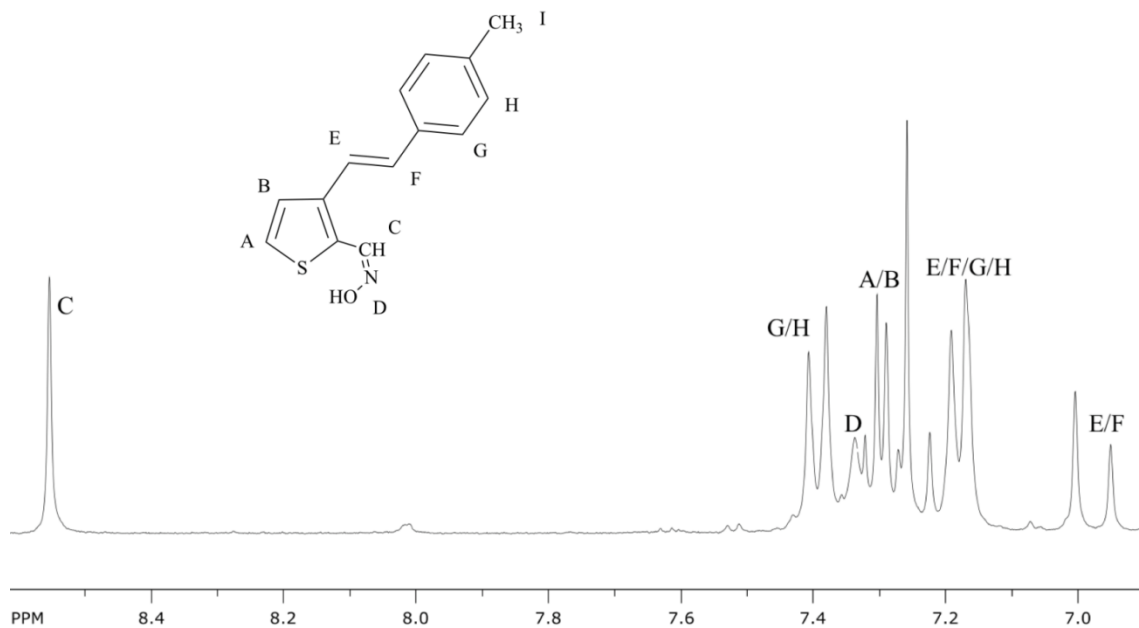
Slika 16. ¹³C NMR spektar (Z)-3-((Z)-4-metilstil)tiofen-2-karbaldehid oksima (*cis,syn-7*).



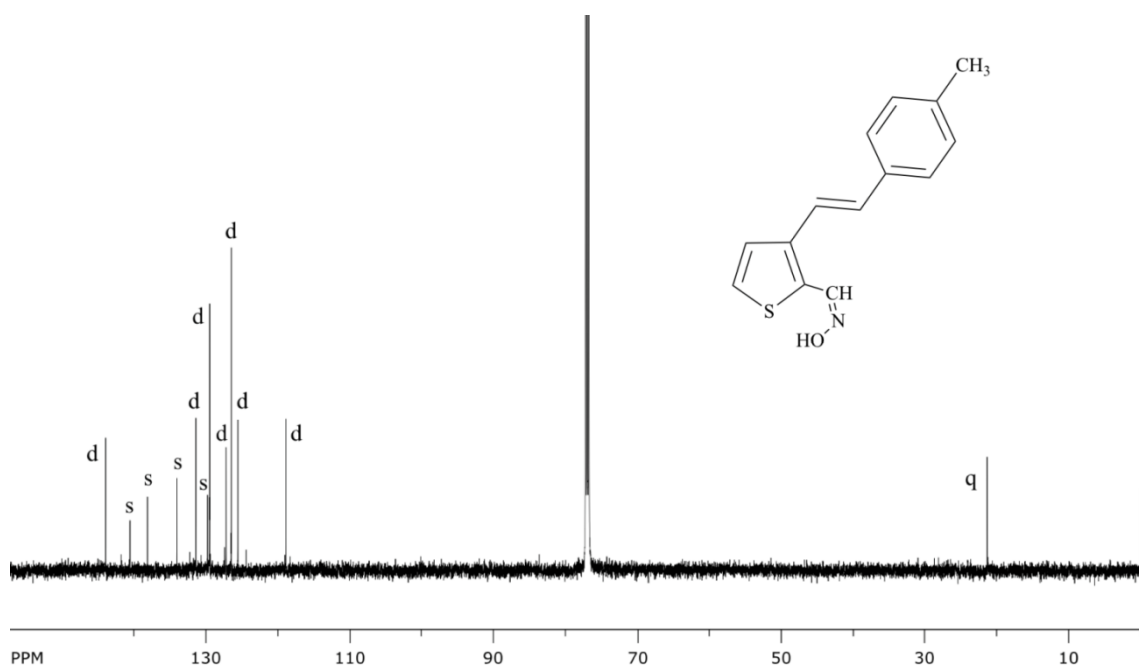
Slika 17. ^1H NMR spektar (*E*)-3-((*Z*)-4-metilstiliril)tiofen-2-karbaldehid oksima (*cis,anti*-7).



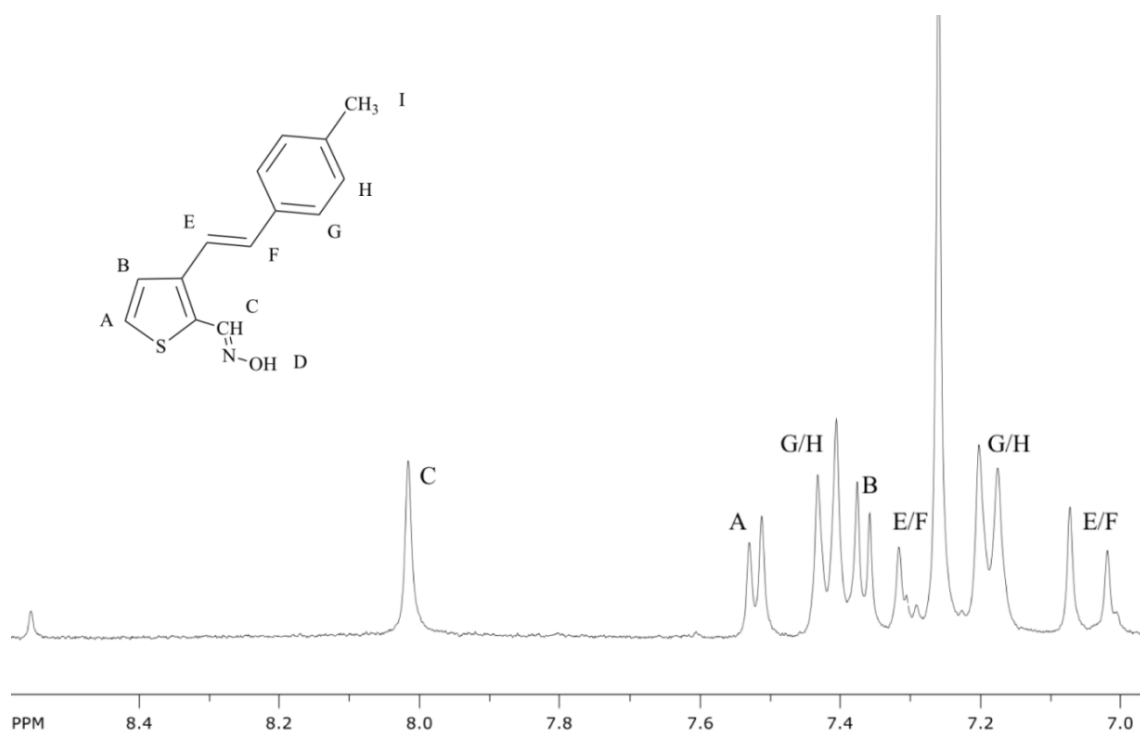
Slika 18. APT spektar (*E*)-3-((*Z*)-4-metilstiliril)tiofen-2-karbaldehid oksima (*cis,anti*-7).



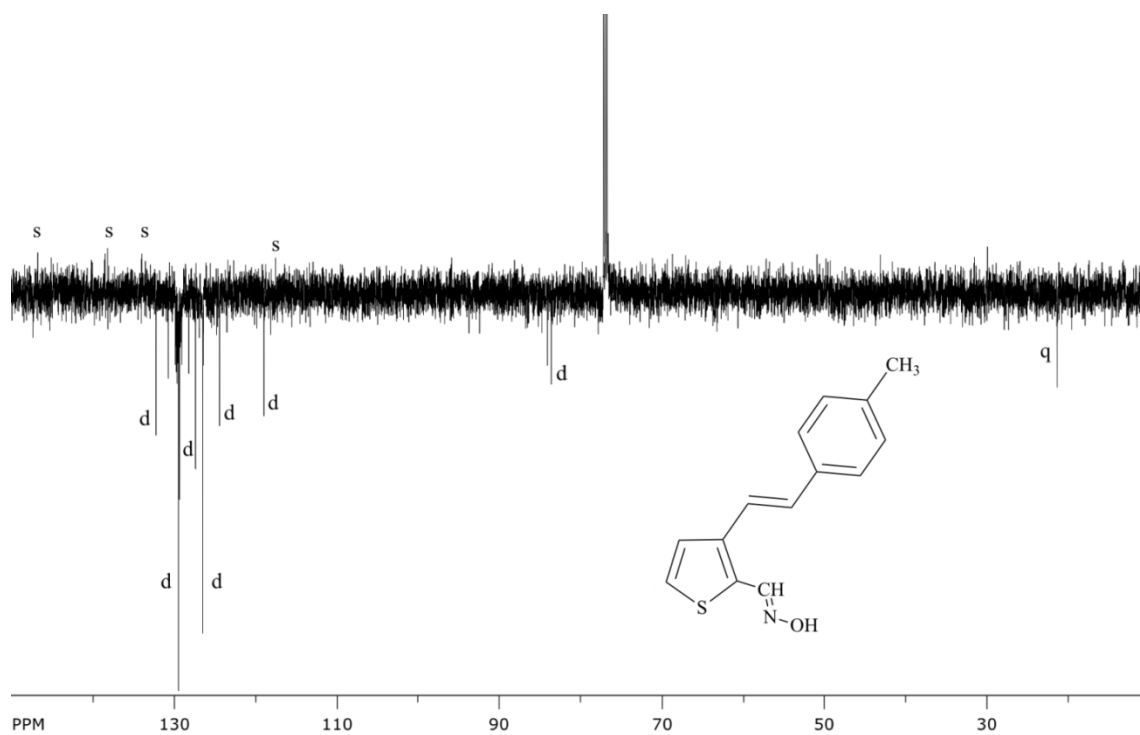
Slika 19. ¹H NMR spektar (Z)-3-((E)-4-metilstil)tiofen-2-karbaldehid oksima (*trans,syn-7*).



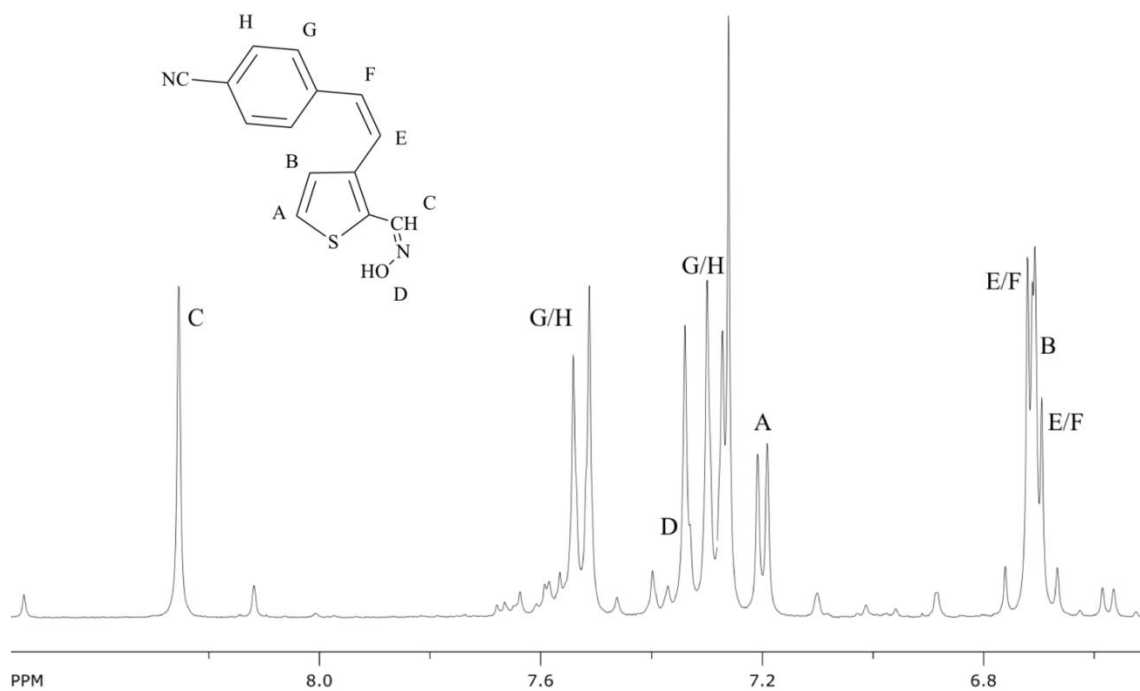
Slika 20. ¹³C NMR spektar (Z)-3-((E)-4-metilstil)tiofen-2-karbaldehid oksima (*trans,syn-7*).



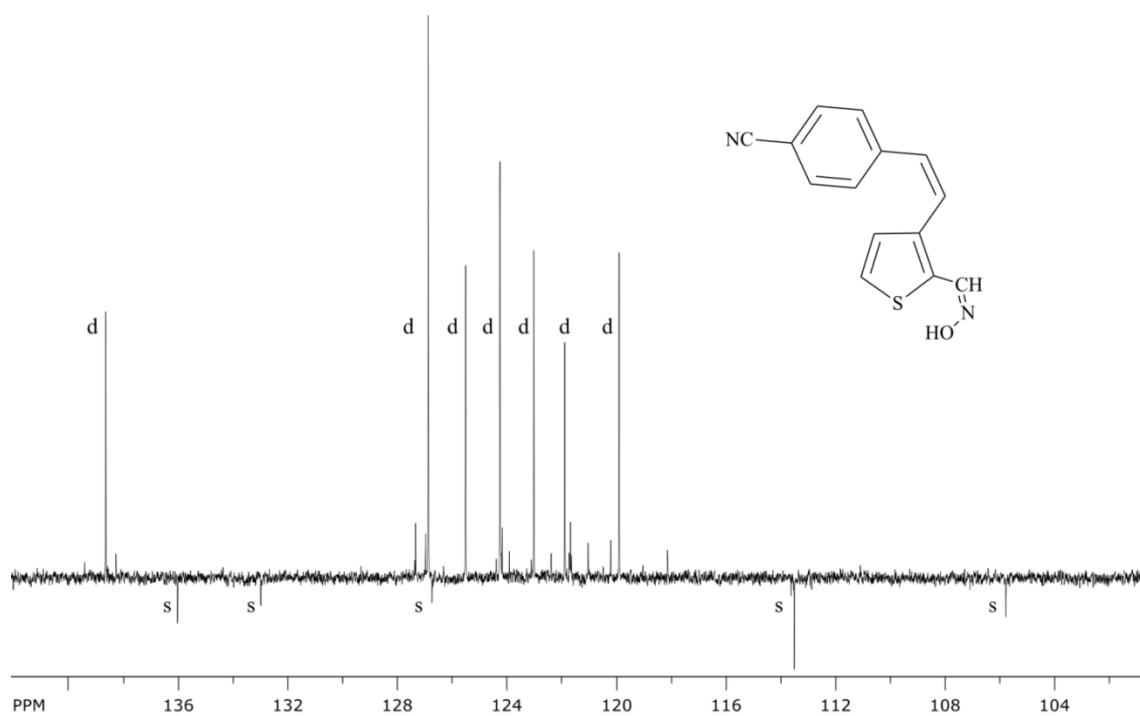
Slika 21. ^1H NMR spektar (*E*)-3-((*E*)-4-metilstil)tiofen-2-karbaldehid oksima (*trans,anti*-7).



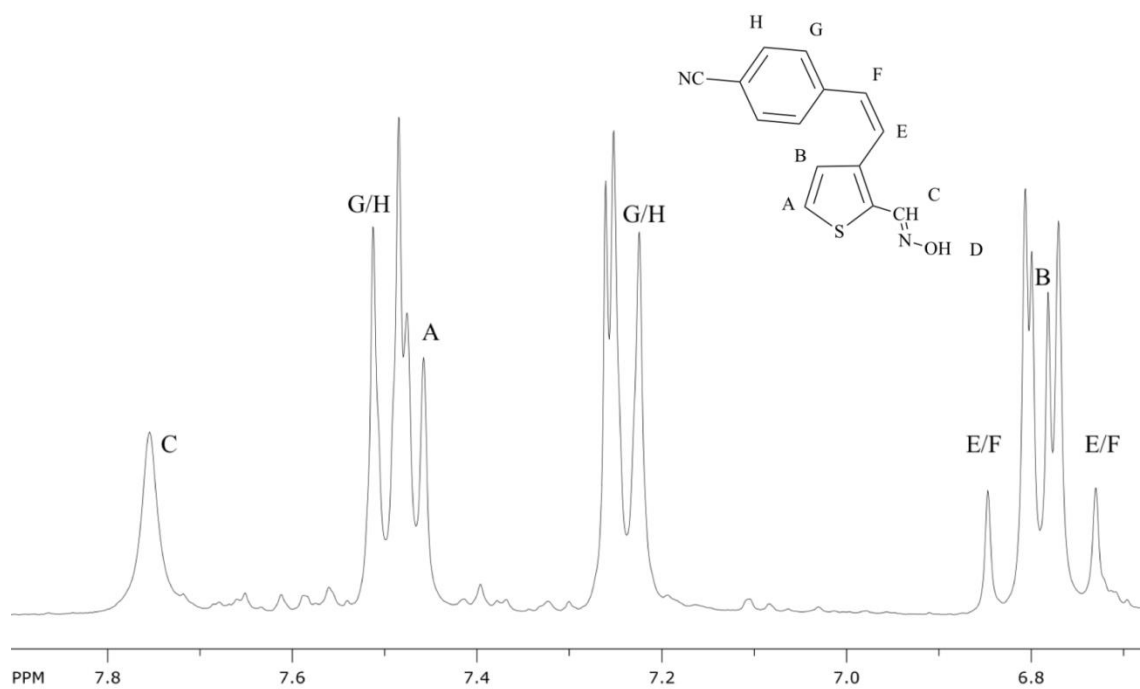
Slika 22. APT spektar (*E*)-3-((*E*)-4-metilstil)tiofen-2-karbaldehid oksima (*trans,anti*-7).



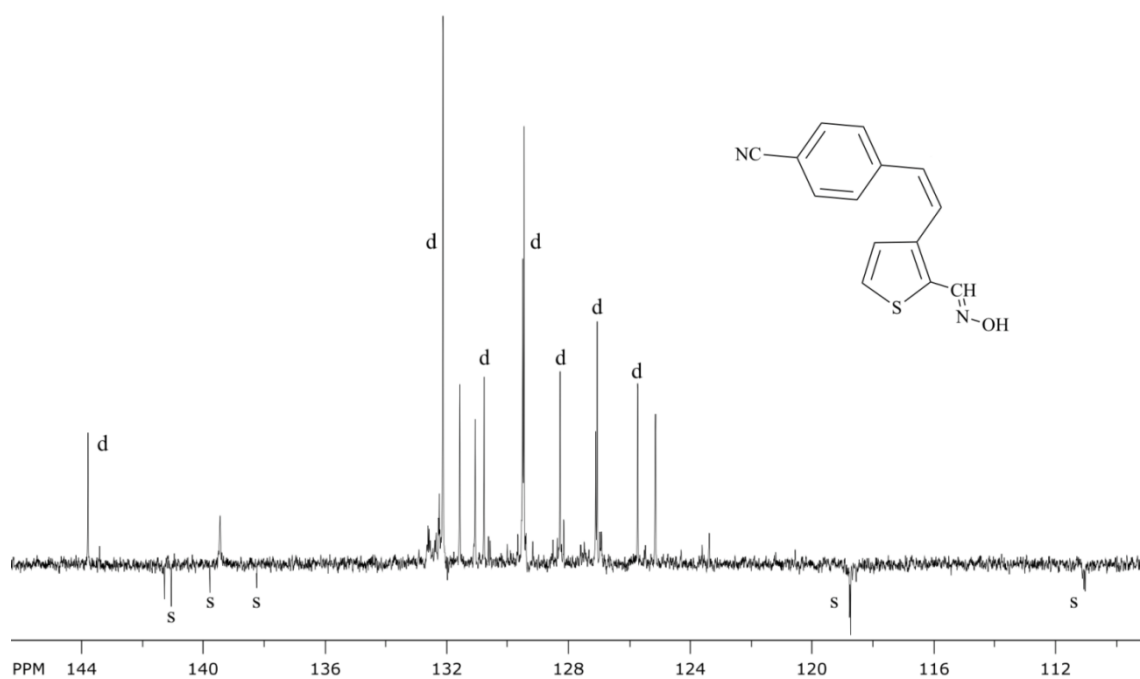
Slika 23. ¹H NMR spektar 4-((Z)-2-(2-((Z)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitrila (*cis,syn-9*).



Slika 24. APT spektar 4-((Z)-2-(2-((Z)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitrila (*cis,syn-9*).



Slika 25. ^1H NMR spektar 4-((*Z*)-2-(2-((*E*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzotrila (*cis,anti*-**9**).



Slika 26. APT spektar 4-((*Z*)-2-(2-((*E*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzotrila (*cis,anti*-**9**).

Kao što je vidljivo iz rezultata, dobiveni su i potvrđeni svi očekivani oksimi. Niti jedna od reakcija nije pokazala stereospecifično nastajanje samo jednog oksima već su svi oksimi nastali stereoselektivno i to uvijek u smjesi gdje je omjer *syn*- i *anti*-oksima približno bio 1:1. Konačna masa oksima najviše ovisi o drugom koraku sinteze, tj. o Vilsmeierovom formiliranju kod kojeg su iskorištenja reakcija bila najniža, a neke reakcije su se čak trebale i ponavljati.

Dobiveni oksimi u ovome radu, osim u biološkim istraživanjima, mogu se također dalje koristiti i kao prekursori u preparativnoj organskoj fotokemiji čime bi se dobile nove molekule, a time i novi potencijalno biološki aktivni spojevi.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OPĆE NAPOMENE

Za sve provedene sinteze i obrade reakcija korišteno je standardno laboratorijsko posuđe. Kolonske kromatografije provedene su po potrebi na širim ($\phi = 2.5$ cm) i užim ($\phi = 1.5$ cm) kolonama punjenima silikagelom (Fluka 60 Å, tehnički). Svi uzorci punjeni su suhim postupkom na kolone. Kao nepolarnija faza eluensa korišten je petroleter (PE), a polarnost je povećavana dietileterom (E). Skraćenica PE/E odnosi se na smjesu otapala petroletera i dietiletera. Tankoslojne kromatografije provedene su na pločama presvučenima tankim slojem silikagela (0.2 mm, Kieselgel 60 F₂₅₄). Kao pokretna faza koristila se smjesa PE/E u različitim omjerima. Spojevi na TLC pločama detektirani su pod UV-lampom pri 254 nm i 366 nm. Sva otapala uklonjena su rotavaporom pri sniženom tlaku.

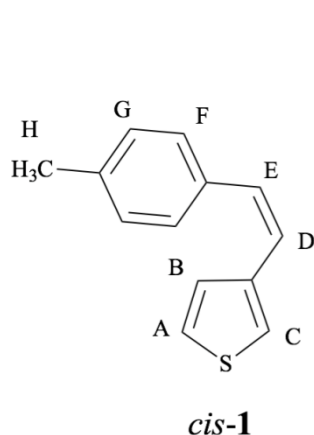
Za potvrdu spojeva i određivanje njihove čistoće korištena je tehnika nuklearne magnetske rezonancije (NMR). ¹H i ¹³C spektri snimljeni su na instrumentu Bruker Avance-600 na 600 MHz, 300 MHz. Za dodatnu karakterizaciju spojeva korištena je i tehnika APT. Svi uzorci za NMR analizu otopljeni su u deuteriranom kloroformu (CDCl₃) i snimljeni uz dodatak tetrametilsilana (TMS) kao unutarnjeg standarda. Snimljeni spektri analizirani su u programu *SpinWorks* 4.2.11. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

3.2. SINTEZA WITTIGOVIH PRODUKATA 3-TIOFEN-STIRILA

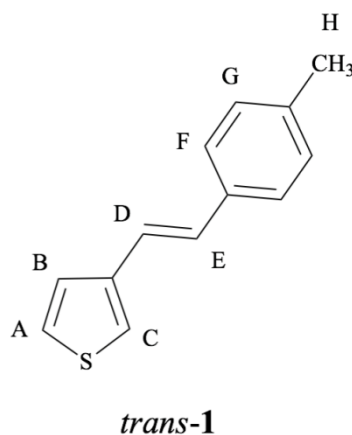
Prije početka reakcije aparatura je 15 minuta propuhana dušikom. U okruglu troglu tikvicu doda se apsolutni etanol (~70 ml) u kojem se zatim otopi izračunata masa *p*-supstituirane fosfonijeve soli (*p*-metil, *p*-klor, *p*-cijano) u 1:1 omjeru u odnosu na 0.5 g (0.0044 mol) aldehida. Nakon što se sol u potpunosti otopila, u lijevak za dokapavanje iznad tikvice ulije se apsolutni etanol (~30 ml) i doda se 111.3 mg natrija (10 %-tni suvišak) kako bi nastala otopina natrijeva etoksida. U međuvremenu se automatskom pipetom doda 390 µl otopine aldehida direktno u reakcijsku smjesu u tikvici. Otopina natrijeva etoksida polako se dokapa iz lijevka u reakcijsku smjesu. Smjesa se ostavi miješati na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi preko noći.

Napredovanje reakcije i nastanak spojeva provjeravani su putem TLC pločice. Nakon završetka reakcije otapalo se upari na rotavaporu pri sniženom tlaku. Dobivena smjesa produkata otopi se u toluenu i zatim tri puta ekstrahira destiliranom vodom. Organski sloj posuši se iznad bezvodnog magnezijevog sulfata, MgSO₄. Smjesa se profiltrira u okruglu tikvicu i otapalo se upari na rotavaporu pri sniženom tlaku.

Nastala sirova smjesa Wittigovih produkata *cis*-**1** i *trans*-**1** odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno su izolirani čisti izomeri što potvrđuju čisti NMR spektri. Dio izomera ostao je u 90.7 mg smjese (*cis:trans* = 1:20). Kao eluens je korišten čisti PE. Iskorištenje reakcije iznosilo je 96.4 %.



(*Z*)-3-(4-metilstilir)tiofen



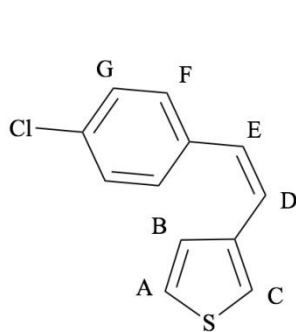
(*E*)-3-(4-metilstilir)tiofen

(*Z*)-3-(4-metilstilir)tiofen (*cis-1*): 376.8 mg, 43.4 % izoliranog spoja, R_f (PE) = 0.32; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7.19 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.14-7.11 (m, 2H), 7.09 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 6.89 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, H_{B}), 6.54 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.49 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 2.34 (s, 3H, H_{H}); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 138.4 (s), 136.9 (s), 134.8 (s), 129.5 (d), 129.0 (d), 128.6 (d), 128.1 (d), 124.8 (d), 123.8 (d), 123.8 (d), 21.3 (q).

(*E*)-3-(4-metilstilir)tiofen (*trans-1*): 288.9 mg, 33.3 % izoliranog spoja, R_f (PE) = 0.21; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7.37 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.33-7.29 (m, 2H), 7.23 (d, 1H), 7.15 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.08 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.92 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 2.35 (s, 3H, H_{H}); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 140.3 (s), 137.3 (s), 134.6 (s), 129.4 (d), 128.6 (d), 126.2 (d), 126.1 (d), 124.9 (d), 122.0 (d), 121.9 (d), 21.2 (q).

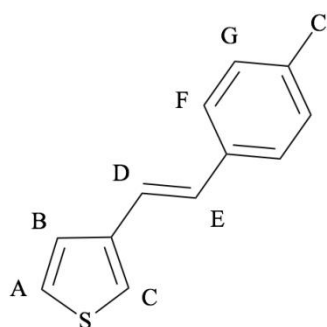
Sinteza Wittigovih produkata *cis-2* i *trans-2* provedena u apsolutnom etanolu kao otapalu dala je relativno nisko iskorištenje, pa je stoga reakcija ponovljena u toluenu p.a. Ljuskice natrijeva etoksida, koje se dodaju u reakcijsku smjesu fosfonijeve soli i aldehida, pripreve se u posebnoj tikvici tako da se u 10 ml apsolutnog etanola doda izračunata količina natrija te se otapalo upari pri sniženom tlaku nakon što sav natrij izreagira. Promjena otapala pokazala se uspješnom jer je ponovljena reakcija pokazala više nego dvostruko poboljšano iskorištenje od 55.8 %.

Nastala sirova smjesa Wittigovih produkata *cis-2* i *trans-2* odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno su izolirani čisti izomeri što potvrđuju čisti NMR spektri. Dio izomera ostao je kao 133.0 mg smjese (*cis:trans* = 1:6). Kao eluens je korišten čisti PE.



cis-2

(*Z*)-3-(4-klorostiril)tiofen



trans-2

(*E*)-3-(4-klorostiril)tiofen

(*Z*)-3-(4-klorostiril)tiofen (*cis-2*): 222 mg, 41.0 % izoliranog spoja, $R_f(\text{PE}) = 0.64$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7.23 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.21 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.15 (dd, 1H, $J = 5.1, 2.9$ Hz, H_{A}), 7.11 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, H_{C}), 6.85 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, H_{B}), 6.56 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.48 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 137.9 (s), 136.2 (s), 132.9 (s), 130.1 (d), 128.5 (d), 128.2 (d), 127.8 (d), 125.2 (d), 125.1 (d), 124.3 (d).

(*E*)-3-(4-klorostiril)tiofen (*trans-2*): 186.1 mg, 34.4 % izoliranog spoja, $R_f(\text{PE}) = 0.49$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 7.40 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.33-7.27 (m, 5H), 7.09 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.89 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 139.8 (s), 135.9 (s), 133.0 (s), 128.8 (d), 127.4 (d), 127.3 (d), 126.3 (d), 124.8 (d), 123.5 (d), 122.7 (d).

3.2.1. Priprava Wittigova reagensa *p*-cijano fosfonijeve soli

5 g 4-(bromometil)benzonitrila otopi se u 20 ml toluena p.a. i doda u okruglu tikvicu od 250 ml. U Erlenmeyerovoj tikvici od 100 ml otopi se trifenilfosfin u 50 ml toluena p.a. i nakon što se u potpunosti otopi doda se u okruglu tikvicu. Reakcijska smjesa miješa se 24 sata od kojih se oko 8 sati zagrijava na 50 °C bez kupelji. Sol je potrebno dobro posušiti u eksikatoru pod vakuumom.

Nastala sirova smjesa Wittigovih produkata *cis-3* i *trans-3* odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno su izolirani čisti izomeri što potvrđuju čisti NMR spektri. Dio

tnom suvišku. Tikvica se brzo zatvori čepom i ostavi miješati na magnetskoj miješalici, prvo pola sata u ledenoj kupelji, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći.

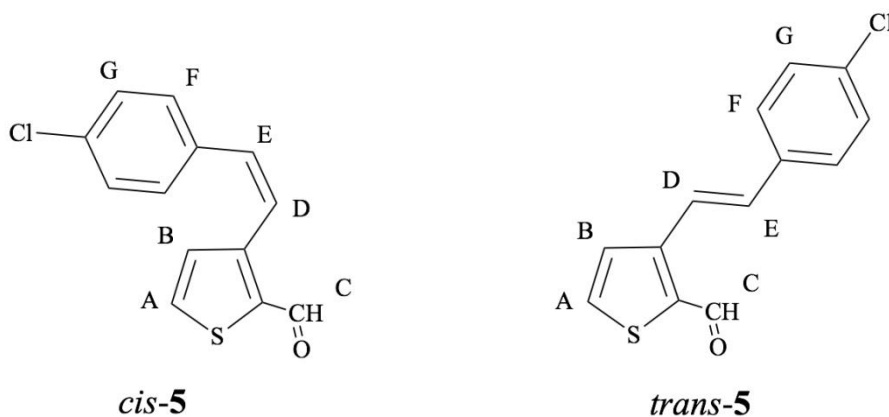
Analizom spektara produkata *cis-4* i *trans-4* zaključeno je kako kod reakcije formiliranja karbonilna skupina, osim u željeni položaj 2 na tiofenskom prstenu, ulazi i u položaj 5 što rezultira nastankom nusprodukata. Zbog toga je u preostalim reakcijama reagens POCl₃ uziman samo u 10 %-tnom suvišku.

Napredovanje reakcije i nastanak spojeva provjeravani su putem TLC pločice. Kod svake provedene reakcije formiliranja po provedenim TLC pločicama vidjelo se kako u svakoj reakcijskoj smjesi nakon 24 sata zaostaju neizreagirali početni spojevi što ukazuje na nepotpuno napredovanje reakcije. Stoga su reakcije ostavljene još 24 sata kako bi se povećalo ukupno iskorištenje reakcije.

Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa neutralizira se s par kapi 10 %-tne NaOH i nakon toga ekstrahira prvo tri puta dietileterom, a zatim tri puta destiliranom vodom. Organski sloj posuši se iznad MgSO₄. Smjesa se profiltrira u okruglu tikvicu i otapalo se upari na rotavaporu pri sniženom tlaku.

Nastala sirova smjesa neizreagiralog spoja *cis-1*, aldehida *cis-4* i nusprodukta odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Neizreagiralog spoja *cis-1* izolirano je 179 mg. Uspješno je izoliran spoj *cis-4* 90 %-tne čistoće što potvrđuje NMR spektar. Također, izolirano je dovoljno nusprodukta formiliranja (*Z*)-4-(4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehida (~ 5 mg) koji je potvrđen ¹H NMR spektrom. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE:E = 95:5. Nastala sirova smjesa neizreagiralog spoja *trans-1*, aldehida *trans-4* i nusprodukta odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Neizreagiralog spoja *trans-1* izolirano je 57 mg. Uspješno je izoliran čisti spoj *trans-4* što potvrđuje čisti NMR spektar. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE:E = 90:10.

spoj *trans*-**5** 25 %-tne čistoće. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE:E = 90:10.



(*Z*)-3-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid (*E*)-3-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid

(*Z*)-3-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid (*cis*-5**):** 98 mg, 61.1 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 90:10) = 0.19; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 9.99 (s, 1H, H_C), 7.58 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz, H_A), 7.22 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.10 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 6.89 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.86 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz, H_B), 6.80 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$).

(*E*)-3-(4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid (*trans*-5**):** 96 mg, 71.6 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 90:10) = 0.15; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 10.20 (s, 1H, H_C), 7.68 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H_A), 7.48 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.45 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, H_B), 7.36 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.12 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.86 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 182.6 (d), 145.9 (s), 134.5 (s), 134.1 (d), 133.9 (s), 133.6 (d), 133.3 (s), 130.2 (d), 128.7 (d), 128.1 (d), 121.9 (d).

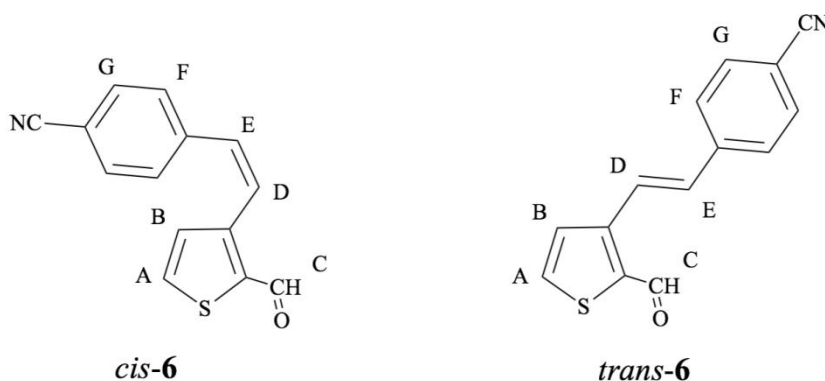
Reakcije formiliranja izomera s cijano-supstuentom provedene su uz jedinu izmjenu uvjeta da se drugi dan reakcijska smjesa zagrijavala na 60 °C u uljnoj kupelji.

Nastala sirova smjesa neizreagiralog spoja *cis*-**3**, aldehida *cis*-**6** i nusprodukta odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Neizreagiralog spoja *cis*-**3** izolirano je 198 mg. Uspješno je izolirano 78 mg spoja *cis*-**6** 77 %-tne čistoće što potvrđuje NMR spektar. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE:E = 80:20.

Kako je nakon reakcije ostalo dosta neizreagiralog spoja *cis*-**3**, formiliranje je ponovljeno s istom količinom početnog spoja *cis*-**3**. Nakon druge reakcije formiliranja kolonskom

kromatografijom uspješno je odvojeno i izolirano 104 mg neizreagiralog spoja *cis*-**3** i 64 mg aldehida *cis*-**6**.

Nastala sirova smjesa neizreagiralog spoja *trans*-**3**, aldehida *trans*-**6** i nusprodukta odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Neizreagiralog spoja *trans*-**3** izolirano je približno 5 mg. Uspješno je izolirano 31 mg spoja *trans*-**6** 75 %-tne čistoće što potvrđuje NMR spektar. Kao eluens prvo je korištena smjesa PE:E = 95:5, a zatim je polarlost povećavana do najvećeg udjela E od 55 %.



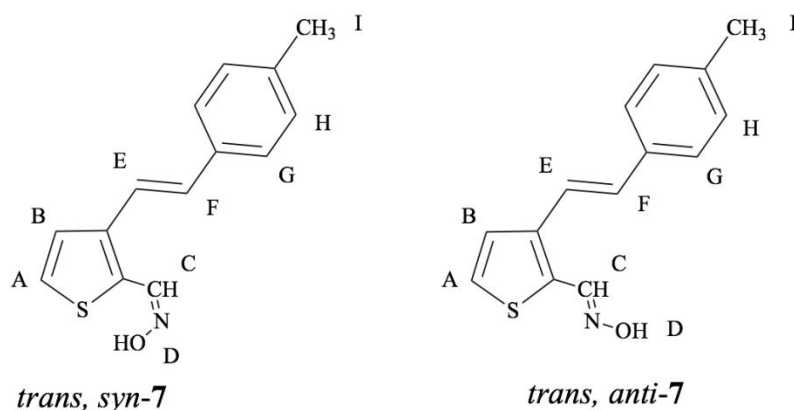
(*Z*)-4-(2-(2-formiltiofen-3-il)vinil)benzonitril (*E*)-4-(2-(2-formiltiofen-3-il)vinil)benzonitril

(*Z*)-4-(2-(2-formiltiofen-3-il)vinil)benzonitril (*cis*-6**):** 142 mg, 38.1 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 90:10) = 0.27; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 9.98 (s, 1H, H_C), 7.61 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, H_A), 7.54 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.27 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.04 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 6.85 (m, 2H, $\text{H}_{\text{B/D/E}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 182.3 (d), 144.9 (s), 140.8 (s), 134.5 (d), 132.8 (d), 132.3 (d), 129.6 (d), 129.5 (d), 124.5 (d), 118.5 (s), 111.5 (s), 82.9 (s).

(*E*)-4-(2-(2-formiltiofen-3-il)vinil)benzonitril (*trans*-6**):** 31 mg, 86.1 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 90:10) = 0.24; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 10.19 (s, 1H, H_C), 7.86 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$), 7.71 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H_A), 7.68 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.63 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{F/G}}$), 7.48 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H_B), 7.16 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, $\text{H}_{\text{D/E}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 181.9 (d), 149.7 (s), 140.8 (s), 134.5 (d), 139.5 (s), 133.0 (s), 132.6 (d), 132.3 (d), 129.5 (d), 127.3 (d), 123.1 (d), 118.7 (s).

3H, H_I); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ/ppm: 141.5 (s), 140.1 (d), 137.6 (s), 133.5 (s), 133.5 (d), 130.4 (d), 129.0 (d), 128.9 (d), 127.6 (d), 125.8 (s), 121.5 (d), 21.2 (q).

Nastala sirova smjesa oksima *trans,syn-7* i *trans,anti-7* odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno je izoliran čisti oksim *trans, syn-7* što potvrđuje čisti NMR spektar. Također, izoliran je i oksim *trans,anti-7* 92 %-tne čistoće što potvrđuje NMR spektar. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE/E do najvećeg udjela E od 50 %.

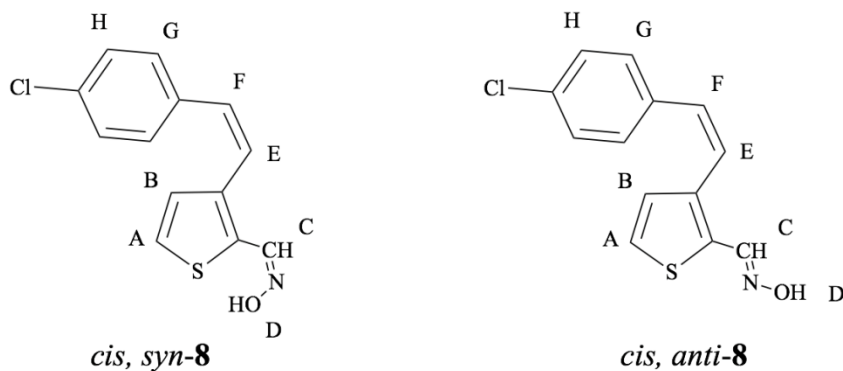


(*Z*)-3-((*E*)-4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*E*)-3-((*E*)-4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid oksim

(*Z*)-3-((*E*)-4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*trans,syn-7*): 87 mg, 50.9 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 90:10) = 0.40; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 8.55 (s, 1H, H_C), 7.39 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H_{G/H}), 7.34 (s, 1H, H_D), 7.30 (q, 2H, H_{A/B}), 7.19 (m, 3H, H_{E/F/G/H}), 6.98 (d, 1H, J = 16.1 Hz, H_{E/F}), 2.37 (s, 3H, H_I); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ/ppm: 144.0 (d), 140.6 (s), 138.2 (s), 134.1 (s), 131.4 (d), 129.8 (s), 129.5 (d), 127.2 (d), 126.5 (d), 125.6 (d), 118.9 (d), 21.3 (q).

(*E*)-3-((*E*)-4-metilstiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*trans,anti-7*): 72 mg, 42.1 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 90:10) = 0.23; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 8.02 (s, 1H, H_C), 7.52 (d, 1H, J = 5.4 Hz, H_A), 7.42 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H_{G/H}), 7.37 (d, 1H, J = 5.4 Hz, H_B), 7.29 (d, 1H, H_{E/F}), 7.19 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_{G/H}), 7.04 (d, 1H, J = 16.1 Hz, H_{E/F}), 2.37 (s, 3H, H_I); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ/ppm: 146.9 (s), 138.3 (s), 134.1 (s), 132.3 (d), 129.5 (d), 127.4 (d), 126.5 (d), 124.5 (d), 119.0 (d), 117.6 (s), 83.6 (d), 21.3 (q).

Nastala sirova smjesa oksima *cis,syn-8*, *cis,anti-8* odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno je izoliran oksim *cis,syn-8* 70 %-tne čistoće i oksim *cis,anti-8* 90 %-tne čistoće što potvrđuju NMR spektri. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE/E do najvećeg udjela E od 20 %.

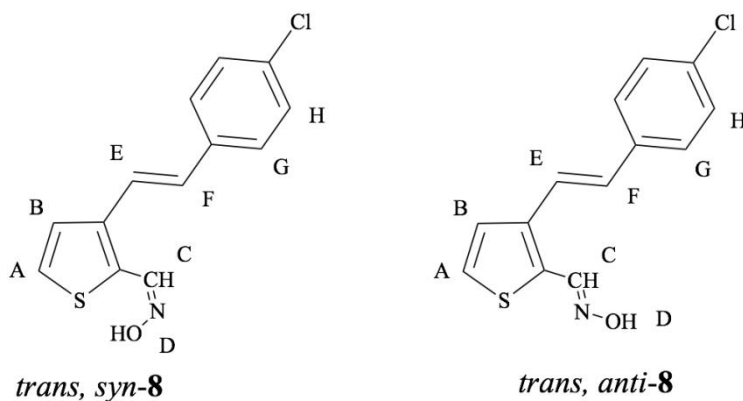


(*Z*)-3-((*Z*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*E*)-3-((*Z*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim

(*Z*)-3-((*Z*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*cis,syn-8*): 18 mg, 26.1 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 80:20) = 0.70; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8.29 (s, 1H, H_C), 7.21 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.17 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, H_A), 7.12 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 6.74 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, H_B), 6.65 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6.58 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$).

(*E*)-3-((*Z*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*cis,anti-8*): 20 mg, 29.0 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 80:20) = 0.35; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7.80 (s, 1H, H_C), 7.44 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, H_A), 7.18 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.07 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 6.83 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, H_B), 6.71 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6.66 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ /ppm: 140.7 (d), 134.8 (s), 133.4 (s), 132.2 (d), 131.5 (s), 130.7 (d), 130.2 (d), 128.5 (d), 127.3 (d), 123.1 (d), 122.6 (s).

Nastala sirova smjesa oksima *trans,syn-8* i *trans,anti-8* odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno je izoliran čisti oksim *trans,syn-8* što potvrđuje NMR spektar. Također, izoliran je i oksim *trans,anti-8* 70 %-tne čistoće što potvrđuje NMR spektar. Dio oksima ostao je neodvojen u 53 mg smjese. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE/E do najvećeg udjela E od 30 %.

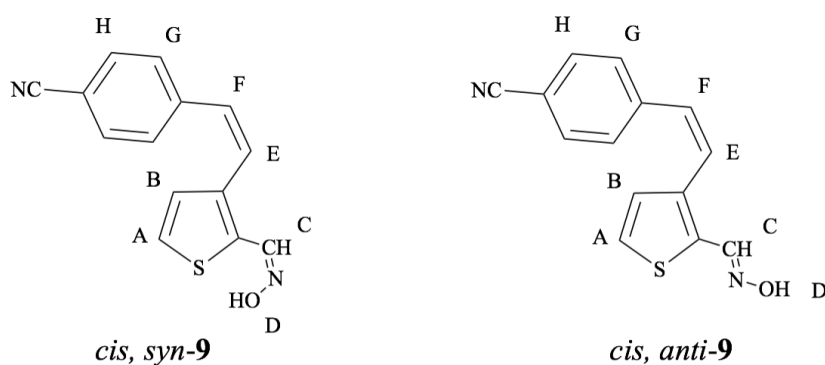


(*Z*)-3-((*E*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*E*)-3-((*E*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim

(*Z*)-3-((*E*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*trans,syn-8*): 22 mg, 20.7 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 80:20) = 0.62; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8.54 (s, 1H, H_C), 7.42 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.33 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.30 (s, 2H, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7.22 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6.95 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 143.8 (d), 139.9 (s), 135.4 (s), 133.7 (s), 130.0 (d), 129.0 (d), 127.7 (d), 127.4 (d), 125.5 (d), 124.3 (s), 120.5 (d).

(*E*)-3-((*E*)-4-klorostiril)tiofen-2-karbaldehid oksim (*trans,anti-8*): 31 mg, 29.2 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 80:20) = 0.27; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7.93 (s, 1H, H_D), 7.53 (s, 1H, H_C), 7.52 (s, 1H, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7.62 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.47 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7.36 (m, 3H, $\text{H}_{\text{E/F/G/H}}$), 7.14 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$).

Nastala sirova smjesa oksima *cis,syn-9*, *cis,anti-9* i nusprodukata odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno je izoliran oksim *cis,syn-9* 90 %-tne čistoće i čisti oksim *cis,anti-9* što potvrđuju NMR spektri. Dio oksima *cis,syn-9* i *cis,anti-9* ostao je neodvojen u 15 mg prve i 13 mg druge smjese u kojima se nalaze i oksimi nastali zbog nusprodukata formiranja položaja 5 na tiofenu. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE/E do najvećeg udjela E od 35 %.

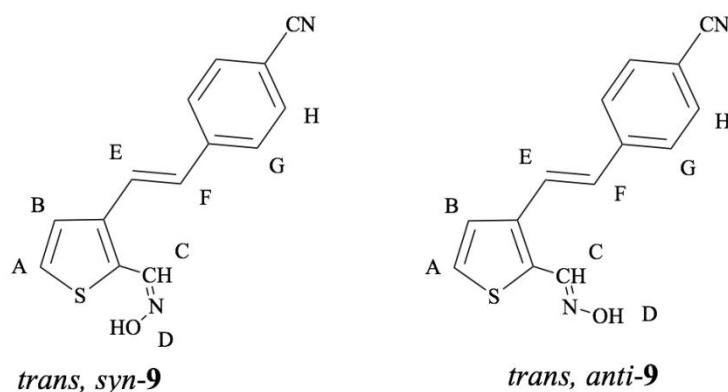


4-((*Z*)-2-(2-((*Z*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril 4-((*Z*)-2-(2-((*E*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril

4-((*Z*)-2-(2-((*Z*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril (*cis,syn-9*): 62 mg, 43.7 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 75:25) = 0.58; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8.25 (s, 1H, H_C), 7.53 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.34 (s, 1H, H_D), 7.29 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.20 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H_A), 6.74 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6.70 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, H_B), 6.68 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 138.6 (d), 136.0 (s), 133.0 (s), 126.9 (d), 126.7 (s), 125.5 (d), 124.2 (d), 123.0 (d), 121.9 (d), 119.9 (d), 113.5 (s), 105.8 (s).

4-((*Z*)-2-(2-((*E*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril (*cis,anti-9*): 52 mg, 36.6 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 75:25) = 0.24; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7.75 (s, 1H, H_C), 7.50 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.47 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, H_A), 7.24 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 6.83 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 6.79 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, H_B), 6.75 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 143.8 (d), 141.1 (s), 139.8 (s), 138.3 (s), 132.1 (d), 130.8 (d), 129.5 (d), 128.3 (d), 127.1 (d), 125.7 (d), 118.7 (s), 111.0 (s).

Nastala sirova smjesa oksima *trans,syn-9*, *trans,anti-9* i nusprodukata odvojena je pomoću kolonske kromatografije. Uspješno je izoliran oksim *trans,syn-9* 90 %-tne čistoće i oksim *trans,anti-9* 92 %-tne čistoće što potvrđuju NMR spektri. Kao eluens je korišten prvo čisti PE, a zatim i smjesa PE/E do najvećeg udjela E od 30 %.



4-((*E*)-2-(2-((*Z*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril

4-((*E*)-2-(2-((*E*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril

4-((*E*)-2-(2-((*Z*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril (*trans,syn-9*): 11 mg, 42.3 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 75:25) = 0.47; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8.53 (s, 1H, H_C), 7.65 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.57 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.36 (m, 4H), 6.98 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 148.7 (s), 143.6 (d), 141.4 (s), 132.6 (d), 129.2 (d), 127.6 (d), 126.9 (d), 125.5 (d), 123.4 (d), 121.2 (s), 118.9 (s), 111.1 (s).

4-((*E*)-2-(2-((*E*)-(hidroksiimino)metil)tiofen-3-il)vinil)benzonitril (*trans,anti-9*): 15 mg, 57.7 % izoliranog spoja, R_f (PE:E = 75:25) = 0.22; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 8.05 (s, 1H, H_D), 7.72 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.69 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, $\text{H}_{\text{G/H}}$), 7.64 (s, 1H, H_C), 7.60 (s, 1H, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7.49 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$), 7.46 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, $\text{H}_{\text{A/B}}$), 7.14 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, $\text{H}_{\text{E/F}}$).

4. ZAKLJUČAK

U okviru ovog završnog rada uspješno su sintetizirani i spektroskopski okarakterizirani novi 3-tienostilbenski oksimi **7-9**. Cijela sinteza ovih nenabijenih oksima sastojala se od tri reakcijska stupnja koja su redom: Wittigova reakcija, Vilsmeierovo formiliranje i prevođenje u oksim. Najlošija iskorištenja pokazala je reakcija formiliranja i stoga o ovom koraku ovisi ukupan ishod sinteze, tj. količina dobivenih produkata.

Ovakvim sintetskim koracima ukupno je dobiveno po četiri izomera oksima s jednakim supstituentom na benzenskom prstenu što ukupno čini 12 novih struktura oksima s različitim potencijalnim moćima reaktivacije inhibiranog enzima acetilkolinesteraze i svojstvima prolaska kroz krvno-moždanu barijeru što uvelike proširuje daljnja biološka ispitivanja.

Oksimi *cis,syn-7*, *cis,anti-7*, *trans,syn-7*, *trans,anti-7*, *cis,syn-9* i *cis,anti-9* dobiveni su u dovoljnim količinama za biološka ispitivanja nakon samo jedne provedene cijele sinteze, a bitno je spomenuti da masa potrebna za biološka ispitivanja iznosi čak 50 mg čistog spoja.

Ostali oksimi dobiveni su u dovoljnim količinama za potvrdu ^1H i ^{13}C NMR spektrima.

Najbolja iskorištenja reakcija i najlakša odvajanja izomera kolonskom kromatografijom pokazali su oksimi **7** koji sadrže metilnu skupinu na benzenskom prstenu.

Za oksime **8** koji sadrže klor kao supstituent na benzenu potrebno je provesti još barem jednu cijelu sintezu kako bi ih se dobilo dovoljno za daljnja ispitivanja što isto tako nije loš rezultat, tj. iskorištenja reakcija nisu zanemariva.

Primijenjeni sintetski put nije se pokazao kao najbolji za dobivanje oksima *trans,syn-9* i *trans,anti-9*, no ipak korisna je informacija da stereoselektivno više nastaje *cis*-oksima s cijano-supstituentom na benzenu.

Dobivene molekule u ovom završnom radu također otvaraju prostor novim istraživanjima i sintezama na području preparativne organske fotokemije.

5. LITERATURA

1. Faiz Norrrahim, M. N.; Idayu Abdul Razak, M. A.; Ahmad Shah, N. A.; Kasim, H.; Wan Yusoff, W. Y.; Halim, N. A.; Mohd Nohr, S. A.; Jamal, S. H.; Ong, K. K.; Zin Wan Yunus, W. M.; Feizal Knight, V.; Mohd Kasim, N. A. *RSC Adv.*, **2020**, 10, 4465–4489.
2. Renou, J.; Mercey, G.; Verdelet, T.; Păunescu, E.; Gillon, E.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon F.; Jean, L. *Chemico-Biological Interactions*, **2013**, 203, 81–84.
3. Hilmas, E.; Hilmas, C. J. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, **2015**, 1003–1034.
4. Quinn D. M.; Topczewski J.; Yasapala N.; Lodge A. *Molecules*, **2017**, 22, 1464.
5. Mercey, G.; Verdelet, T.; Renou, J.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P. Y. *Accounts of Chemical Research*, **2012**, 45, 756–766.
6. Antonijevic, E.; Musilek, K.; Kuca, K.; Djukic-Cosic, D.; Vucinic, S.; Antonijevic, B. *Neurotoxicology*, **2016**, 55, 33–39.
7. Stojiljković, M. P.; Jokanović, M. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **2006**, 57, 435–443.
8. Jokanović, M.; Prostran, M. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, 16, 2177–2188.
9. Gallagher, E.; Minn, I.; Chambers, J. E.; Searson, P. C. *Fluids Barriers CNS*, **2016**, 13, 10
10. Salinas, S.; Schiavo, G.; Kremer, E. J. *Nature Reviews Microbiology*, **2010**, 8, 645–655.
11. Pardridge, W. M. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2012, 32, 1959–1972.
12. Zhou, Y.; Peng, Z.; Seven, E. S.; Leblanc, R. M. *J. Controlled Release*, **2018**, 270, 290–303.
13. Crawford, L.; Rosch, J.; Putnam, D. J. *J. Controlled Release*, **2016**, 240, 251–266.
14. Korabecny, J.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Andrs, M.; Duong Nguyen, T.; Jun, D.; Musilek, K.; Kucerova-Chlupacova, M.; Kuca, K. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2014**, 14, 215–221.
15. Karasova, J. Z.; Zemek, F.; Bajgar, J.; Vasatova, M.; Prochazka, P.; Novotny, L.; Kuca, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2011**, 54, 1082–1087.
16. URL: <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/what-is-adme-336683> (pristup 29.6.2021.)
17. Mandlik, V.; Bejugam, P. R.; Singh, S. *Artificial Neural Networks for Drug Design, Delivery and Disposition*, **2016**, 123–139.
18. Chambers, J. E.; Meek, E. C.; Chambers, H. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2016**, 1374, 52–58.

19. De Koning, M. C.; van Grol, M.; Noort, D. *Toxicol. lett.*, **2011**, 206, 54–59.
20. Kalisiak, J.; Ralph, E. C.; Zhang, J.; Cashman, J. R. *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 3319–3330.
21. Kalisiak, J.; Ralph, E. C.; Cashman, J. R. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 465–474.
22. Kuca, K.; Jun, D.; Musilek, K. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2006**, 6, 269–277.
23. Mercey, G.; Verdelet, T.; Saint-Andre, G.; Gillon, E.; Wagner, A.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P. Y. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 5295–5297.
24. Zorbaz, T.; Braiki, A.; Maraković, N.; Renou, J.; de La Mora, E.; Maček Hrvat, N.; Katalinić, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Mercey, G.; Gomez, C. *Chem.-Eur. J.*, **2018**, 24, 9675–9691.
25. Kovarik, Z.; Maček, N.; Sit, R. K.; Radić, Z.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Taylor, P. *Chem.-Biol. Interact.*, **2013**, 203, 77–80.
26. Kliachyna, M.; Santoni, G.; Nussbaum, V.; Renou, J.; Sanson, B.; Colletier, J. P.; Arboleas, M.; Loiodice, M.; Weik, M.; Jean, L.; Renard, P. Y. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 78, 455–467.
27. Wei, Z.; Liu, Y. Q.; Zhou, X. B.; Luo, Y.; Huang, C. Q.; Wang, Y. A.; Zheng, Z. B.; Li, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 5743–5748.
28. Wei, Z.; Liu, Y. Q.; Wang, Y. A.; Li, W. H.; Zhou, X. B.; Zhao, J.; Huang, C. Q.; Li, X. Z.; Liu, J.; Zheng, Z. B.; Li, S. *Toxicol. Lett.*, **2016**, 246, 1–6.
29. Wei, Z.; Liu, Y. Q.; Wang, S. Z.; Yao, L.; Nie, H. F.; Wang, Y. A.; Liu, X. Y.; Zheng, Z. B.; Li, S. *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 4497–4505.
30. Patching, S. G. *Mol. Neurobiol.*, **2017**, 54, 1046–1077.
31. Garcia, G. E.; Campbell, A. J.; Olson, J.; Moorad-Doctor, D.; Morthole, V. I. *Chem.-Biol. Interact.*, **2010**, 187, 199–206.
32. Puček I., Sinteza i karakterizacija novih oksimskih derivata heterostilbena kao potencijalnih reaktivatora kolinesteraza (diplomski rad) (2020)

