

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Valentina Bušić

Nove ekološki prihvatljive metode kvaternizacije derivata piridina

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sv--učilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Nove ekološki prihvatljive metode kvaternizacije derivata piridina

Valentina Bušić

Disertacija je izrađena u: Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku
Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu

Mentor/i: Izv.prof. dr.sc. Spomenka Kovač

Kratki sažetak doktorske disertacije:

U ovom su radu izvedene reakcije kvaternizacije piridoksal-oksima sa serijom supstituiranih fenacil-bromida primijenom novih, ekološki prihvatljivijih metoda. Kvaterne su soli piridoksal-oksima sintetizirane pod utjecajem mikrovalnog zračenja na dva načina; u otapalu (acetonu) i suhim postupkom te metodom mehanosinteze uz minimalnu količinu otapala. Izvedene su također i kvaternizacije pod utjecajem mikrovalnog zračenja na piridinu, α -pikolinu, piridin-4-aldoksimu, piridin-2-aldoksimu, nikotinamidu i izonikotinamidu pomoću različitih elektrofila: 2-brom-4'-nitroacetofenona, 2-amino-4-klormetiliazol hidroklorida, metil-jodida, 1,3-dijodpropana i 1,3-dibrompropana. Pripravljenim je analogima piridoksal-oksima ispitana sposobnost reaktivacije acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) inhibirane bojnim otrovima VX-om i tabunom te pesticidom paraoksonom. Ispitana je također i reverzibilna inhibicija AChE i BChE sintetiziranim oksimima. Nekim je sintetiziranim spojevima ispitana i potencijalna antimikrobna aktivnost na dvije Gram-pozitivne i dvije Gram-negativne bakterije.

Broj stranica: 132

Broj slika: 11

Broj shema: 49

Broj tablica: 52

Broj literaturnih navoda: 123

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antibakterijska aktivnost, kvaterne piridinijeve soli, kvaternizacija, mehanokemijske reakcije, mikrovalna sinteza, piridoksal-oksim, reaktivacija, zelena kemija

Datum obrane: 13. veljače 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Marina Ilakovac Kveder, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu
2. Izv. prof. dr. sc. Spomenka Kovač, umirovljena izvanredna profesorica Prehrambeno-tehnološkog fakulteta i Odjela za kemiju Sveučilišta u Osijeku, mentorica i član
3. Prof. dr. sc. Drago Šubarić, redoviti profesor Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, član
- 4.

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Chemistry

New ecological friendly methods of quaternization of pyridine derivatives

Valentina Bušić

Thesis performed at: Faculty of Food Technology in Osijek
Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb

Supervisor/s: Spomenka Kovač, associate professor

Short abstract:

In this thesis new eco-friendly methods of quaternization of pyridoxal oxime with substituted phenacyl bromides were successfully performed. A microwave induced quaternization in the presence of a solvent, solvent free approach, and solid state reaction LAG mechanochemistry were examined. Furthermore, reactions of quaternization were made under microwave heating of pyridine, α -picoline, pyridine-4-aldoxime, pyridine-2-aldoxime, nicotinamide and isonicotinamide with different electrophiles: 2-bromo-4'-nitroacetophenone, 2-amino-4-chloromethylthiazole hydrochloride, methyl iodide, 1,3-diiodopropane i 1,3-dibromopropane. In this work, the potential ability of synthesized oximes to reactivate acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibited by the nerve agents VX and tabun and pesticide paraoxon were explored. Reversible inhibition of AChE and BChE by synthesized oximes was also measured. Finally, some of synthesized compounds regarding their potential antimicrobial activity against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria were tested.

Number of pages: 132

Number of figures: 11

Number of schemes: 49

Number of tables: 52

Number of references: 123

Original in: Croatian

Key words: antimicrobial activity, green chemistry, mechanochemistry, microwave synthesis, pyridoxal oxime, quaternary pyridinium salts, quaternization, reactivation

Date of the thesis defense: 13. February 2015.

Reviewers:

1. Ph.D. Marina Ilakovac Kveder, Senior Researcher, Ruđer Bošković Institute, Zagreb
2. Ph.D. Spomenka Kovač, Retired Associate Professor, Faculty of Food Technology, University of Osijek
3. Ph.D. Drago Šubarić, Full Professor, Faculty of Food Technology, University of Osijek
- 4.

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju i biokemiju na Katedri za kemiju i ekologiju te Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju hrane na Katedri za biologiju i mikrobiologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Spomenke Kovač i u Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Najiskrenije zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Spomenki Kovač, na kontinuiranoj nesebičnoj pomoći, uloženom trudu i vremenu, stručnim i mudrim savjetima, razumijevanju i prijateljskoj pomoći te svemu što me naučila u organskoj kemiji.

Veliko hvala doc. dr. sc. Dajani Gašo-Sokač prvenstveno na stručnoj pomoći i bezuvjetnoj ljubavi u najtežim trenucima te na svakodnevnim iskricama radosti.

Veliko hvala prof. dr. sc. Jasni Vorkapić-Furač na korisnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Posebno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mariju Cetini sa Tekstilno-tehnološkog fakulteta u Zagrebu na određivanju kristalne i molekulske strukture sintetiziranih spojeva, kao i izv. prof. dr. sc. Hrvoju Pavloviću sa Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku na određivanju antibakterijskih svojstava priređenih spojeva.

Dr. sc. Zrinki Kovarik, znanstvenoj savjetnici i znanstvenoj suradnici dr. sc. Maji Katalinić sa Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu veliko hvala na ispitivanju reaktivacijskih svojstava priređenih spojeva.

Našoj dragoj tehničarki Bernardici Grabić toplo zahvaljujem za svu pruženu pomoć pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem obitelji: suprugu Darku, kćerki Miji, sinu Andreju te roditeljima na razumijevanju jer su mi bili snažan oslonac i podrška.

Zahvaljujem svojim bliskim prijateljima i ostalima na ohrabrirvanju i moralnoj podršci u izradi doktorske disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. DEFINICIJA I CILJEVI ZELENE KEMIJE	3
1.2. PRIPRAVA KVATERNIH SOLI SINTEZAMA UZ PRIMIJENU MIKROVALNOG ZRAČENJA.....	5
1.3. PRIPRAVA ORGANSKIH SPOJEVA MEHANOSINTEZOM	20
1.4. PIRIDINIJEVI OKSIMI KAO POTENCIJALNI ANTIDOTI.....	25
1.4.1. Struktura acetilkolinesteraze (AChE).....	25
1.4.2. Struktura butirilkolinesteraze (BChE).....	27
1.4.3. Inhibitori AChE i BChE - Organofosforni spojevi	28
1.4.4. Mehanizam inhibicije AChE OP spojevima te reaktivacije oksimima	30
1.4.5. Terapija protiv trovanja OP spojevima	31
1.5. PIRIDINIJEVI SPOJEVI KAO ANTIMIKROBNI AGENSI	33
2. CILJ RADA I HIPOTEZE.....	36
3. MATERIJALI I METODE	37
3.1. Sinteza polaznog spoja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (piridoksal-oksima) (1)	37
3.2. Priprava kvaternih soli piridoksal-oksima.....	38
3.2.1. Postupak u acetonu pod utjecajem MW zračenja (A)	39
3.2.2. Suhi postupak kvaternizacije pod utjecajem MW zračenja (B)	39
3.2.3. Postupak mehanosinteze (C)	39
3.3. Identifikacija sintetiziranih spojeva.....	40
3.4. Rentgenska strukturna analiza	41
3.5. Kvaternizacija različitih derivata piridina	42
3.6. Određivanje reaktivacijske sposobnosti pripremljenih spojeva	44
3.7. Reverzibilna inhibicija nativnih kolinesteraza oksimima.....	47
3.8. Određivanje antibakterijske aktivnosti pripremljenih spojeva	49
4. REZULTATI.....	51

4.1. Priprava polaznog spoja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (piridoksal-oksima) (1)	51
4.2. Sinteza kvaternih soli piridoksal-oksima MW zračenjem i mehanosintezom.....	52
4.3. Obilježja sintetiziranih spojeva iz serije piridoksal oksima	53
4.3.1. Analiza spektara kvaternih soli piridoksal-oksima	58
4.4. Rentgenska strukturna analiza	59
4.5. Kvaternizacija različitih derivata piridina	63
4.5.1. Priprava 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijeva klorida (12)	64
4.5.2. Priprava 1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (13)	65
4.5.3. Priprava 2-metil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (14)	66
4.5.4. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (15).....	67
4.5.5. Priprava 3-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (16)	68
4.5.6. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (17)	69
4.5.7. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (18).....	70
4.5.8. Priprava 1-(3-brompropil)-4-karbamoilpiridinijeva bromida (19).....	71
4.5.9. Priprava 4-karbamoil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (20)	72
4.5.10. Priprava 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (21)	73
4.5.11. Priprava 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijeva jodida (22)	74
4.5.12. Analiza spektara kvaternih soli derivata piridina.....	75
4.6. Ispitivanja reaktivacijske sposobnosti pripremljenih oksima.....	79
4.7. Reverzibilna inhibicija AChE i BChE sintetiziranim oksimima.....	83
4.8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih spojeva	84
5. RASPRAVA	87
5.1. Priprava polaznog spoja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (piridoksal-oksima) (1)	87
5.2. Priprava kvaternih soli piridoksal-oksima.....	90

5.3.	Spektralna obilježja spojeva iz serije piridoksal-oksima.....	94
5.4.	Rentgenska strukturna analiza	95
5.5.	Kvaternizacija različitih derivata piridina	95
5.6.	Reaktivacija enzima sintetiziranim derivatima piridoksal-oksima.....	103
5.7.	Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima.....	108
5.8.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih spojeva	110
6.	ZAKLJUČCI.....	111
7.	LITERATURA	113
8.	SAŽETAK	123
9.	SUMMARY	124
10.	PREGLED KORIŠTENIH SIMBOLA I OZNAKA.....	125
11.	ŽIVOTOPIS	128

1. UVOD

Napredak znanosti i tehnologije uzrokovao je narušavanje ravnoteže u prirodi, što se očituje u klimatskim promjenama, nastajanju ozonskih rupa i nakupljanju nerazgradljivih organskih onečišćivača u svim dijelovima biosfere – atmosferi, vodi i zemljištu. Kako bi se omogućio održivi razvoj potrebno je pronaći ravnotežu između iskorištavanja prirodnih izvora, ekonomskoga rasta i očuvanja okoliša.

“Čisti” procesi su imperativ 21. stoljeća stoga je cilj ovoga rada bio izvesti reakcije kvaternizacije na različitim derivatima piridina prema principima zelene kemije (povećati učinkovitost organskih sinteza uz što manje nusprodukata, skratiti reakcijsko vrijeme, uporabiti sigurna otapala). Te metode još do sada nisu bile primjenjivane za ovu vrstu spojeva.

U prvom je dijelu ovog rada bilo potrebno izvesti organske sinteze kvaternih soli reakcijama kvaternizacije piridoksal-oksima (**1**) i supstituiranih fenacil-bromida ($R = H, C_6H_5, Cl, Br, F, CH_3, OCH_3, NO_2$) pomoću novih, ekološki prihvatljivih metoda: mikrovalnim zračenjem i mehanosintezom.

Cilj je bio izvesti također reakcije kvaternizacije na derivatima piridina pod utjecajem mikrovalnog zračenja pomoću različitih elektrofila: 2-brom-4'-nitroacetofenona, 2-amino-4-klormetiltiazol hidroklorida, metil-jodida, 1,3-dijodpropana i 1,3-dibrompropana.

Derivati piridina su odabrani zbog svoje potencijalne primjene kao antidota i baktericida.

Globalna teroristička prijetnja postala je svakodnevnica, a terorizam postaje jedan od najvećih sigurnosnih problema suvremenog svijeta. Biološko i kemijsko oružje je u prošlosti upotrebljavano u nekoliko navrata s različitim učincima pri čemu su za masovno uništenje ljudi upotrijebljeni živčani bojni otrovi (soman, sarin, tabun i VX). Takvi organofosforni spojevi (OP-spojevi) mogu inhibirati enzim acetilkolinesterazu vezanjem na njegovu aktivnu ili alosteričku stranu pri čemu se sprječava završni prijenos acetilkolina do kolinergične sinapse. Riješenje problema zaštite i liječenja pri trovanju raznim spojevima aktualno je i danas budući da još uvijek nije ponuđen antidot koji bi bio zadovoljavajuće djelotvoran u svim slučajevima trovanja. Budući da piridoksal-oksime sadrži sve bitne elemente dobrog reaktivatora inhibiranog enzima cilj je bio ispitati potencijalna svojstva reaktivacije

acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze inhibirane organofosfornim spojevima VX-om i tabunom te pesticidom paraoksonom. U okviru ovih ispitivanja cilj je bio ispitati i reverzibilnu inhibiciju enzima sintetiziranim oksimima.

Poznato je kako kvaterne piridinijeve soli posjeduju određeno biološko djelovanje prema mikroorganizmima pa je u tu svrhu bio cilj ispitati antimikrobna svojstva nekih od sintetiziranih spojeva pomoću najčešćih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Od Gram-pozitivnih bakterija izabrani su enterokoki i stafilokoki budući da čine normalnu floru crijevnog sustava, usne šupljine i sluznica u čovjeka. Oni su vrlo značajan uzročnik endokarditisa, infekcija mokraćnog sustava i bolničkih infekcija (sepe, intraabdominalnih i intrapelvičnih infekcija). *Staphylococcus aureus* su nesporogene bakterije najotpornije na nepovoljne uvjete okoline. Tipični su oblici stafilokoknih infekcija lokalne infekcije na koži, a vrlo su česte postoperativne infekcije kirurških rana i opekotina. Stafilokoki mogu izazvati tešku upalu pluća i gnojni meningitis (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995).

Od Gram-negativnih su bakterija odabrane bakterije *Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas syringae*. Salmonele su crijevni paraziti kralježnjaka, patogeni za čovjeka i mnoge životinjske vrste. Vrlo su otporne na štetne utjecaje okoline te mogu dugo preživjeti izvan organizma domaćina, u vodi i u tlu, kamo dospijevaju životinjskim ili ljudskim izmetom, a uzrokuju tri tipa bolesti: gastroenteritis, crijevnu groznicu i sindrom sepe (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).

Pseudomonas syringae je široko rasprostranjen na zeljastim i drvenastim biljkama. Kao patogeni i najveći parazit u voćaka smatra se ekonomski štetnom bakterijom budući da uzrokuje različite bakterioze voćaka (Lagriffoul i sur., 2010.). Najčešći su prenositelji fitopatogenih bakterija čovjek, insekti, životinjski organizmi, voda i zračne struje (Tarkowski i Veerecke, 2014.; Morris i sur., 2008.; Agner i sur., 2000.; Lagriffoul i sur., 2010.).

1.1. DEFINICIJA I CILJEVI ZELENE KEMIJE

Zelena kemija kao propulzivno područje istraživanja pokušava pronaći i održati ravnotežu između korištenja prirodnih izvora, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša. Da bi se sačuvali prirodni izvori i okoliš stvara se nova generacija znanstvenika i tehnologa koji na ekonomskoj osnovi analiziraju procese i materijale uporabljene u proizvodnji i razvoju. Čisti procesi kao imperativ kemijskih i inih industrija u XXI stoljeću uključuju i primjenjuju principe zelene kemije u svim aspektima kemijskih znanosti, u fundamentalnim i primijenjenim istraživanjima, u proizvodnji i obrazovanju (Jukić i sur., 2004.). Zelena kemija je po definiciji Američke agencije za zaštitu okoliša (EPA-e) definirana kao kemija koja osmišljava kemijske proizvode i procese neškodljive za okoliš, te na taj način sprečava nastajanje onečišćenja. Kemijski proizvodi bi trebali biti napravljeni tako da na kraju njihove primjene ne ostaju u okolišu i da se razgrade na komponente neškodljive za okoliš. Uštede temeljene na učinkovitim sintezama bez primjene egzotičnih reagensa, smanjenju potrebne energije i zamjeni organskih otapala vodom značajne su čak i na laboratorijskoj razini, dok su u industrijskim mjerilima moguće milijunske uštede (Vojvodić, 2009.). Svaka reakcija, koja se može nazvati zelenom, treba imati tri zelene komponente: otapalo, reagens/katalizator i utrošak energije. Ciljevi zelene kemije u zaštiti okoliša i ekonomskoj dobiti ostvaruju se kroz nekoliko dominantnih pravaca kao što su kataliza, biokataliza, uporaba alternativnih obnovljivih sirovina (biomasa), alternativnih reakcijskih medija (voda, ionske kapljevine, superkrične tekućine), alternativnih reakcijskih uvjeta (aktivacija mikrovalnim zračenjem, mehanokemijom i ultrazvukom) kao i novim fotokatalitičkim reakcijama (Jukić i sur., 2005.; Margetić, 2005.).

Temeljena na 12 načela, po definiciji zelena kemija je program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju supstancija opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš (tablica 1.1.).

Tablica 1.1. 12 načela zelene kemije (Anastas i Warner, 1998.).

1.	Mjere opreza	Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.
2.	Ekonomija atoma	Tok kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod.
3.	Sinteza manje opasnih kemikalija	Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš.
4.	Stvaranje sigurnih kemikalija	Kemijske proizvode treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost.
5.	Sigurnija otapala i pomoćne tvari	Uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstava za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće.
6.	Dizajn za učinkovitu energiju	Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
7.	Uporaba obnovljivih rezervi	Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.
8.	Smanjenje derivata	Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštićivanje funkcionalnih skupina, privremene modifikacije fizikalno- kemijskih procesa itd.).
9.	Ekološki prihvatljivi katalizatori	Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama.
10.	Dizajn za razgradnju	Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u proizvode neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja.
11.	Realno vrijeme analiza za sprečavanje zagađenja	Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
12.	Sigurnija kemija za sprečavanje nesreća	U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

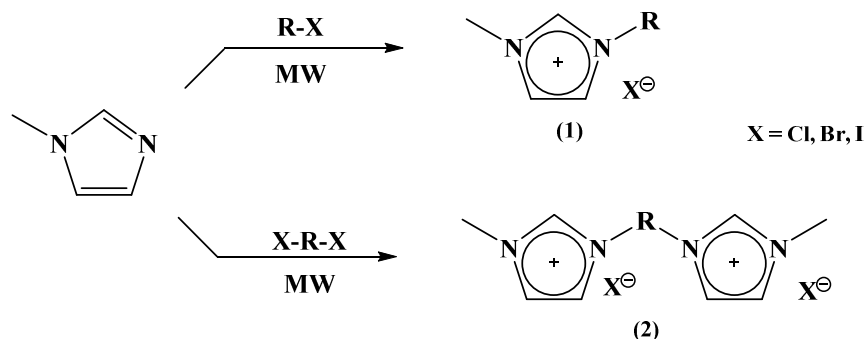
1.2. PRIPRAVA KVATERNIH SOLI SINTEZAMA UZ PRIMIJENU MIKROVALNOG ZRAČENJA

Aktivacija mikrovalnim (MW) zračenjem kao nekonvencionalnim energetskim izvorom danas je popularna i korisna tehnologija u organskoj kemiji. Mikrovalno ili dielektrično zagrijavanje se primjenjuje kao alternativa klasičnom zagrijavanju, a temelji se na svojstvu materije (tekućina i krutina) da apsorbira elektromagnetsku energiju i pretvara je u toplinu. To otvara velike mogućnosti primjene u kemiji i kemijskom inženjerstvu.

Prednosti mikrovalne u odnosu na klasičnu sintezu su u znatnom skraćenju reakcijskog vremena (s nekoliko sati ili dana na nekoliko minuta), boljem iskorištenju i smanjenju udjela nusprodukata. Nadalje, MW-zagrijavanjem moguće je provesti neke reakcije koje se klasičnim putem ne odvijaju. Prvi je rad iz tog područja objavio Gedye 1986. godine, a do danas je publiciran velik broj radova (Jukić i sur., 2005.; Kappe, 2004.; Sharma i sur., 2008.; Surati i sur., 2012; Tullberg i sur., 2004.; De la Hoz i sur., 2005.; Lidström i sur., 2001). Danas je organska sinteza sve više usmjerena prema razvoju ekološki prihvatljivih procesa koji čine temelje zelene kemije. Među njima istaknuto mjesto zauzimaju reakcije u kojima se ne rabe otapala. Te su reakcije našle i široku primjenu u mikrovalnoj sintezi zbog sigurnosti njihova provođenja u MW-pećnicama. Sintetske tehnike koje se često primjenjuju u MW-sintezi su reakcije u kojima se rabe nerazrijeđeni reagensi i reaktanti te sinteze na anorganskim nosačima. Prvi pokusi mikrovalne sinteze izvedeni su u kućnim mikrovalnim pećnicama, no reproducibilnost dobivenih rezultata je bila niska (Loupy, 2002.). Najveći nedostatak njihove primjene je promjenljiva snaga zračenja do koje dolazi zbog povremenog isključivanja izvora zračenja te stoga dolazi do neravnomjernog zagrijavanja reakcijske smjese. Ostali su nedostaci nemogućnost mjerenja temperature i tlaka, miješanja reakcijske smjese, nehomogenost elektromagnetskog polja, velike temperaturne razlike unutar kućišta, nemogućnost kontrole sigurnosti rada te mogućnost eksplozije (Zrinski i Eckert-Maksić, 2005.).

Varma i Namboodiri, 2001. godine su prvi izveli reakciju kvaternizacije metilimidazola (MIM) pomoću alkil-halogenida aktiviranu mikrovalnim zračenjem bez uporabe otapala u nemođificiranoj kućnoj mikrovalnoj pećnici. Na taj su način pripravili 1,3-dialkilimidazolijeve halogenide u kraćem vremenu i s boljim prinosima (tablica 1.2.). Priprava klasičnom metodom sinteze zahtijeva refluksiranje u određenim otapalima (najčešće tetrahidrofuranu) nekoliko sati da bi se dobili prihvatljivi prinosi te je potreban suvišak alkil-

halogenidca i znatna količina organskog otapala. Priprava mono- **(1)** i dikationskih 1,3-dialkilimidazolijevih halogenida **(2)** je prikazana na shemi 1.1.



Shema 1.1. Priprava mono- **(1)** i dikationskih **(2)** 1,3-dialkilimidazolijevih halogenida (Varma i Namboodiri, 2001.).

Tablica 1.2. Usporedba priprave alkilimidazolijevih halogenida u kućnoj mikrovalnoj pećnici i klasičnom sintezom (Varma i Namboodiri, 2001.).

Alkil-halogenid (RX)	RX (mmol)	MIM (mmol)	Vrijeme MW zračenja (s)	Prinos (%)	Prinos ^a
					klasičnom sintezom (%)
					Vrijeme (h)
1-brombutan	2,2	2	30 + 15 + 15 + 15	86	76 (5)
1-klorheksan	2,2	2	30 + 15 + 15 + 15+ 15	81	53 (5)
1-bromheksan	2,2	2	30 + 15 + 15 + 15	89	78 (5)
1-jodheksan	2,2	2	30 + 10 + 10 + 10	93	89 (3)
1-jodheptan	2,2	2	30 + 10 + 10 + 10	94	95 (3)
1-bromoktan	2,2	2	30 + 15 + 15 + 15	91	73 (5)
1,4-dibrombutan	1	2,2	30 + 15 + 15 + 15	81	76 (5)
1,4-dijodbutan	1	2,2	15+ 15 + 10 + 10	91	89 (3)
1,6-diklorheksan	1	2,2	30 + 15 + 15 + 15+ 15	82	56 (5)
1,6-dibromheksan	1	2,2	30 + 15 + 10 + 10	92	72 (5)
1,6-dijodheksan	1	2,2	15+ 15 + 10 + 10	85	97 (3)
1,8-dikloroktan	1	2,2	30 + 15 + 15 + 15+ 15	78	72 (5)
1,8-dibromoktan	1	2,2	30 + 15 + 15 + 15	92	76 (5)
1,8-dijodoktan	1	2,2	15+ 15 + 10 + 10	94	93 (3)

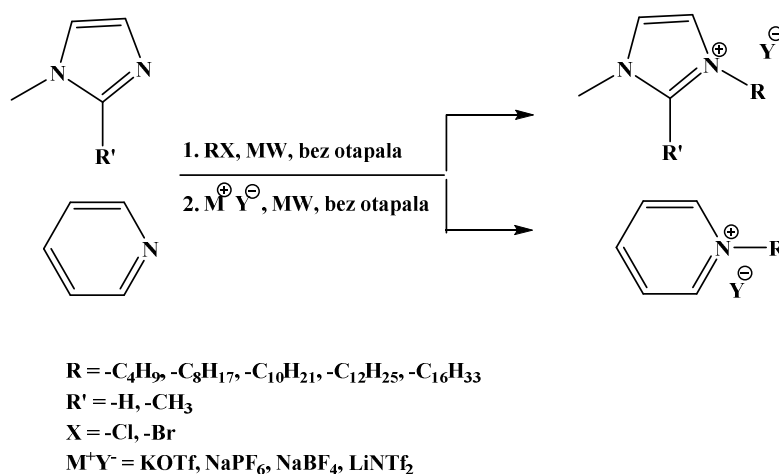
^a klasična metoda na uljnoj kupelji pri 80 °C, MIM - metilimidazol

Utvrđeno je da je ova metoda prikladna za pripremu ionskih kapljevina s dugim alkilnim lancima iz alkil-halogenida s višim temperaturama vrelišta. Reaktanti s nižom temperaturom vrelišta poput 1-brombutana bili su manje reaktivni zbog isparavanja reaktanta te su se stoga morali uzeti u suvišku. Reaktivnost alkil-halogenida opada u nizu $I^- > Br^- > Cl^-$. Najreaktivniji jodidi dali su izvrsne prinose pri minimalnoj aktivaciji MW zračenjem. Dikationske soli nastale iz dikloralkana i dibromalkana pod utjecajem MW zračenja bile su kontaminirane monokationskim intermedijarima (< 5 %). Međutim reaktivni dijodalkani dali su izrazito čiste spojeve. Potvrđeno je kako je kvaternizacija aktivirana mikrovalnim zračenjem dala čistije spojeve od klasičnog postupka.

Suhi postupci aktivirani mikrovalnim zračenjem podrazumijevaju nerazrijeđene reaktante čija je reakcija katalizirana različitim mineralnim podlogama poput aluminijskog oksida (Hossein i sur., 2003.), silikagela (Loghmani-Khouzani i sur., 2002.), montmorilonita (Gutiérrez i sur., 1989.) i drugih (Varma, 2006.).

Podaci termogravimetrijske analize i diferencijalne pretražne kalorimetrije (TGA i DSC) pokazuju kako su sve sintetizirane ionske kapljevine čiste bez prisutnosti polaznih materijala te da su termodinamički stabilne do temperature od 280 °C i u potpunosti se razlažu pri temperaturi od 300 °C.

Niz ionskih kapljevina pripremljeno je iz heterocikličkih spojeva s dušikom reakcijom kvaternizacije aktiviranom MW zračenjem bez uporabe otapala (shema 1.2.), (Aupoix i sur., 2010.).



Shema 1.2. Sinteza imidazolijevih i piridinijevih ionskih kapljevina pomoću MW zračenja bez otapala (Aupoix i sur., 2010.).

Relativna je reaktivnost slijedila očekivani trend S_N2 reakcije. Više su temperature te duže vrijeme reakcije bile potrebne za slabo odlazeću skupinu ($Cl^- < Br^-$) ili za dulje alkilne lance. Reakcije kvaternizacije koje su izvršene klasičnim putem imale su manje prinose (tablica 1.3.). Blagi suvišak alkil-halogenida (2 – 5 %) uporabljen je radi potpune konverzije.

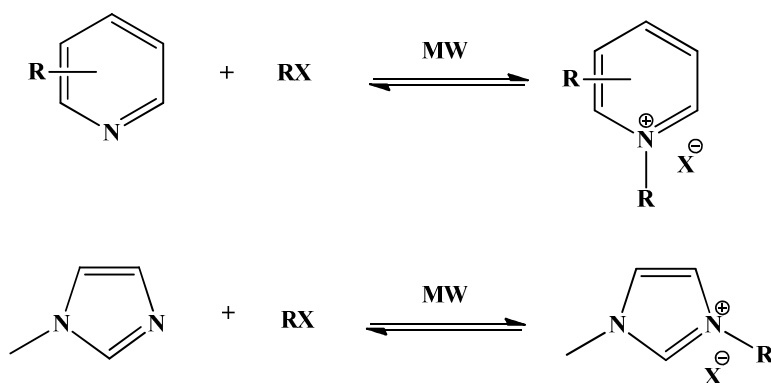
Tablica 1.3. *N*-alkiliranje 1-metilimidazola *n*-halogenalkanom aktivirano MW zračenjem (Aupoix i sur., 2010.).

RX	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Iskorištenje (%)	
			MW	Klasična
C ₄ H ₉ Br	8	90	89	73
C ₄ H ₉ Cl	15	150	95	38
C ₈ H ₁₇ Br	8	120	91	67
C ₈ H ₁₇ Cl	15	150	98	41
C ₁₀ H ₂₁ Br	8	130	97	68
C ₁₀ H ₂₁ Cl	15	160	96	36
C ₁₂ H ₂₅ Br	8	130	98	73
C ₁₂ H ₂₅ Cl	15	160	92	34
C ₁₆ H ₃₃ Br	15	140	98	51
C ₁₆ H ₃₃ Cl	30	160	98	29

Prva je reakcija metateze aktivirana MW zračenjem izvedena 2002. godine u kućnoj mikrovalnoj pećnici pri čemu su 1,3-dialkilimidazolijski tetrafluorborati dobiveni u dobrim prinosima nakon nekoliko minuta (Varma i sur., 2002.).

Isti su produkti pripremljeni pod utjecajem MW zračenja novijom i učinkovitijom metodom u kojoj, dvostepenom reakcijom, nakon kvaternizacije i metateze nastaju 1-alkil-2,3-dimetilimidazolijske i 1-alkilpiridinijeve soli u vrlo dobrim prinosima. Ova metoda ne uključuje izolaciju kvaternog produkta prije metateze već istovremeno produkt reagira sa anionskim reagensom. Utvrđeno je da priroda anionskog agensa nije utjecala na prinos produkta (Aupoix i sur., 2010.).

Khadilkar i Rebeiro, 2001. su izveli vrlo djelotvornu, brzu i praktičnu metodu kvaternizacije nekih alkil-halogenida piridinom, 1-metilimidazolom i lutidinom u modificiranoj kućnoj mikrovalnoj pećnici pri čemu su nastale alkilpiridinijeve i 1-alkil-3-metilimidazolijske soli (shema 1.3.). Klasičnom se metodom reakcija odvijala i do 72 h uz refluks u različitim otapalima (Carpio i sur., 1979.; Wilkes i sur., 1982.). Pri normalnom tlaku i aktivaciji MW zračenjem klorbutan je dao produkt samo u tragovima dok se s 2-fenil-etil-kloridom, bromheksanom i 2,6-lutidinom nije dogodila reakcija. Kada je reakcija provedena u zatvorenoj posudici pri povišenom tlaku, dobiveni su izvrsni prinosi. Zatvorena je posudica prikladna za regulaciju temperature i tlaka tijekom MW zračenja. Da bi se ispitaio utjecaj temperature na reakciju 1-klorbutana s piridinom i 1-metilimidazolom reakcija je izvedena pri tri različite temperature; 100 °C, 150 °C i 200 °C. Pri temperaturi od 100 °C te povišenom tlaku nije nastao produkt, a pri temperaturi od 150 °C postignuta je maksimalna konverzija do 1-butil-3-metilimidazolijske klorida. Pri jednakoj je temperaturi 1-butilpiridinijev klorid nastao samo u tragovima. Pri temperaturi od 200 °C 1-butilpiridinijev klorid nastao je u kvantitativnom prinosu. Kad je riječ o 1-butilpiridinijevu kloridu reakcijsko je vrijeme uvelike reducirano, sa 72 sata na 1 sat, a u slučaju 1-butil-3-metilimidazolijske klorida reakcijsko je vrijeme skraćeno sa 22 sata na 24 minute. Istraživanja pokazuju da 1-metilimidazol reagira brže od piridina (tablica 1.4.) .) (Khadilkar i Rebeiro, 2001.).



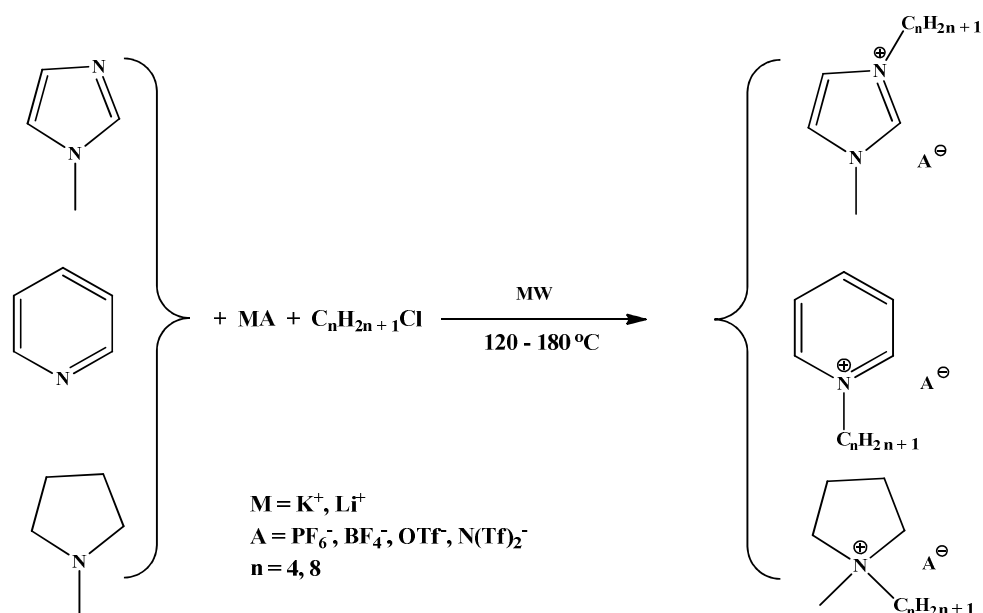
Shema 1.3. Priprava alkilpiridinijevih i 1-alkil-3-metilimidazolijskih soli (Khadilkar i Rebeiro, 2001.).

Tablica 1.4. Reakcija kvaternizacije 1-metilimidazola, piridina i lutidina aktivirana MW zračenjem (Khadilkar i Rebeiro, 2001.).

Amin	R-X	Vrijeme (min)		Temp (°C)	Tlak (kPa)	Prinos (%)
		x	y			
1-metilimidazol	1-klorbutan	2	22	150	393	91
1-metilimidazol	1-brombutan	2,5	-	105	-	99
1-metilimidazol	1-brompropan	1,6	-	85	-	90
Piridin	1-klorbutan	5	30	180	1248	66
		+1	24	200	1868	
piridin	1-brompropan	1	2	120	200	86
piridin	1-klorpropan	5	85	150	545	56
piridin	1-brombutan	2	13	120	69	97
		+2	3	150	221	
piridin	2-fenil-etil-klorid	5	55	200	386	98
piridin	1-bromheksan	2	28	120	34	90
2,6-lutidin	1-brombutan	5	55	200	1241	58
2,6-lutidin	1-klorbutan	5	55	200	1241	10
		+5	25	230	1317	
2,6-lutidin	1-brompropan	5	55	200	2268	83

(x - vrijeme potrebno za postizanje zadane temperature, y - vrijeme zadržavanja na zadanoj temperaturi, tlak - predstavlja najviši postignut tlak u reakciji)

Cravotto i suradnici, 2008. nekonvencionalnim su tehnikama poput aktivacije mikrovalnim zračenjem i ultrazvukom (UZ), te njihovom kombinacijom (MW/UZ) uspjeli pripraviti ionske kapljevine iz kloralkana i nekih klasičnih heterocikličkih spojeva: 1-metilimidazola, piridina i 1-metilpirolidina uz kraće reakcijsko vrijeme i bolji prinos (shema 1.4.). Za alkiliranje *N*-heterocikličkih spojeva kloralkanima potrebni su u klasičnoj sintezi drastični uvjeti. Kombinirana je MW/UZ tehnika obuhvaćala hlađenje u reaktoru u otvorenoj posudici pa se stoga nije mogla postići temperatura vrelišta piridina niti halogenalkana te je stoga i iskorištenje u kombiniranoj metodi bilo minimalno. Zbog toga je sinteza pod utjecajem MW zračenja 1-butil-3-metilimidazolijeva i *N*-oktilpiridinijeva klorida bila neuspješna. Iste su sinteze u zatvorenim posudicama pri višoj temperaturi (180 °C) izvedene uspješno uz prinose 98 % i 85 %. *N*-alkiliranje 1-metilpirolidina bilo je jako ovisno o temperaturi. Stoga je izvedeno pri tri različite temperature, 120 °C, 160 °C i 180 °C. Pri 120 °C nije nastao produkt, a pri 180 °C prinos je bio kvantitativan (tablica 1.5.).



Shema 1.4. Priprava ionskih tekućina *N*-heterocikala s kloralkanima te reakcija metateze kombiniranom MW/UZ metodom te MW metodom u zatvorenoj posudici (Cravotto i sur., 2008.).

Tablica 1.5. *N*-alkiliranje heterocikala klasičnom metodom, kombinacijom MW/UZ metode te metode u zatvorenoj posudici (Cravotto i sur., 2008.).

Heterocikl	Alikl-halogenid	Vrijeme (min)	MW snaga (W)	UZ snaga (W)	Temperatura (°C)	Prinos (%)
1-metilimidazol	1-ClC ₄	**60/240	-	-	140/180	95
1-metilimidazol	1-ClC ₄	150	120***	30	75	< 5
1-metilimidazol	1-ClC ₄	10/30	85	-	120/180	98
piridin	1-ClC ₈	**60/240	-	-	140/180	80
piridin	1-ClC ₈	180	60***	25	100	< 5
piridin	1-ClC ₈	10/30	85	-	120/180	85
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	**60/240	-	-	140/180	88
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	10/60	40	-	80/120	0
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	15/50	80	-	120/160	20
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	15/50	90	-	120/180	99

(**reakcije izvedene na uljnoj kupelji), (***)reakcije izvedene u hladnom reaktoru)

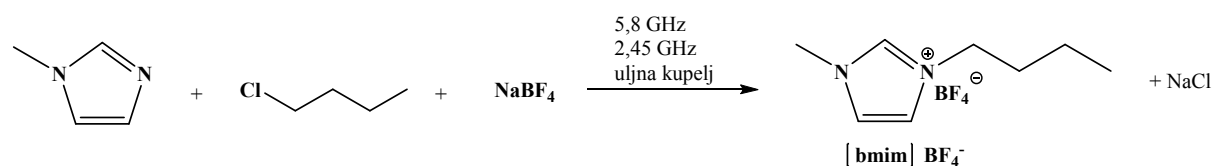
Alkil-kloridi, heterocikli i anionski reagensi stavljeni su u reaktor otporan na visok tlak i uz snažno miješanje ozračeni. Inicijalna je temperatura iznosila 120 °C 10 - 15 minuta, a zatim je porasla na 180 °C pri čemu se reakcija zbivala još 30 do 50 minuta. [C4mim][PF₆], [C4mim][BF₄] i [C4mim][OTf] dobiveni su u dobrim prinosima (72 – 90 %), a mnogo je niži prinos (62 %) dobiven za [C4mim][N(Tf)₂]. Takav je ishod protumačen niskim polarizacijskim stupnjem N(Tf)₂⁻ aniona te niskom osjetljivošću na MW zračenje. Dobri su prinosi (60 – 83 %) dobiveni za piridinske ionske kapljevine osim za [C8Py][N(Tf)₂] koje nije bilo moguće sintetizirati tom metodom. Prinosi 1-metilpirolidinskih ionskih kapljevine također su bili visoki (od 79 do 85 %; tablica 1.6.).

Tablica 1.6. MW sinteze ionskih kapljevine druge generacije (Cravotto i sur., 2008.).

Heterocikl	Alkil-halogenid	Anionski reagens	Vrijeme ozračivanja (min)	MW snaga (W)	Prinos (%)
1-metilimidazol	1-ClC ₄	KPF ₆	15/30	60	90
1-metilimidazol	1-ClC ₄	KBF ₄	10/30	55	72
1-metilimidazol	1-ClC ₄	KOTf	15/40	65	75
1-metilimidazol	1-ClC ₄	LiN(Tf) ₂	10/30	65	62
piridin	1-ClC ₈	KPF ₆	15/50	65	83
piridin	1-ClC ₈	KBF ₄	10/40	60	68
piridin	1-ClC ₈	KOTf	10/50	55	60
piridin	1-ClC ₈	LiN(Tf) ₂	15/50	65	Tragovi
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	KPF ₆	15/35	95	85
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	KBF ₄	10/45	113	81
1-metilpirolidin	1-ClC ₈	KOTf	10/45	104	79

*izvedene u zatvorenim reakcijskim posudicama pri temperaturama od 120 °C i 180 °C

Horikoshi i suradnici, 2008. ispitali su sintezu 1-butil-3-metilimidazolijeva tetrafluorborata [bmim]BF₄ reakcijom kvaternizacije triju reaktanata: 1-metilimidazola, natrijevoga tetrafluorborata te 1-klorbutana pri mikrovalnom zračenju i frekvenciji od 5,8 GHz i 2,45 GHz u uvjetima s refluksom i bez njega (shema 1.5.). Rezultati su potvrdili da se uz refluks pri mikrovalnom zračenju dobiju identični produkti kao i u klasičnoj sintezi uz minimalne prinose (tablica 1.7). Prinos [bmim]BF₄ u metodi bez refluksa nakon 30 minuta reakcije iznosio je 87 % pri frekvenciji od 5,8 GHz, a pri frekvenciji od 2,45 GHz iznosio je 28 %. U klasičnoj sintezi u uljnoj kupelji prinos je iznosio 21 %.



Shema 1.5. MW sinteza 1-butil-3-metilimidazolijeva tetrafluorborata [bmim]BF₄ (Horikoshi i sur., 2008.).

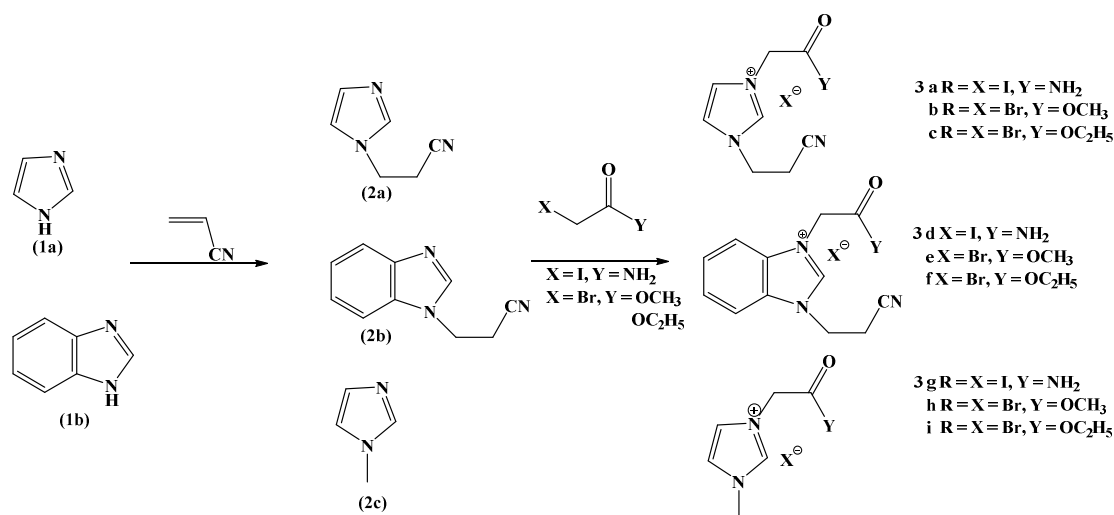
Tablica 1.7. Usporedba reakcijskih uvjeta i prinosa [bmim]BF₄ u postupku bez refluksa te uz refluks pri mikrovalnoj aktivaciji pri 5,8 GHz i 2,45 GHz te u klasičnoj metodi (Horikoshi i sur., 2008.).

	Vrijeme (min)	Bez refluksa		Refluks	
		Temp. (°C)	Prinos (%)	Temp. (°C)	Prinos (%)
5,8 GHz	15	125	tragovi	105	tragovi
	30	155	87	105	4
	60	169	84	105	8
2,45 GHz	15	138	tragovi	105	3
	30	204	28	105	8
	60	219	29	105	10
Uljna kupelj	15	133	tragovi	105	tragovi
	30	168	21	105	5
	60	176	25	105	12

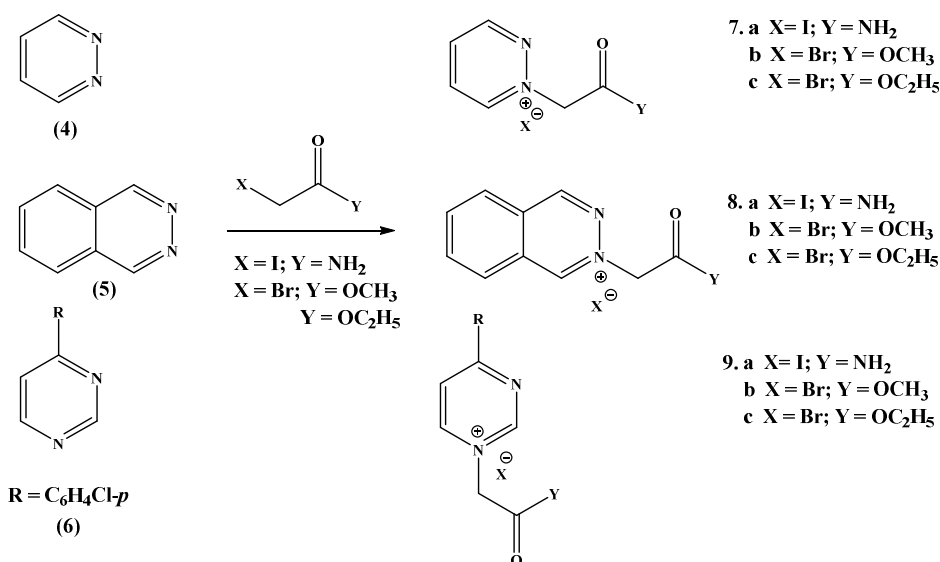
Zbancioc i suradnici, 2009. pripravili su seriju azaheterocikličkih soli alkiliranjem *N*-heterocikličkih spojeva s peteročlanim (imidazolnim derivatima, shema 1.6.) i šesteročlanim (pirimidinijevim, piridazinijevim i ftalazinijevim) spojevima (shema 1.7.) klasičnim putem i aktivacijom mikrovalnim zračenjem. Izvedeno je cijanoetiliranje kiselog dušikova atoma imidazola i benzimidazola Michaelovom adicijom akrilonitrila. U drugom je stupnju izvedena kvaternizacija sekundarnog dušikova atoma pomoću jodacetamida i metil- ili etil-bromacetata. Diazinijeve su soli također dobivene reakcijom kvaternizacije pirimidina, piridazina i ftalazina pomoću istih reagensa. Klasični su uvjeti zahtjevali dugo reakcijsko vrijeme (3 - 41 h), velik utrošak energije te veliku količinu otapala. MW zračenje uvelike je ubrzalo reakciju pri čemu se reakcijsko vrijeme znatno smanjilo u odnosu prema klasičnoj sintezi te je iznosilo od 5 do 15 minuta. Budući da je i reakcijska temperatura u nekim slučajevima smanjena za 10 do 30 °C, smanjio se i utrošak energije. Količina uporabljenog otapala bila je tri puta manja pa se takvoj reakciji pripisuju ekološka obilježja. Premda su prinosi u reakcijama aktiviranim MW zračenjem su bili jednaki ili neznatno viši vrijeme trajanja reakcije je uvelike smanjeno (tablica 1.8.).

Tablica 1.8. Sinteza azaheterocikličkih soli pri aktivaciji MW zračenjem i klasičnom metodom (Zbancioc i sur., 2009.).

Spoj	Klasična metoda			MW metoda		
	Vrijeme (h)	Temperatura (°C)	Prinos (%)	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Prinos (%)
3a X = I, Y = NH ₂	20	56	92	10	56	92
3b X = Br; Y = OCH ₃	20	56	84	10	56	87
3c X = Br; Y = OC ₂ H ₅	20	56	92	10	56	94
3d X = I, Y = NH ₂	25	56	60	15	56	82
3e X = Br; Y = OCH ₃	25	56	59	15	56	86
3f X = Br; Y = OC ₂ H ₅	25	56	87	15	56	88
3g X = I, Y = NH ₂	20	56	88	10	56	88
3h X = Br; Y = OCH ₃	20	56	70	10	56	87
3i X = Br; Y = OC ₂ H ₅	20	56	90	10	56	91
7a X = I, Y = NH ₂	3	80	86	5	70	89
7b X = Br; Y = OCH ₃	4	80	91	5	70	92
7c X = Br; Y = OC ₂ H ₅	3	80	94	5	70	94
8a X = I, Y = NH ₂	24	25	74	5	65	78
8b X = Br; Y = OCH ₃	32	25	89	5	65	89
8c X = Br; Y = OC ₂ H ₅	24	25	83	5	65	86
9a X = I, Y = NH ₂	32	112	70	10	80	74
9b X = Br; Y = OCH ₃	41	112	68	10	80	81
9c X = Br; Y = OC ₂ H ₅	32	112	66	10	80	80



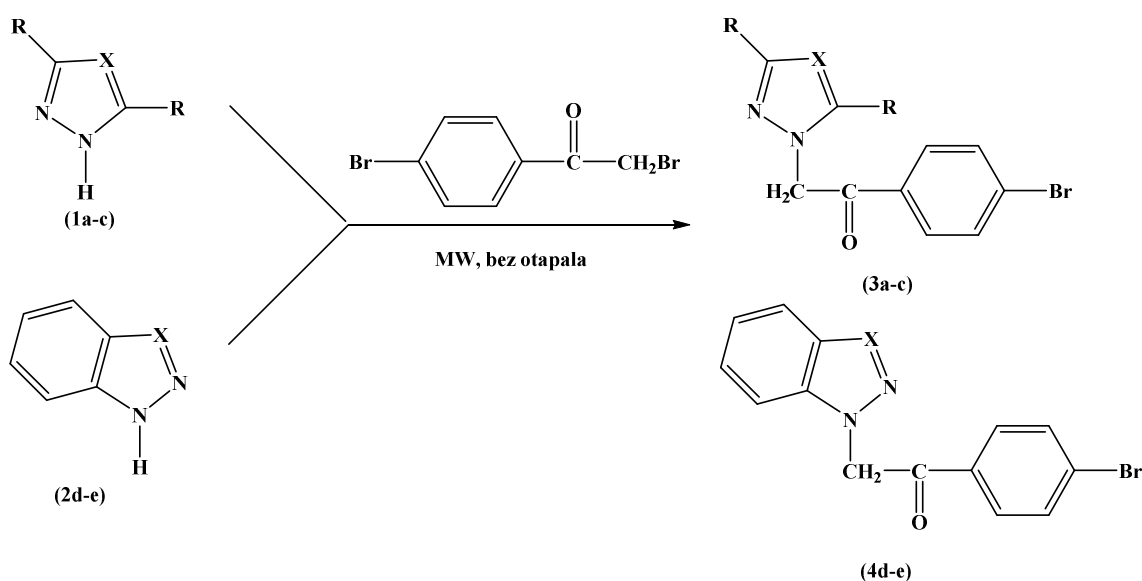
Shema 1.6. Sinteza imidazolijevih i benzimidazolijevih soli (Zbancioc i sur., 2009.).



Shema 1.7. Sinteza diazinijevih soli (Zbancioc i sur., 2009.).

Alkiliranje aktivirano MW zračenjem je osim na imidazolu i piridinu provedeno i na cijelom nizu ostalih heterocikličkih spojeva. Najveći su prinosi *N*-alkiliranja izatina različitim alkilnim, benzilnim i drugim elektrofilima dobiveni pomoću baza K₂CO₃ ili Cs₂CO₃ i nekoliko kapi *N,N*-dimetilformamida ili *N*-metil-2-pirolidona (Shmidt i sur., 2008.). Provedeno je i *N*-alkiliranje adenina, guanina i 6-aminotiouracila različitim benzil-halogenidima suhim postupkom u mikrovalnoj pećnici pri čemu su dobiveni produkti u visokom prinosu i visokoj selektivnosti na dušikovu atomu (Rodriguez i sur., 2001.; Vega i sur., 1999.).

Pérez i suradnici, 1996. opisali su jednostavnu i djelotvornu metodu pripreme pet 1-(4-bromfenacil)azola pod utjecajem mikrovalnog zračenja u uvjetima bez otapala. Reakcije kvaternizacije provedene su na pirazolu (**1a**), 3,5-dimetilpirazolu (**1b**), 1,2,4-triazolu (**1c**), indazolu (**2d**) i benztriazolu s 4-bromfenacil-bromidom (shema 1.8., tablica 1.9.). U svim su primjerima nastali samo *N*-1 alkilirani produkti kao posljedica odsutnosti otapala te ekvimolarnih udjela fenacil-bromida i azola. Rezultati pokazuju da je za alkiliranje 3,5-dimetilpirazola (**1b**) i 1,2,4-triazola (**1c**) bilo potrebno vrlo kratko reakcijsko vrijeme (3 - 6 minuta) te su dobiveni kvantitativni prinosi tako da nije bilo potrebno pročišćavanje produkta. Alkiliranjem indazola prinos *N*-1 alkiliranog produkta (**4d**) iznosio je 96 % te nije identificiran niti jedan drugi izomer, kako tankoslojnom tako ni plinskom kromatografijom. Ukupni je prinos benztriazola (**2e**) iznosio 95 % te je identificirano 80 % *N*-1 alkiliranog izomera (**4e**). Rezultati su bili vrlo zadovoljavajući jer je za vrlo kratko reakcijsko vrijeme dobiven visok prinos *N*-1 alkiliranih produkata uz niže troškove i veću selektivnost u odnosu prema klasičnoj metodi. Naime, u MW sintezi korišteni su ekvimolarni udjeli azola, a u klasičnim uvjetima omjer 4-bromfenacil-bromida i azola bio 1:1 i 1:2 (tablica 1.10).



	a	b	c	d	e
X	CH	CH	N	CH	N
R	H	CH ₃	H	-	-

Shema 1.8. Alkiliranje azola 4-bromfenacil-bromidom pod utjecajem mikrovalova (Pérez i sur., 1996.).

Tablica 1.9. Alkiliranje azola s 4-bromfenacil-bromidom pod utjecajem mikrovalova bez otapala), (Pérez i sur., 1996.).

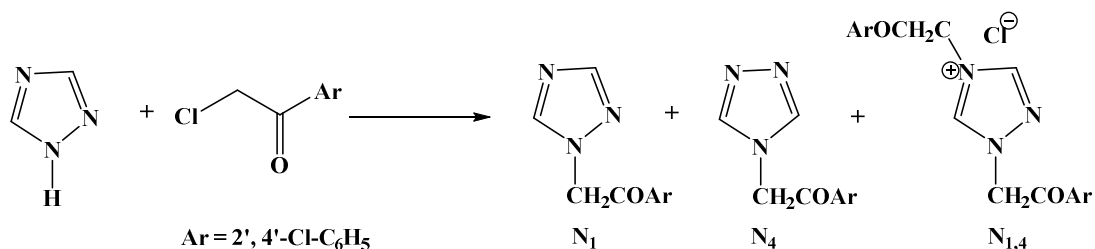
Supstrat	Reakcijsko vrijeme (min)	Temperatura (°C)	Produkti i prinosi (%)
1a	2	35-40	3a ≥98
1b	4	40-45	3b ≥98
1c	4	35-40	3c ≥98
2d	6	40-50	4d 96
2e	3	40-50	4e 80

Tablica 1.10. Usporedba *N*-alkiliranja pirazola i 1,2,4-triazola s 4-bromfenacil-bromidom klasičnom metodom (Δ) i mikrovalnom aktivacijom (MW) (Pérez i sur., 1996.).

Supstrat	Metoda	Molarni omjeri	Otapalo	Reakcijsko vrijeme (min)	Temp. (°C)	Prinos (%)
pirazol	Δ	1:2	MeOH	180	refluks	3a 37
pirazol	Δ	1:1	-	2	35-40	3a ≤ 2
pirazol	MW	1:1	-	2	35-40	3a ≥ 98
1,2,4-triazol	Δ	1:2	MeOH	150	refluks	3c 40
1,2,4-triazol	Δ	1:1	-	4	35-40	3c ≤ 2
1,2,4-triazol	MW	1:1	-	4	35-40	3c ≥ 98

Loupy i suradnici, 2001. istražili su utjecaj otapala na selektivnost alkiliranja 1,2,4-triazola pomoću 2,2',4-trikloracetofenona (shema 1.9.) u klasičnim uvjetima i aktivacijom MW-zračenjem. Neki autori smatraju da uz termičke/kinetičke učinke ubrzanju reakcije pridonose i tzv. netermički mikrovalni učinci. Netermičke su pojave posljedica neposredne interakcije električnog (*E*) polja s određenim molekulama u reakcijskoj smjesi. Primjerice, djelovanjem *E* polja dipolarne se molekule orijentiraju u smjeru polja, što dovodi do promjene u predeksponencijskom koeficijentu *A* ili do promjene u energiji aktivacije (*E_a*) u Arrheniusovoj jednadžbi. Autori su utvrdili kako je utjecaj reakcijskog medija bitan za selektivnost u reakcijama aktiviranim MW zračenjem pa je tako je utjecaj prirode otapala od

iznimne važnosti. Kod polarnih aprotičnih otapala poput DMF-a ili protičnih poput alkohola polarne će molekule apsorbirati MW zračenje te će doći do prijenosa energije s molekula otapala na reakcijsku smjesu i reaktante. Nepolarna su otapala propusna za MW zračenje što omogućuje reaktantima apsorpciju MW zračenja i pretvorbu energije iz elektromagnetske u termičku. U postupcima bez otapala, tzv. suhim postupcima, apsorpcija MW zračenja ograničena je samo na reaktante.



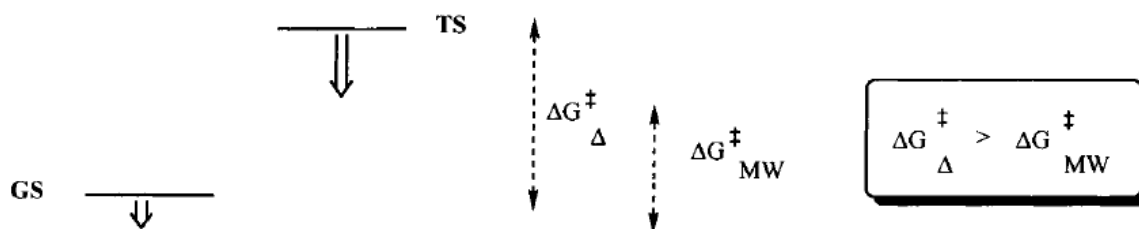
Shema 1.9. Selektivno fenaciliranje 1,2,4-triazola (Loupy i sur., 2001.).

Ispitivanja su provedena pri 140 °C u trajanju od 20 min klasičnim postupkom i pod utjecajem MW zračenja. Dokazano je da u polarnim otapalima (pentanol i DMF) nema MW utjecaja na regioselektivnost reakcije. Reakcija je bila potpuno regioselektivna pri aktivaciji MW zračenjem u ksilenu i uvjetima bez otapala, tzv. „suhom postupku“ (tablica 1.11., Loupy i sur., 2001.).

Tablica 1.11. Utjecaj otapala na regioselektivnost reakcije (MW zračenjem i pri klasičnoj metodi: pri temperaturi od 140 °C, 20 minuta), (Loupy i sur., 2001.).

Otapalo	Postupak	Konverzija	N ₁ /N ₄ /N _{1,4}
pentanol	MW	90	95/5/0
	Δ	90	95/5/0
DMF	MW	90	95/5/0
	Δ	90	95/5/0
<i>o</i> -ksilen	MW	82	100/0/0
	Δ	95	32/28/40
bez otapala	MW	92	100/0/0
	Δ	100	36/27/27

Što je molekula otapala polarnija djelotvornije pretvara mikrovalnu energiju u termičku. Specifični MW utjecaj na selektivnost očekuje se ako se reakcija provodi polarnim reakcijskim mehanizmom i ako polarnost raste od reaktanata prema prijelaznom stanju. Ako je stabilizacija prijelaznog stanja (TS) viša od osnovnog stanja (GS) povećava se reaktivnost i opada slobodna energija aktivacije (slika 1.1.).



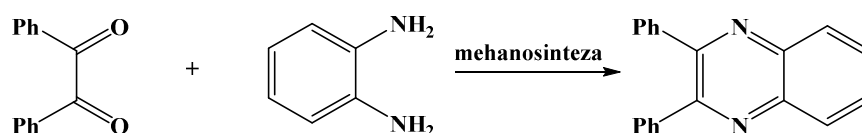
Slika 1.1. Relativna stabilizacija polarnijega prijelaznog stanja (Loupy i sur., 2001.).

U okviru ovoga rada izvršit će se fenaciliranje piridoksal-oksima djelovanjem MW zračenja bez otapala i u prisutnosti acetona kao otapala.

1.3. PRIPRAVA ORGANSKIH SPOJEVA MEHANOSINTEZOM

Mehanokemijske organske reakcije bez uporabe otapala nov su način priprave organskih spojeva. Provođenje kemijskih reakcija u takvim neklasičnim uvjetima dovodi do stvaranja posve neočekivanih produkata koji nastaju novim reakcijskim mehanizmima.

Znanstvenici su zelenim metodama (UV zračenjem, ultrazvukom te mehanosinteza) izveli sintezu kinoksalinskog derivata (shema 1.10.). Ultrazvučna je sinteza izvedena bez katalizatora te u prisutnosti katalizatora (CH_3COOH). Mehanokemijska je sinteza obuhvaćala jednostavno usitnjavanje ekvimolarnih količina *ortho*-fenilendiamina i benzila u tarioniku s tučkom. Za 10 – 12 minuta promijenila se boja te je nastao difenilkinoksalinski produkt. U svim su postupcima iskorištenja bila gotovo kvantitativna (tablica 1.12., Bendale i sur., 2011.).



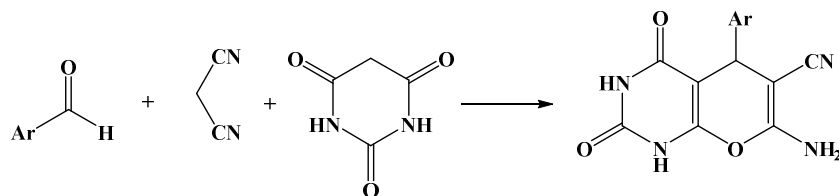
Shema 1.10. Mehanokemijska sinteza kinoksalinskog derivata (Bendale i sur., 2011.).

Tablica 1.12. Usporedba klasične metode i zelenih metoda dobivanja kinoksalinskog derivata (Bendale i sur., 2011.).

Metoda	Reakcijsko vrijeme (min)	Prinos (%)
klasična metoda	60-90	72-78
sinteza pod utjecajem UV zračenja	15	97
UZ sinteza bez katalizatora	15	97
UZ sinteza sa katalizatorom (CH_3COOH)	10	98
mehanosinteza	17	96

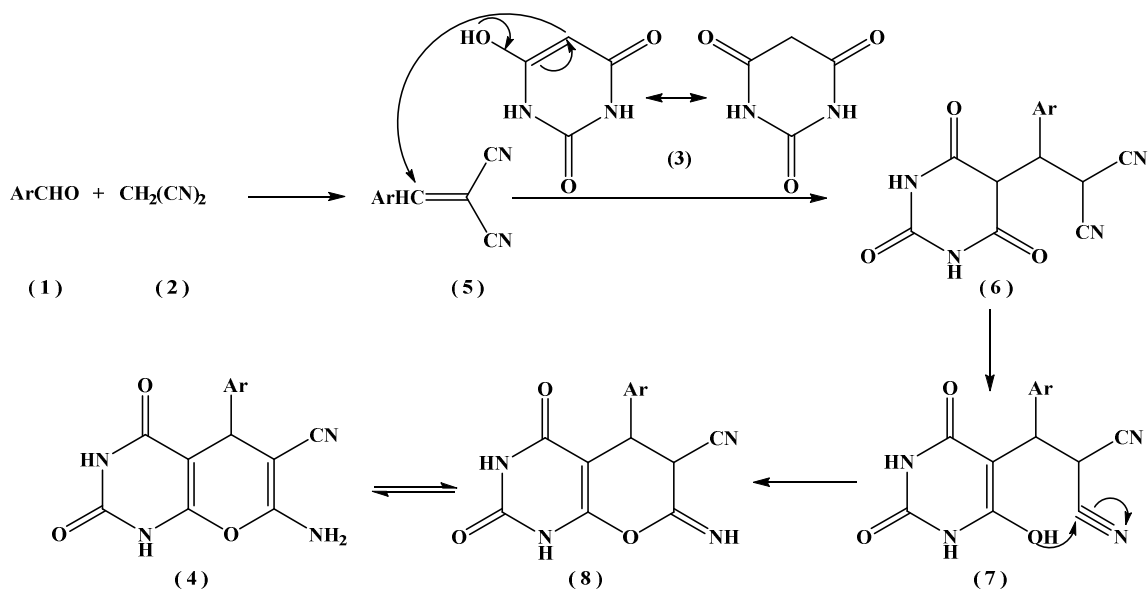
Saikia i suradnici, 2011. su izveli mehanokemijskim putem ekološki prihvatljivu mehanokemijsku sintezu alifatskih, heterocikličkih i aromatskih oksima. Konverzija karbonilnih spojeva tim putem do odgovarajućih je oksima postignuta jednostavnim usitnjavanjem polaznih materijala u tarioniku s tučkom bez otapala uz katalitičke količine Bi_2O_3 . Ta je metoda bila prikladna za aromatske, alifatske, heterocikličke i α,β -nezasićene aldehide jer su njihovi oksimi dobiveni u gotovo kvantitavnim iskorištenjima za vrlo kratko vrijeme (od 1,5 do 3 minute usitnjavanja). Zanimljivo je da je cinamaldehyd preveden do cinamaldehyd-oksima bez pregrađivanja α,β -nezasićene veze. Za ketone (acikličke i cikličke) bilo je potrebno dulje reakcijsko vrijeme (od 5,5 do 20 minuta). Najmanju reaktivnost pokazao je benzofenon koji je pomoću hidroksilamin hidroklorida preveden u benzofenon-oksime u 60 %-tnom iskorištenju (Saikia i sur., 2011.).

Sinteza pirano[2,3-d]pirimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-diona izvedena je bez otapala u mlinu s kuglicama i bez katalizatora (shema 1.11.) (Mashkouri i sur., 2009.). Ta metoda nije štetna za okoliš, jednostavna je i provodi se uz visoko iskorištenje. Općeniti je postupak pripreve pirano[2,3-d]pirimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-diona obuhvaćao reakciju aromatskih aldehida, malononitrila i barbiturne kiseline. U klasičnim uvjetima i pri MW zračenju u prvoj se fazi pripreve arilidenmalononitrili. Izravna kondenzacija aldehida, malononitrila i barbiturne kiseline izvedena je mehanokemijskim putem, odnosno usitnjavanjem polaznih tvari u stehiometrijskim količinama bez katalizatora i bez otapala (Saikia i sur., 2011.).



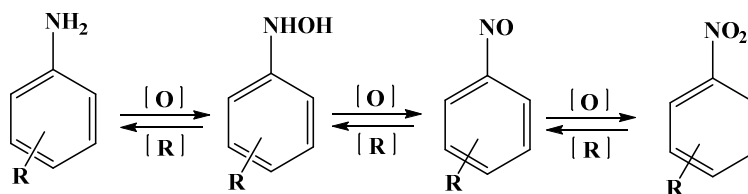
Shema 1.11. Kvantitativna priprava pirano[2,3-d]pirimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-diona (Mashkouri i sur., 2009.).

Mogući mehanizam koji su autori pretpostavili počinje Knoevenagelovom kondenzacijom aldehida (**1**) s malononitriplom (**2**) pri čemu se generira Michaelov akceptor. Reaktivni enolni oblik barbiturne kiseline (**3**) reagira zatim s benziliden-malononitriplom Michaelovom adicijom te nastaje intermedijer (**6**) koji keto-enolnom tautomerijom daje spoj (**7**). Intramolekularnom ciklizacijom spoja (**7**) nastaje spoj (**8**) te keto-enolnom tautomerijom nastaje konačni produkt (shema 1.12.).

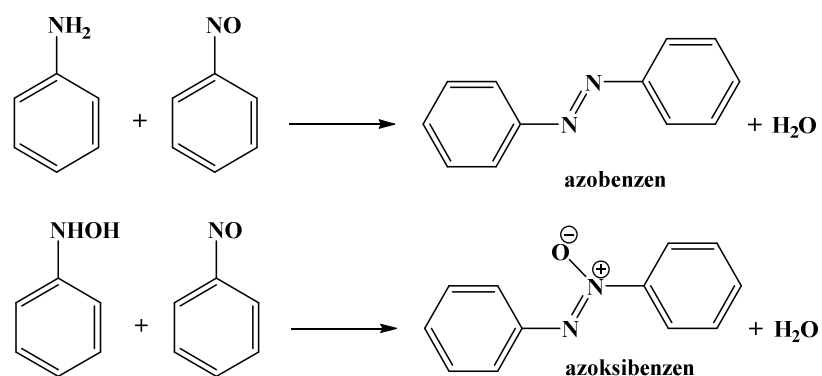


Shema 1.12. Mogući mehanizam priprave pirano[2,3-d]pirimidin(1*H*,3*H*)-diona (Mashkouri i sur., 2009.).

Često se nakon sinteze provedene u skladu s načelima zelene kemije u postupcima izolacije i pročišćavanja produkata rabe otapala koja su toksična. Huskić i suradnici, 2012. uspješno su izveli oksidaciju anilina suhim postupkom koji je potpuno usklađen sa zelenom kemijom jer ni u postsintetičkom stupnju nisu rabili otapala zahvaljujući visokom tlaku para nitrozobenzena. Oni su mehanokemijskim putem u mlinu s kuglicama od nehrđajućeg čelika pri frekvenciji od 25 Hz oksidirali supstituirane aniline pomoću kalijeva hidrogenperoksisulfata (Oxona), pri čemu su dobili odgovarajuće nitrozobenzenske produkte (shema 1.13) te azobenzen i azoksibenzen kao nusprodukt (shema 1.14.). Budući da nitrozobenzeni imaju visok tlak para, čisti su produkti dobiveni sublimacijom pri sniženom tlaku pa je tako cijeli postupak dobivanja produkta bez otapala potpuno usklađen sa zelenom kemijom.



Shema 1.13. Oksidacija i redukcija anilina do nitrobenzena i obratno (R = *p*-I, *p*-Br, *p*-Cl, *p*-NO₂, *p*-CH₃, *p*-OH, *p*-COOH) (Huskić i sur., 2012.).

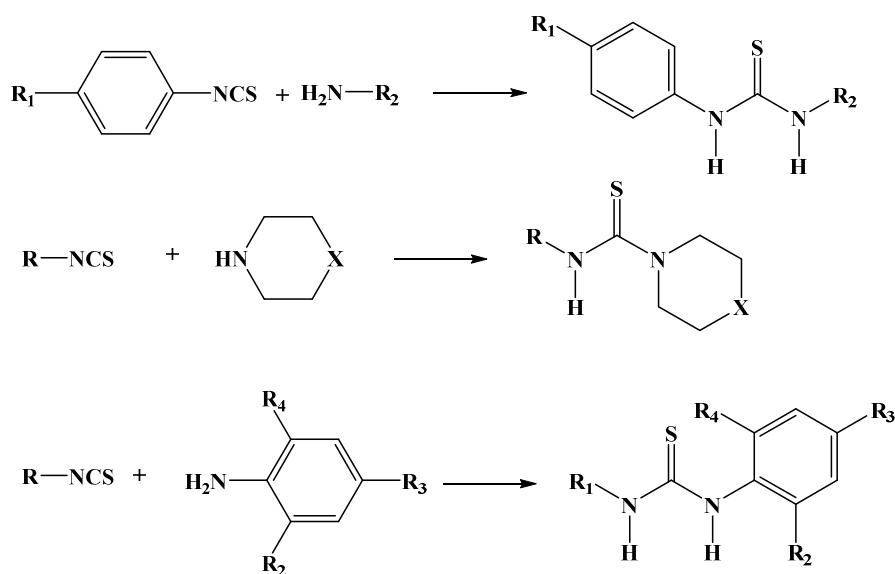


Shema 1.14. Nusprodukti u oksidaciji anilina (Huskić i sur., 2012.).

Također su ispitali mehanosintezu u prisutnosti minimalnih količina polarnih protičnih, polarnih aprotičnih i nepolarnih otapala (*liquid-assisted grinding* – LAG). U nekim je ispitivanjima potvrđeno kako minimalne količine otapala povećavaju reaktivnost (André, 2011., Štrukil i sur., 2010.), ali u ispitivanju Huskića i suradnika dokazano je da tragovi polarnih protičnih otapala smanjuju prinos i čistoću nitrozobenzena. Mehanokemijska sinteza u LAG uvjetima ipak je bila djelotvornija s aprotičnim i nepolarnim otapalima jer su polarna otapala uzrok veće količine nusprodukata (Huskić i sur., 2012.).

Štrukil i suradnici, 2012. su mehanokemijskim putem izveli reakciju kopulacije izotiocijanata i amina bez prisutnosti otapala pri čemu su produkti dobiveni u visokom iskorištenju istodobnim mljevenjem reaktanata. Provedena je sinteza 49 simetričnih i nesimetričnih derivata *N,N*-diaril- ili *N*-aril-*N'*-alkil tiouree. Kvantitativna je reakcija dokazana odsutnošću izotiocijanatne skupine u FTIR spektru. Kao predstavnici alifatskih amina odabrani su izopropilamin te 3-*N,N*-dimetilaminopropilamin. Svi su reaktanti upotrijebljeni u stehiometrijskim odnosima osim izopropilamina koji je uzet u suvišku. Budući da je većina reaktanata u tekućem stanju, najprije je istražena jednostavna metoda u tarioniku koja je također dala kvantitativne prinose. Iznimke u reakciji kopulacije bile su reakcije s elektrondonorskim skupinama na aromatskim izotiocijanatima (4-metoksifenil-izotiocijanat) čija su iskorištenja bila malo manja te s elektronima siromašnim aminima poput 4-klor- i 4-fluoranilina. Manji se prinos pripisuje manjoj elektrofilnosti izotiocijanatne skupine u 4-metoksifenil-izotiocijanatu te smanjenom nukleofilnom obilježju 4-

halogenanilina. U laboratorijskom mlinu s kuglicama postignuti su kvantitativni prinosi usitnjavanjem u trajanju od 10 do 30 minuta. Alifatski su amini vrlo dobri nukleofili koji lako daju odgovarajuće derivate tiouree, (prinosi 99 %). Zaključeno je da primjena laboratorijskih mlinova u mehanokemijskim sintezama poboljšava prinose do kvantitativnih razina bez obzira na to je li riječ o alifatskim ili aromatskim izotiocijanatima ili o aromatskim ili alifatskim aminima ili čak o sterički voluminoznim molekulama sekundarnih amina poput piperidina i morfolina (shema 1.15.).



Shema 1.15. Priprava N,N -disupstituiranih derivata tiouree kopulacijom amina i izotiocijanata (Štrukil i sur., 2012.).

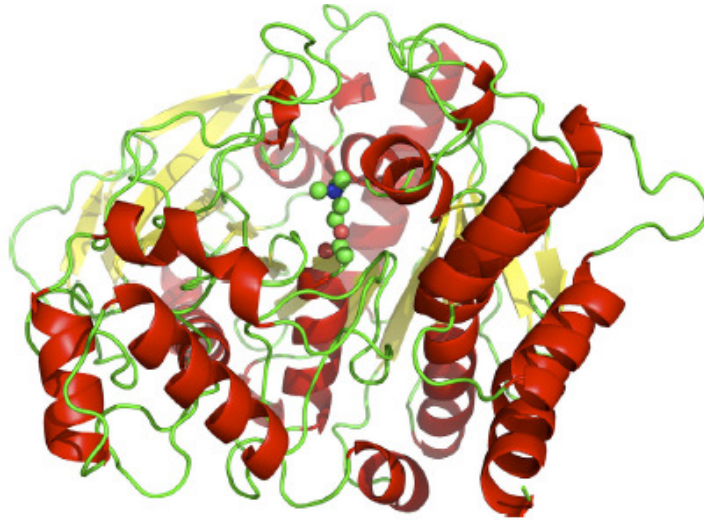
1.4. PIRIDINLJEVI OKSIMI KAO POTENCIJALNI ANTIDOTI

Liječenje trovanja organofosforim (OP) spojevima i danas je velik problem. Univerzalni lijek, protuotrov (antidot), koji bi djelovao pri visokom trovanju OP-spojevima, ne postoji. Stoga se testiraju i primjenjuju razni oksimi čije se djelovanje uspoređuje sa konvencionalnim antidotima da bi se vidjelo bi li oni mogli proširiti izbor spojeva koji su danas na raspolaganju u terapiji i prevenciji trovanja organofosfatima (Primožić i sur., 2004.). U novije vrijeme, radi pronalaženja djelotvornih antidota – reaktivatora inhibirane acetilkolinesteraze AChE, sintetiziraju se i ispituju nove klase oksima (piridinijevih, imidazolijevih, kinuklidinijevih oksima te derivati adamantana).

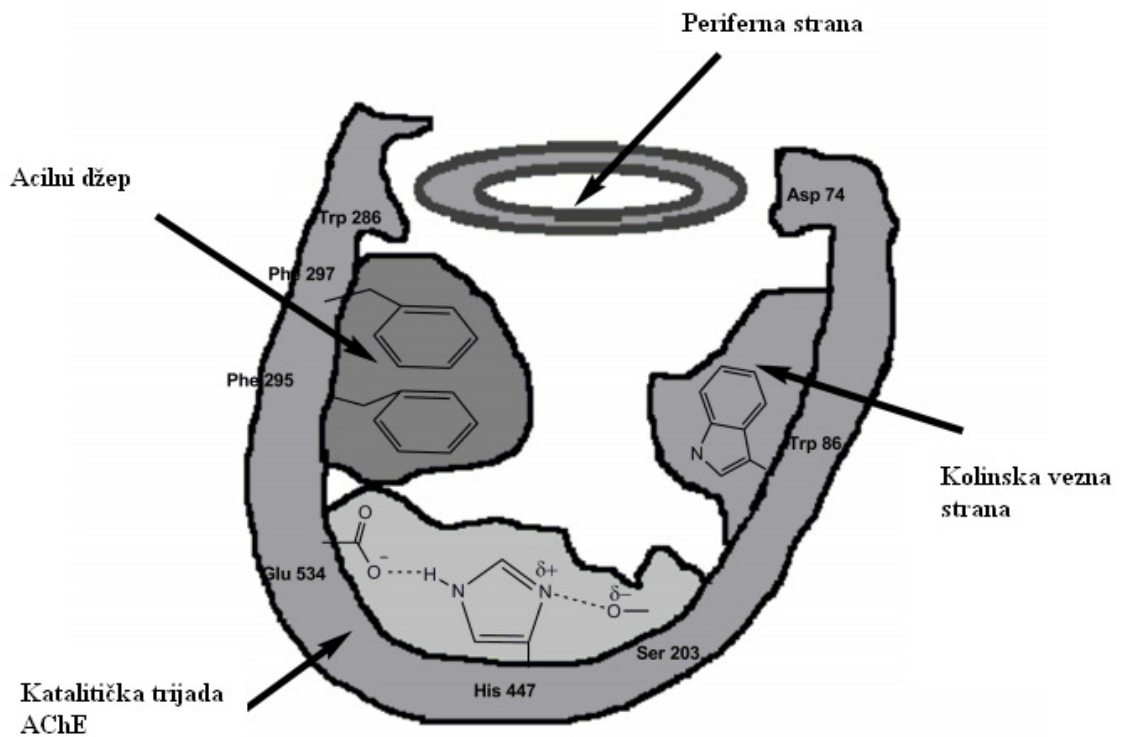
1.4.1. Struktura acetilkolinesteraze (AChE)

Acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) je enzim koji pripada skupini serinskih esteraza (slika 1.2.). Njezina je fiziološka uloga hidroliza transmitera acetilkolina (ACh) tijekom prijenosa živčanih impulsa. Redovito ju nalazimo u sinapsama te u živčanim i glija stanicama ljudskog mozga. Sintetizira se u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a uz živčane stanice, mišiće i mozak, AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite (Delfino i sur., 2009.).

Prva riješena trodimenzionalna struktura AChE (*Torpedo californica*, TcAChE) otkrila je da se katalitička trijada, slična onima u ostalim serinskim hidrolazama i proteazama, sastoji od sljedećih aminokiselina: Ser200, His440 i Glu327 (Silman i sur., 2008.). U TcAChE, katalitička se trijada nalazi na dnu 20 Å dubokog i uskog ždrijela. U samom aktivnom mjestu tri su područja odgovorna za interakciju enzima sa supstratom: vezno kolinsko mjesto (Trp86, Tyr337, Phe338), acilni džep (Phe 295 i Phe 297) i oksianionska šupljina (Gly121, Gly122 i Ala204; Sussman i sur., 1991.; Axelsen i sur., 1994.; Soreq, 2001.). AChE ima stalni dipol koji je paralelan s osi aktivnog mjesta ždrijela, što rezultira djelotvornim navođenjem pozitivno nabijenog supstrata kroz ždrijelo (Goncalves i sur., 2006.). To elektrostatsko navođenje supstrata rezultat je velikog dipolnog momenta samog enzima te pridonosi velikoj katalitičkoj učinkovitosti (Sussman i sur., 1991.; Axelsen i sur., 1994.; Quin, 1987.).



Slika 1.2. Struktura *TcAChE* s ACh vezanim u aktivnom mjestu (Silman i sur., 2008.).

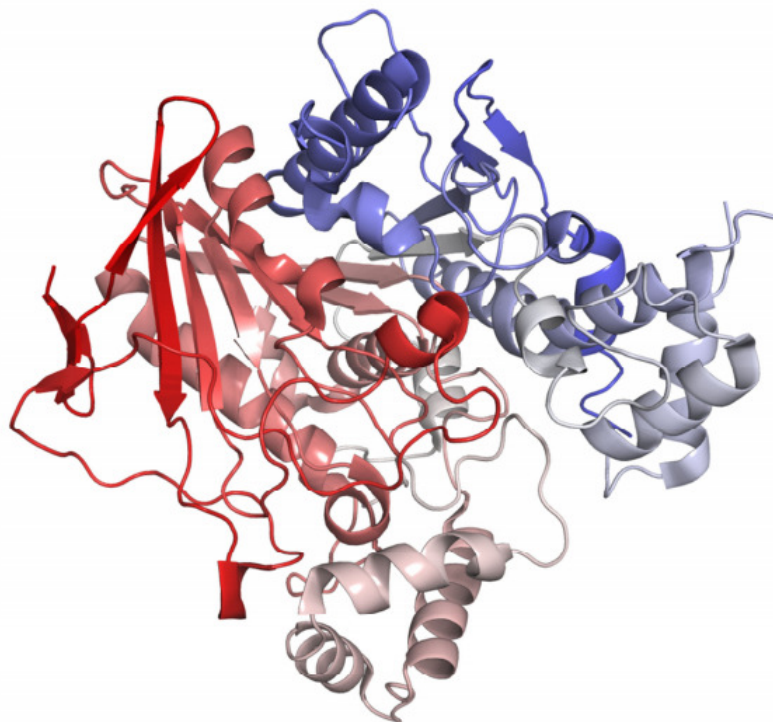


Slika 1.3. Struktura veznih strana u AChE (Čolović i sur., 2013.).

1.4.2. Struktura butirilkolinesteraze (BChE)

BChE (slika 1.4.) u višoj je koncentraciji prisutna u središnjem i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetrima. Iako je dokazano da BChE, kao i AChE, hidrolizira acetilkolin u sinapsi, njezin specifični fiziološki supstrat nije pronađen i time prava fiziološka uloga u organizmu još nije razjašnjena (Çokuğras, 2003., Mesalum, 2002.).

Poznato je da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva. Utvrđena je i pojačana ekspresija BChE kod neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest, no uloga tog enzima u patologiji bolesti nije potpuno razjašnjena. Nadalje, BChE sudjeluje u biokonverziji nekoliko farmakološki važnih spojeva tako da ih aktivira (bambuterol, heroin) ili deaktivira (sukcinildikolin, aspirin, kokain, amitriptilin; Çokuğras, 2003.; Saez-Valero, 2001.).

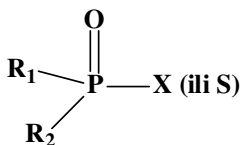


Slika 1.4. Kristalna struktura ljudske butirilkolinesteraze – BChE (Bosak i sur., 2011.).

1.4.3. Inhibitori AChE i BChE - Organofosforni spojevi

Organofosforni (OP) spojevi široko su primjenjivani kao pesticidi, insekticidi te živčani bojni otrovi. Opću strukturu OP spoja predložio je G. Schrader koji je sustavnom sintezom i ispitivanjem mnogih OP pesticida zapazio povezanost njihove biološke aktivnosti s njihovom strukturom. OP spojevi su esteri, anhidridi ili halogenidi potpuno supstituirane fosforne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Kod tih spojeva središnji atom fosfora mora biti peterovalentan, kisik ili sumpor moraju biti koordinirano-kovalentnom vezom vezani na peterovalentni fosfor (obično se ta veza prikazuje kao dvostruka), R₁ i R₂ mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-, mono- ili dialkil-aminogrupe (Bosak, 2006.; Eddleston i sur., 2002.; Subash i sur., 2010.).

OP insekticidi imaju istu opću formulu (slika 1.5.) kao visokotoksični živčani bojni otrovi (tablica 1.13.). Kod OP insekticida (tablica 1.14.) supstituirajuće skupine R₁ i R₂ uglavnom su metilna i etilna skupina, a X supstituirajuća skupina vezana je za atom fosfora putem kisikova ili sumpornoga mosta. Istodobno, u živčanim su bojnim otrovima supstituirajuće skupine R₁ i R₂ razgranate, a X supstituirajuća skupina je fluoridni ili cijanidni ion.



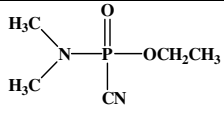
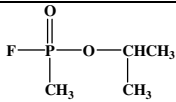
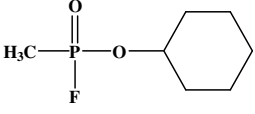
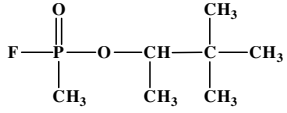
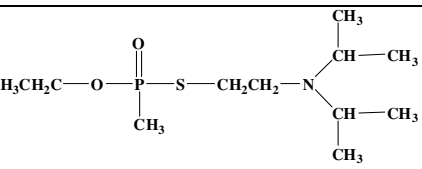
Slika 1.5. Opća strukturalna formula OP-spojeva.

X= O ili S; R₁, R₂ = alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, mono- ili dialkil - amino skupine;

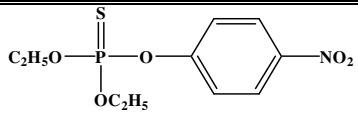
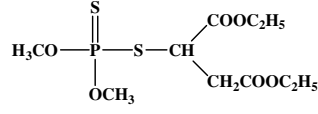
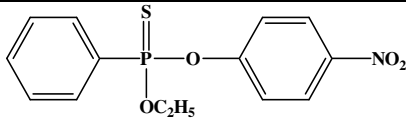
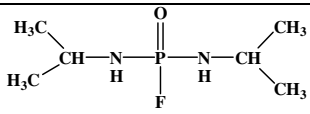
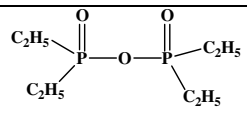
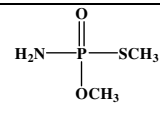
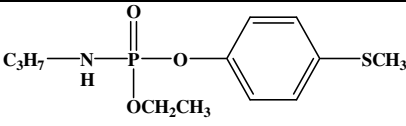
L= -F, -CN, -SR₃, -OR₃

U razvijenim su zemljama češća trovanja OP insekticidima (Antonijević i Stojiljković, 2007.). Danas se za suzbijanje prijenosnika zaraznih bolesti, poput malarije ili tifusa, rabe manje toksični pesticidi karbamatne strukture. U veterinarskoj se medicini OP spojevi rabe kao antiparazitici u liječenju shistosomijaze, a u humanoj se medicini primjenjuju za liječenje neuroloških bolesti (npr. miastenije gravis i Alzheimerove bolesti) te u okulistici za liječenje glaukoma (Raos, 2004.).

Tablica 1.13. Strukture nekih živčanih bojnih otrova, (Subash i sur., 2010.).

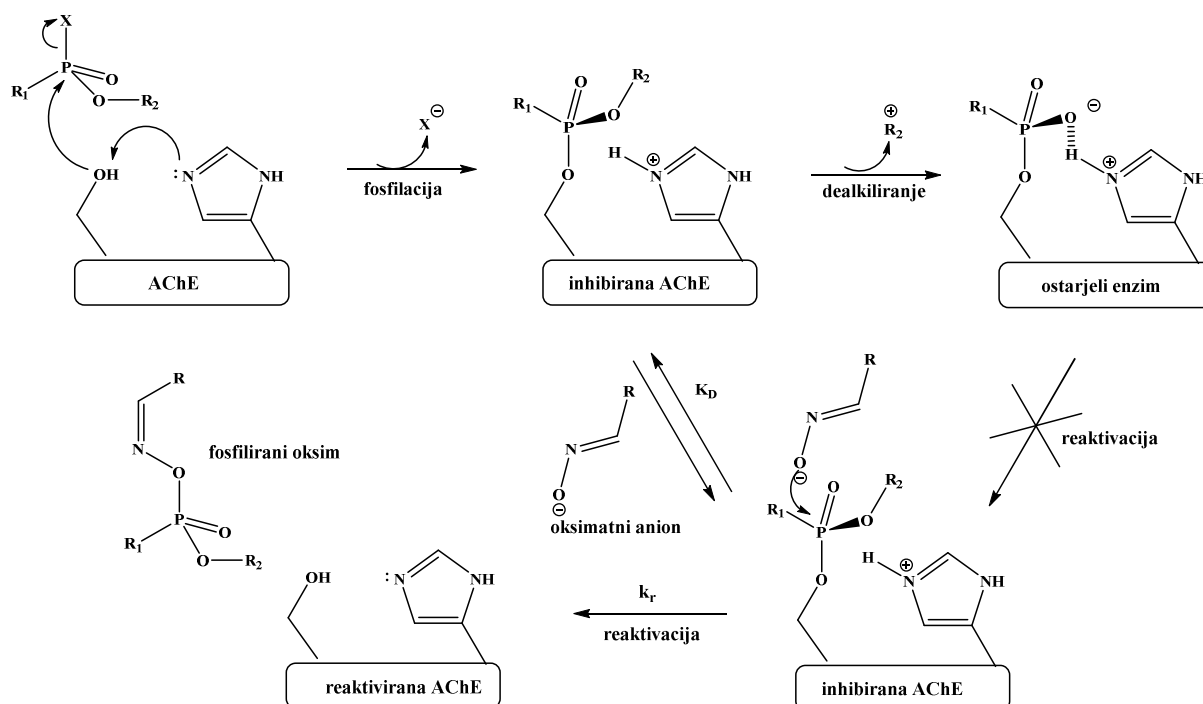
Uobičajeni naziv	Strukturna formula
tabun	
sarin	
ciklosarin	
soman	
VX	

Tablica 1.14. Strukture nekih organofosforinih insekticida, (Subash i sur., 2010.).

Uobičajeni naziv	Strukturna formula
paration	
malation	
EPN	
mipatoks	
TEPP	
metamidofos	
fenamifos	

1.4.4. Mehanizam inhibicije AChE OP spojevima te reaktivacije oksimima

Mehanizam toksičnog djelovanja OP insekticida identičan je mehanizmu toksičnog djelovanja ŽBO-a. Kod OP spojeva, analogno hidrolizi acetilkolina, prvi je korak fosfiliranje enzima (skupni naziv za fosforiliranje, fosfoniliranje i fosfiniliranje (shema 1.16.)). Razlika između hidrolize acetilkolina i hidrolize OP spojeva jest u brzini reakcije s vodom jer je deacetiliranje enzima mnogo brže od defosfiliranja. Defosfiliranje enzima, koje se često naziva i spontanom reaktivacijom, sporo je, a u nekim spojevima i ne postoji. Reaktivacija je brža s oksimima, koji su mnogo jači nukleofili od vode. Produkti hidrolize OP spojeva više nisu inhibitori acetilkolinesteraze. Osim reaktivacije, kod fosfilirane kolinesteraze može doći i do dealkiliranja jedne alkoksi skupine na fosforu, čime fosfilirani enzim dobiva negativan naboj koji vodi ili oksimima onemogućuje nukleofilni napad te takav enzim ostaje ireverzibilno inhibiran. Ta se pojava zove „starenje enzima“ (Bosak, 2006.). Primjer brzog starenja enzima starenje je AChE inhibirane somanom. U tom slučaju navedeni proces zahtijeva što raniju primjenu terapeutika (Raos, 2004.), (tablica 1.15.). Kako je poslije otkriveno, inhibicija kolinesteraza postiže se vezanjem spojeva nekovalentnim interakcijama (reverzibilna inhibicija) ili kovalentnim vezanjem za serin katalitičke trijade (ireverzibilna ili progresivna inhibicija; Silman i sur., 2000.; Holmstedt i sur., 2000.).

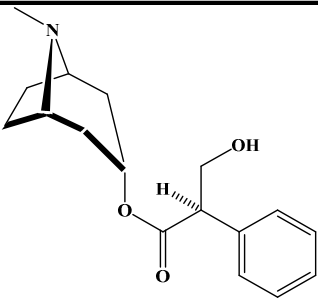
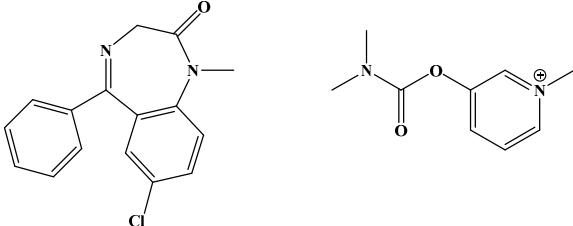
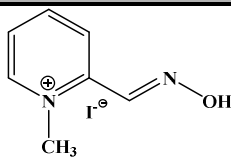
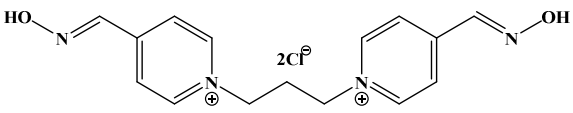


Shema 1.16. Inhibicija i reaktivacija AChE (Mercey i sur., 2012.).

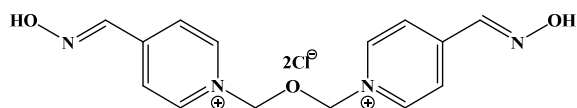
1.4.5. Terapija protiv trovanja OP spojevima

Terapija trovanja organofosforinim spojevima obuhvaća primjenu specifičnih spojeva (antidota) kao i primjenu klasičnih nespecifičnih i simptomatskih lijekova. U okviru specifične terapije primjenjuju se atropin kao antagonist muskarinskih receptora i oksimi kao reaktivatori inhibirane kolinesteraze. Konvencionalna terapija podrazumijeva i primjenu dopunskih lijekova poput diazepama i piridostigmina, koji su učinkoviti antikonvulzivi. Osim što sprečavaju konvulzije oni smanjuju i neželjene učinke na središnji živčani sustav, tablica 1.15., (Raos, 2004).

Tablica 1.15. Terapija protiv trovanja OP spojevima (Raos, 2004.).

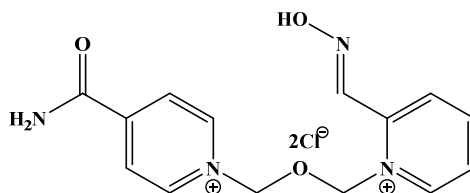
Spoj	Struktura	Zaštitno djelovanje
<p>antikolinergičke supstancije</p> <p>Atropin</p>		<p>ublažava utjecaj nakupljenog ACh</p> <p>ne sprječava inhibiciju AChE</p>
<p>antikonvulzivi</p> <p>diazepam i piridostigmin bromid</p>		<p>ublažavaju grčenje mišića</p>
Oksimi	Konvencionalni antidoti	
<p>PAM-2 pralidoksim</p>		<p>zadovoljavajući antidot sarinu i VX-u, ne reaktivira tabunom i somanom fosforiliranu AChE</p>
<p>TMB-4 trimedoksim</p>		<p>vrlo dobar antidot tabunu, sarinu i VX-u, kontraindiciran pri trovanju somanom</p>

**toksogonin
obidoksim**



vrlo dobar antidot
sarinu, VX-u i
različitim
pesticidima, antidot
tabunu,
kontraindiciran pri
trovanju somanom

HI-6



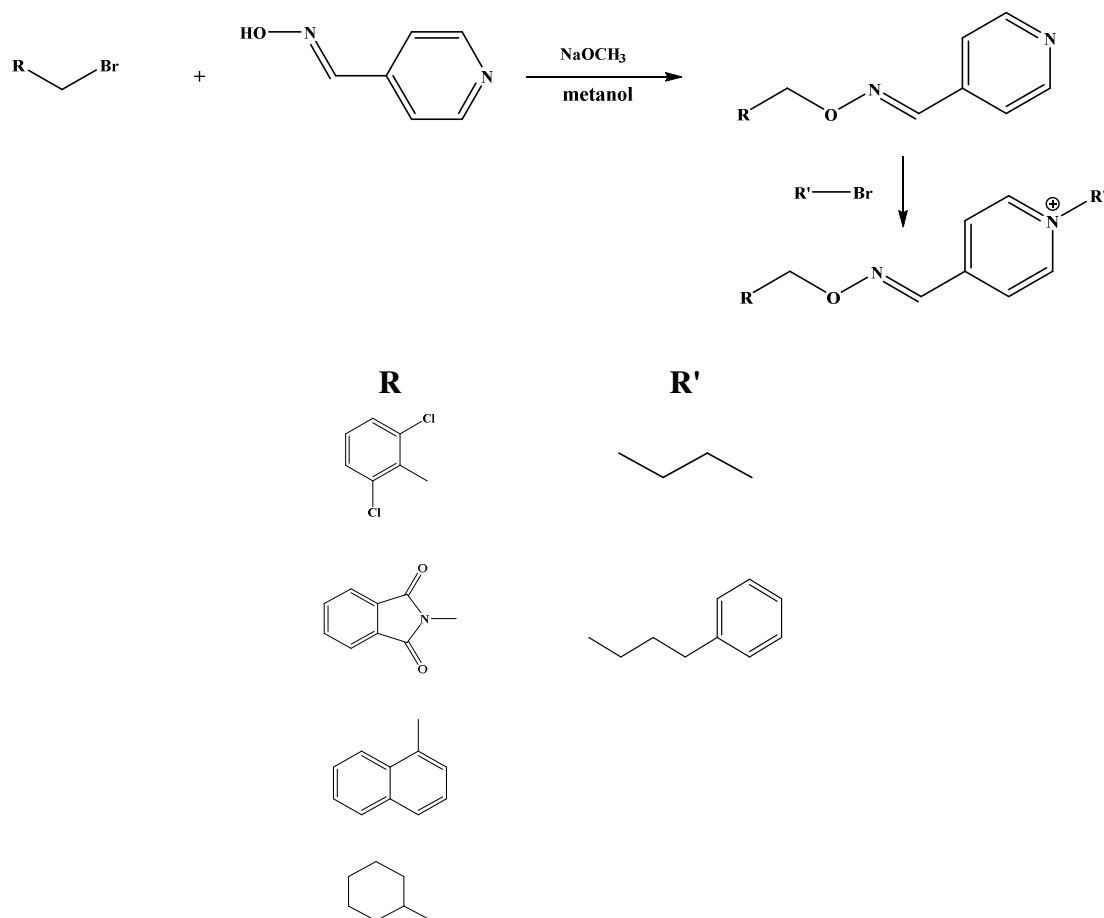
izvrstan antidot VX-
u, antidot sarinu i
somanu, slabo
djelotvoran pri
trovanju tabunom

1.5. PIRIDINIJEVI SPOJEVI KAO ANTIMIKROBNI AGENSI

Mnoga su istraživanja pokazala kako neki kvaternizirani derivati amina posjeduju antimikrobno, antiparazitno i antifungalno djelovanje (Thorsteinsson i sur., 2003.; Vnutskikh, 2006.; Ovchinnikova i sur., 2003.; Burke i sur., 1996.). Nekoliko kvaternih amonijevih spojeva, uključujući i piridinijeve soli s različitim duljinama lanaca, posjeduju antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama te nekim patogenim vrstama gljiva i praživotinja (Thorsteinsson i sur., 2003.). Alptüzün i sur., 2006. ispitali su antimikrobnu i antifungalnu aktivnost sintetiziranih etera piridinijevih oksima s naftilnim, ftalimidnim, 2,6-diklorfenilnim i cikloheksilnim prstenovima povezanim eterskim vezama i metilenskim poveznicama. Dušikov atom piridinskoga prstena kvaterniziran je propilnim i 3-fenilpropilnim lancima. Među svim ispitanim derivatima spojevi s naftilnim prstenom i 3-fenilpropilnim lancem pokazali su najjaču antimikrobnu aktivnost na mikroorganizme *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, pri čemu su inhibitorne koncentracije iznosile 312,5; 39,1; 9,8; 9,8 i 19,5 µg/mL (shema 1.17.). Svi su spojevi pokazali blago antimikrobno djelovanje na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije. Autori su pretpostavili kako je biološka aktivnost tih spojeva uvjetovana elektronskom gustoćom na dušikovu atomu piridinskog prstena te njegovom planarnom strukturom. Piridinijevi halogenidi kao kvaterni amonijevi spojevi posjeduju antimikrobna svojstva zbog adsorpcije na negativno nabijene krutine. Piridinijevi kationi zbog iznimne polarnosti pospješuju antibakterijsku aktivnost (Okazaki i sur., 1997.; Meada i sur., 1999.; Meada i sur., 1998.; Yoshida i sur., 2000.; Yoshida i sur., 2001.; Shirai i sur., 2003.).

Dokazano je kako su čimbenici koji kontroliraju njihovu antimikrobnu aktivnost molekularna hidrofobnost (Kourai i sur., 1983.; Kourai i sur., 1995.), adsorptivnost (Kourai i sur., 1983.), površinska aktivnost (Meada i sur., 1999.) i elektronska gustoća na piridinijevu dušikovu atomu (Meada i sur., 1996.; Okazaki i sur., 1996.). Istodobno, kvaterne piridinijeve soli mogu sadržavati planarne funkcionalne skupine koje se vežu s nukleinskim kiselinama i uzrokuju velike promjene na DNK i RNK strukturama (Nafisi i sur., 2007.). Umetanje spojeva između susjednih parova baza uzrokuje razvlačenje dvostruke uzvojnice (McCann i sur., 1975.). Vezanjem tih spojeva na dvostruku uzvojnici DNA inhibira širok opseg biološki

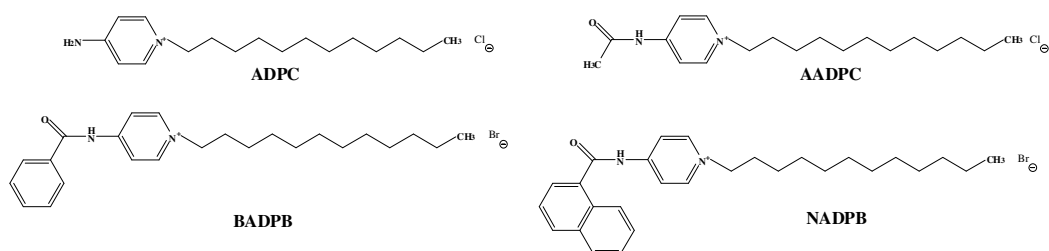
važnih funkcija, poput DNK sinteze, transkripcije i translacije gena (Nishiwaki i sur., 1974.; Guntaka i sur., 1975.; Kourai i sur., 1995.).



Shema 1.17. Struktura piridinijevih spojeva u istraživanju (Alptüzün i sur., 2006.).

Istraživanje Bharatea i suradnika, 2010. predstavlja *in vitro* antimikrobnu i antiparazitnu aktivnost serije kvaternih piridinijevih oksima. Dokazano je kako ispitani spojevi ne posjeduju antimikrobnu aktivnost ili je ona vrlo mala. Međutim, spojevi s tiofenskim i benzotiofenskim supstituentima na piridinskom prstenu pokazuju umjerenu antibakterijsku aktivnost prema bakteriji *Staphylococcus aureus*. IC₅₀ vrijednosti iznosila je 3,7 i 4,0 µg/mL. Niti jedan od biskvaternih piridinijevih spojeva nije pokazao niti antimikrobnu ni antiparazitnu aktivnost. Rezultat ovog ispitivanja pokazuje kako piridinijevi spojevi koji se rabe kao antidoti ne posjeduju značajnije antimikrobno i antiparazitno djelovanje te se ne mogu uporabiti za dodatnu antimikrobnu zaštitu.

Zhao i Sun, 2008. utvrdili su kako kvaterne amonijeve soli s dugim alkilnim lancima posjeduju antimikrobnu aktivnost prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama, pri razmjerno niskim koncentracijama. One su primijenjivane kao biocidi ili dezinficijensi u dezinfekciji tekstila, začina i u kućanstvu. Utvrđeno je kako je antimikrobni učinak povezan s duljinom alkilnog lanca (hidrofobne jedinice). Povećanje duljine lanca povećava hidrofobnost molekule, a time i afinitet prema fosfolipidnoj membrani. Također, jači afinitet prema lipidnom omotaču vanjske membrane pridonosi snažnijem biocidnom djelovanju. Kod Gram-pozitivnih bakterija antimikrobni se učinak povećava s duljinom lanca i dostiže maksimum pri spojevima s 12 i 14 C atoma, a kod Gram-negativnih bakterija optimalna je aktivnost postignuta za spojeve s 14 i 16 C atoma. Spojevi s duljinom lanca većom od 18 C atoma i manjom od 14 C atoma pokazali su se neaktivnima. Zhao i Sun su pripravili seriju kvaternih amonijevih soli poput 4-aminododecilpiridinijeva klorida (ADPC), 4-acetilaminododecilpiridinijeva klorida (AADPC), 4-benzoilaminododecilpiridinijeva bromida (BADPB) i 4-(1-naftoil)aminododecilpiridinijeva bromida (NADPB) s ciljem ispitivanja antimikrobne aktivnosti prema bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Spojevi su imali jednake duljine alkilnih lanaca, ali različitu sekundarnu hidrofobnu skupinu na položaju 4 piridinskog prstena (amino-, acetilamino-, benzoilamino-, i naftoilamino skupinu – shema 1.18.). Hidrofobnost tih skupina uvelike se razlikuje, od malih hidrofilnih amina do velikih voluminoznih naftoilamina.



Shema 1.18. Strukture ispitanih kvaternih amonijevih soli (Zhao i Sun, 2008.).

Rezultati su pokazali kako su voluminoznije skupine (NADPB) učinkovitije uništile obje bakterije. Najvišu baktericidnu aktivnost pokazale su kvaterne amonijeve soli s naftoilamino supstituentom na položaju 4 piridinskog prstena dakle, spoj koji posjeduje najveću aromatsku i najveću hidrofobnu skupinu. BADPB, spoj s benzoilamino skupinom je pokazao slabiju biocidnu aktivnost u usporedbi s NADPB-om. Naftoilna i benzoilna skupina omogućuju bržu interakciju i penetraciju piridinijskih soli kroz bakterijsku membranu, rezultirajući većim baktericidnim učinkom.

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

Cilj ovog rada je izvesti reakcije kvaternizacije piridoksal-oksima sa supstituiranim fenacil-bromidima ($R = Cl, Br, H, CH_3, NO_2, F, OCH_3, C_6H_5$) pomoću novih, ekološki prihvatljivijih metoda.

Reakcije kvaternizacije bit će izvedene mikrovalnim zračenjem bez otapala ili u prisutnosti otapala te miješanjem reaktanata u čvrstom stanju uz istovremeno usitnjavanje (mehanosinteza). U radu će biti izvedene i reakcije kvaternizacije piridina i njegovih različitih analoga poput α -pikolina, piridin-4-aldoksima, piridin-2-aldoksima, nikotinamida, izonikotinamida i piridoksal-oksima s različitim elektrofilima poput 2-brom-4'-nitroacetofenona, 2-amino-4-klormetiltiazol hidroklorida, metil-jodida, 1,3-dijodpropana i 1,3-dibrompropana. Svi produkti će biti identificirani spektroskopskim metodama (IR, ^{13}C -NMR i 1H -NMR), a metodom rentgenske strukturne analize bit će određena kristalna i molekulska struktura jednog od predstavnika te serije spojeva.

U navedenim će se sintezama pokušati zamijeniti postojeća organska otapala manje toksičnima ili uporabiti tzv. suhe postupke (bez otapala).

Pokušat će se skratiti reakcijsko vrijeme, smanjiti utrošak energije te postići bolji prinos i smanjiti udio nusprodukata u navedenim reakcijama. Utvrdit će se iz gore navedenih parametara ekološki najpovoljnije metode.

Ispitat će se potencijalna reaktivacijska svojstva sintetiziranih oksima na enzime AChE i BChE inhibirane organofosfornim spojevima VX-om i tabunom te pesticidom paraoksonom. Istražit će se također i reverzibilna inhibicija enzima pomoću sintetiziranih oksima.

Ispitat će se potencijalna antimikrobna svojstva nekih sintetiziranih spojeva.

Hipoteze

- U radu se očekuje da će se ekološki prihvatljivijim nekonvencionalnim metodama kvaternizacije (mikrovalnom sintezom i mehanokemijom) postići bolji prinosi produkata za kraće vrijeme te s manjim utroškom energije
- Očekuje se također da će sintetizirani spojevi pokazati značajnu antidotsku te antimikrobnu aktivnost

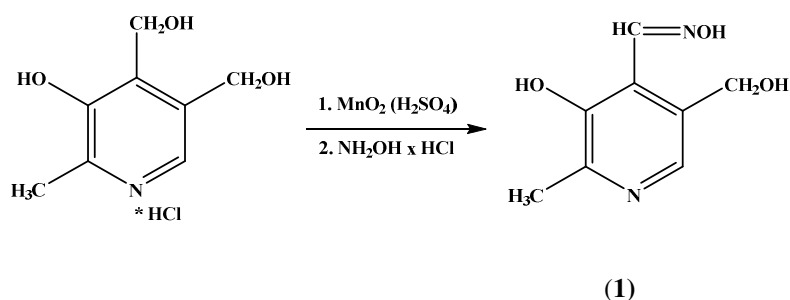
3. MATERIJALI I METODE

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće. Za sinteze aktivirane mikrovalnim zračenjem korištena je kućna mikrovalna pećnica marke Panasonic (max. snage 850 W). Mehanosinteza je provedena usitnjavanjem i miješanjem u tarioniku s tučkom.

Tankoslojna kromatografija (TLC) rađena je na komercijalno dostupnim pločicama silikagela DC Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, a za detekciju izoliranih komponenata je korištena UV-svjetlost valne duljine 254 nm. Kromatogrami su razvijani u sustavima otapala: kloroform : metanol (6 : 1,5; v/v) i *n*-butanol : octena kiselina : voda = 8 : 2 : 10.

3.1. Sinteza polaznog spoja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (piridoksal-oksima) (1)

Kao polazni spoj služio je piridoksal-oksime pripremljen oksidacijom piridoksina te oksimiranjem nastalog piridoksala (Gašo-Sokač, 2009.).

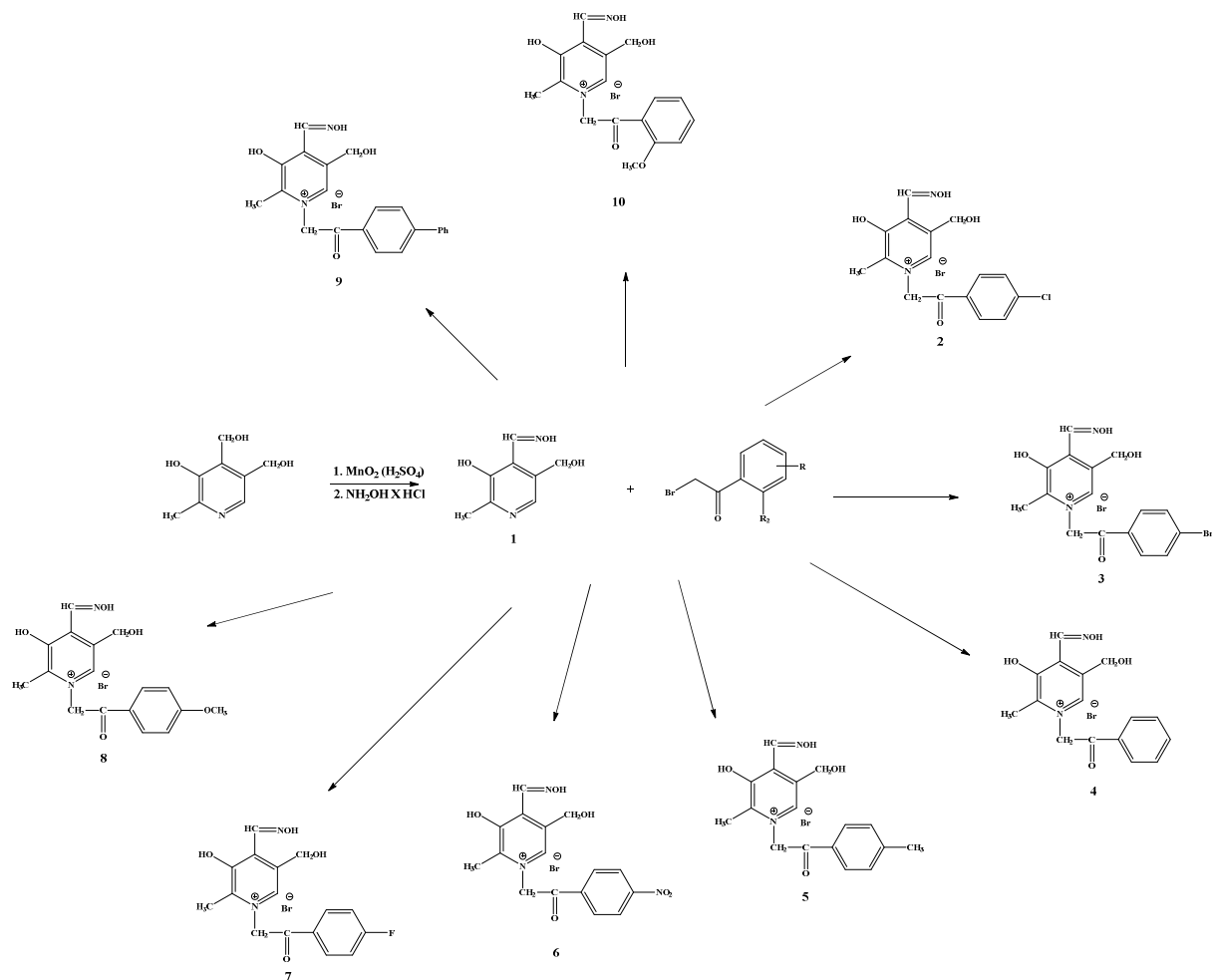


Shema 3.1. Priprava polaznog spoja.

3.2. Priprava kvaternih soli piridoksal-oksima

Kvaternizacije piridoksal-oksima izvedene su trima metodama:

- u acetonu uz MW zračenje
- bez otapala uz MW zračenje
- mehanosintežom



Shema 3.2. Reakcije kvaternizacije.

3.2.1. Postupak u acetonu pod utjecajem MW zračenja (A)

Piridoksal-oksim (**1**) (0,18 g; 1 mmol) je otopljen uz zagrijavanje (50 °C) u 50 mL acetona. Nakon što je sav piridoksal-oksim otopljen, reakcijska je smjesa ohlađena na sobnu temperaturu i u nju je dodan odgovarajući fenacil-bromid (1 mmol). Priređena je smjesa podvrgnuta mikrovalnom (MW) zračenju određeno vrijeme, nakon čega je tankoslojnom kromatografijom zapažen produkt. Stajanjem u tami tijekom nekoliko dana u reakcijskoj je smjesi je vidljiv talog koji je odsisan te prekrizaliziran iz odgovarajućeg otapala.

3.2.2. Suhi postupak kvaternizacije pod utjecajem MW zračenja (B)

Piridoksal-oksim (**1**) (0,18 g; 1 mmol) i odgovarajući fenacil-bromid (1 mmol) usitnjavani su u tarioniku (10 min) uz malu količinu silikagela (500 mg). Sivo bijela reakcijska smjesa podvrgnuta je MW zračenju dok nije zapaženo nastajanje produkta. Smjesa je zatim otopljena u vrućem acetonu te je vakuumskom filtracijom uklonjen silikagel. Zaostali produkt sa silikagela otopljen je u etanolu pri čemu je etanol uparen te je suhi ostatak ponovno otopljen u vrućem acetonu. Acetonski su ekstrakti sjedinjeni. Za nekoliko je dana nastali talog odsisan te prekrizaliziran iz odgovarajućeg otapala, pri čemu je dobiven kromatografski čist produkt.

3.2.3. Postupak mehanosinteze (C)

Piridoksal-oksim (**1**) (0,18 g; 1 mmol) i odgovarajući fenacil-bromid (1 mmol) usitnjavani su u tarioniku (30 min) uz malu količinu silikagela (500 mg) te 300 µL apsolutnog etanola. Nakon što je nastao produkt, reakcijska je smjesa ostavljena tijekom noći, pri čemu je promijenila boju iz bijelosive u žutu. Reakcijska je smjesa zatim ekstrahirana vrućim acetonom (oko 60 mL), a silikagel je uklonjen vakuumskom filtracijom. Preostali je produkt otopljen sa silikagela u apsolutnom etanolu te je etanol uparen. Suhi je ostatak ponovno otopljen u vrućem acetonu te je spojen s prethodnim acetonskim ekstraktom. Nakon nekoliko dana stajanja u tami iskristalizirao je produkt koji je prikupljen i prekrizaliziran iz odgovarajućeg otapala. Dobiven je kromatografski čist spoj.

3.3. Identifikacija sintetiziranih spojeva

Infracrveni su spektri snimljeni pomoću infracrvenog spektrofotometra FTIR - 8400S, SHIMADZU, a uzorci su snimani u kalijevu bromidu (KBr) na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Spektri $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ su snimljeni pomoću spektrometra Varian XL-GEM 300 u DMSO- d_6 u Centru za NMR Instituta „Ruđer Bošković“. Svi uzorci su otopljeni u DMSO- d_6 . Kemijski pomaci (δ) u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektrima su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije su assignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H-H.

Tališta su određena na uređaju “Stuart Melting Point Apparatus SMP3“ i nisu korigirana.

3.4. Rentgenska strukturna analiza

Difraktometrijski podatci prikupljeni su na $-123,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću Oxford Diffraction Xcalibur 2 difraktometra uz monokromatsko MoK_{α} zračenje ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) i grafitni monokromator na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

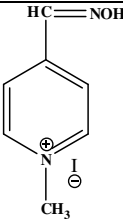
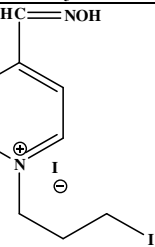
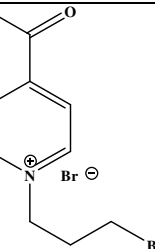
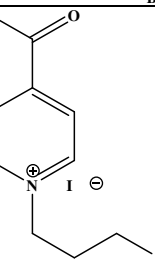
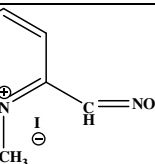
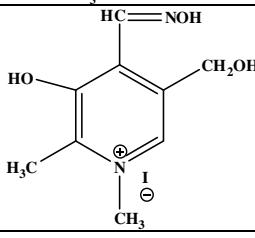
Monokristal spoja (**7**) 1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijska bromida dobiven je prekrizacijom pri sobnoj temperaturi iz otopine etil-acetata. Difraktometrijski podatci prikupljeni su na $-123,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću Oxford Diffraction Xcalibur 2 difraktometra na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz monokromatsko MoK_{α} zračenje ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) i grafitni monokromator. Prikupljanje podataka i njihova redukcija provedena je *CrysAlis* (Oxford Diffraction, 2013.) programom. Struktura spoja riješena je izravnim metodama primjenom programa *SIR-2004* (Burla i sur, 2005) i utočnjena metodom najmanjih kvadrata na temelju vrijednosti F^2 programom *SHELXL-2013* (Sheldrick i sur, 2008). Grafički prikazi načinjeni su programima *PLATON* (Spek, 2003) i *MERCURY* (Macrae i sur, 2006).

3.5. Kvaternizacija različitih derivata piridina

Kvaternizacije derivata piridina izvršene su različitim postupcima priprave, a za sve je zajednička uporaba mikrovalnoga zračenja.

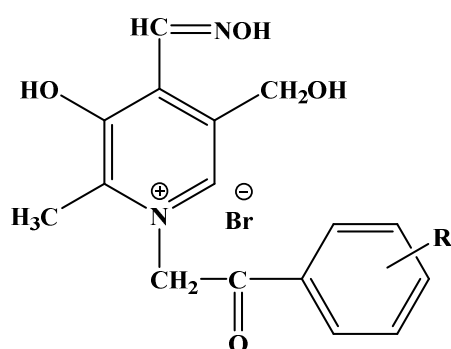
Tablica 3.1. Pregled pripremljenih derivata piridina.

Broj	Formula	Ime spoja
12		1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijev klorid
13		1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid
14		2-metil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid
15		4-hidroksiiminometil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid
16		3-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid

17		4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev jodid
18		4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijev jodid
19		1-(3-brompropil)-4-karbamoilpiridinijev bromid
20		4-karbamoil-1-(3-jodpropil)piridinijev jodid
21		2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev jodid
22		3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijev jodid

3.6. Određivanje reaktivacijske sposobnosti pripremljenih spojeva

Seriji pripremljenih oksima određena je sposobnost reaktivacije ljudske eritrocitne acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze inhibiranih bojnim otrovima tabunom i VX-om te pesticidom paraoksonom. Određena je i reverzibilna inhibicija acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze iz seruma sintetiziranim oksimima **2** – **10** (prikazanim na shemi 3.3.). Ispitivanja su izvršena na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.



Spoj R	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	4-Cl	4-Br	4-H	4-CH ₃	4-NO ₂	4-F	4-OCH ₃	4-Ph	2-OCH ₃

Shema 3.3. Kvaterne soli piridoksal-oksima kojima je ispitano reaktivacijsko djelovanje.

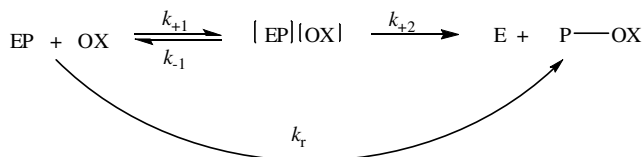
Za određivanje reaktivacije sintetiziranih oksimskih spojeva u svim je pokusima korišten 0,1 mol/L natrijev fosfatni pufer pH = 7,4 pripremljen titracijom 0,1 mol/L otopina soli Na₂HPO₄ i NaH₂PO₄, pri 25 °C. Kao supstrat kolinesteraza korišten je acetiltiokolin jodid (ATCh; Sigma-Aldrich, SAD).

Izvor ljudske AChE bili su eritrociti dobiveni iz uzoraka heparinizirane krvi. Eritrociti su izolirani centrifugiranjem (20 minuta, 2500 okretaja u minuti), nakon čega su tri puta isprani fiziološkom otopinom kako bi se uklonila eventualno zaostala plazma. Isprani eritrociti razrijeđeni su fosfatnim puferom do volumena uzorka pune krvi. Kao izvor BChE korištena je ljudska plazma izdvojena iz uzoraka heparinizirane krvi kao supernatant nakon

centrifugiranja (20 minuta, 2500 okretaja u minuti). Izvori enzima podvrgnuti su OP spojevima [VX-u (3×10^{-7} M), tabunu (10^{-6} M) i paraoksonu (10^{-7} M)] u trajanju od 60 minuta do postizanja 95 - 100 % - tne inhibicije enzima. Suvišak je OP spoja uklonjen ekstrakcijom heksanom. Nakon postignute inhibicije za reaktivaciju inhibirane AChE i BChE ispitani su spojevi **2 - 10** pri koncentraciji 1 mmol/L. Tiolni je reagens DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) priređen kao 1 mM otopina u fosfatnom puferu koja se može čuvati na +4 °C najdulje do pet dana. Reaktiviranje je praćeno pri 25 °C u trajanju od 24 sata. Mjerenje aktivnosti kolinesteraza određeno je standardnom spektrofotometrijskom metodom prema Ellmanu (Ellman i sur., 1961.). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH = 7,4; DTNB, enzim (kontrolna proba) ili enzim i inhibitor (inhibirana proba). Mjerenje enzimske aktivnosti izvedeno je pri 25 °C i valnoj duljini od 412 nm pomoću spektrofotometra (Varian Inc., Australia).

Dobiveni rezultati izraženi su kao postotak povratka aktivnosti AChE i BChE (reaktivacije) u odnosu na kontrolnu aktivnost, a za oksime je izračunata konstanta reaktivacije prvog stupnja k_{obs} za enzime AChE i BChE.

Reaktivacija fosfiliranih enzima oksimima odvija se prema shemi 3.4.



Shema 3.4. Reaktivacija inhibiranih enzima oksimima.

EP – fosfilirani enzim, [EP][OX] – reverzibilni Michaelisov kompleks između fosfiliranog enzima [EP] i oksima [OX], [E] – aktivni enzim, [P-OX] – fosfilirani oksim, k_{+2} – maksimalna konstanta brzine prvog reda, k_r – ukupna konstanta brzine reakcije drugog reda

Iz sheme 3.4. slijedi izraz (1) (Kovarik i sur., 2008.)

$$\ln \frac{[\text{EP}]_0}{[\text{EP}]_t} = \frac{k_{+2} [\text{OX}]}{K_{OX} + [\text{OX}]} t = k_{obs} t \quad (1)$$

$[EP]_0$ i $[EP]_t$ – su koncentracije fosfiliranog enzima pri početnom vremenu $t = 0$ i u nekom vremenu $t = t$, K_{OX} – je jednak omjeru $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, k_{obs} – konstanta brzine reaktivacije prvog reda, (računata iz ovisnosti nagiba krivulje $\log(100 - \% \text{ reaktivacije})$ i trajanja reaktivacije).

Ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda (k_r)

$$k_r = \frac{k_{+2}}{K_{OX}} \quad (2)$$

Eksperimentalni podaci prezentirani su kao *postotak reaktivacije*

$$\% \text{ reaktivacije} = \frac{v_{(EP+OX)}}{v_{(E+OX)}} \times 100 \quad (3)$$

$v_{(EP + OX)t}$ – aktivnost reaktiviranog enzima u vremenu t , $v_{(E + OX)t}$ – aktivnost enzima inkubiranog oksimom

3.7. Reverzibilna inhibicija nativnih kolinesteraza oksimima

Reverzibilna inhibicija nativnih kolinesteraza oksimima određena je praćenjem promjene brzine enzimske hidrolize supstrata u prisutnosti serije kvaternih soli piridoksal-oksima. Koncentracijski raspon oksima za inhibiciju odabran je tako da pri svakoj korištenoj koncentraciji supstrata inhibicija kolinesteraze bude u rasponu od 20 % do 80 %. Za svaku koncentraciju supstrata izmjerena je aktivnost enzima uz barem tri koncentracije oksima. Aktivnost enzima kada je u reakcijskoj smjesi prisutan oksim određena je iz izraza (Kovarik i sur., 2008.; Katalinić, 2011.).

$$v_{(E+S)} = v_{(E+S+OX)} - v_{(S+OX)} \quad (4)$$

gdje $v_{(E+S)}$ predstavlja aktivnost enzima (odnosno $\Delta A/\text{min}$ enzimske hidrolize supstrata), $v_{(E+S+OX)}$ ukupnu izmjerenu aktivnost tj. $\Delta A/\text{min}$, a $v_{(S+OX)}$ neenzimsku reakciju (odnosno vrijednost $\Delta A/\text{min}$ neenzimske reakcije za danu koncentraciju oksima i supstrata).

Reakcijska smjesa za određivanje reverzibilne inhibicije nativnih kolinesteraza piridinijevim oksimima sadržavala je 30 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ DTNB, fosfatni pufer, enzim (200 - 300 puta konačno razrjeđenje plazme, 300 - 400 puta konačno razrjeđenje eritrocita), oksim (raspon konačnih koncentracija). Mjerenje aktivnosti započeto je dodatkom supstrata (raspon konačnih koncentracija) u reakcijsku smjesu do ukupnog volumena od 1,0 mL i trajalo je dvije minute. Tijekom mjerenja je kod svih uzoraka promjena absorbancije bila linearna s vremenom.

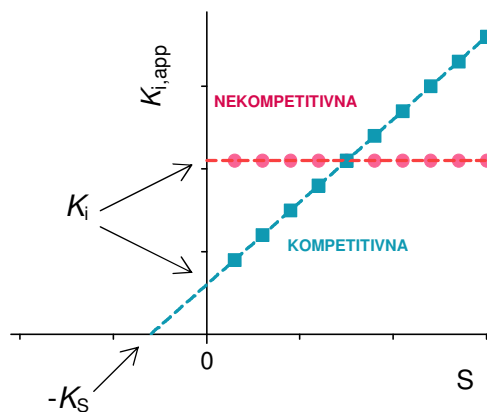
Katalitičke konstante reverzibilne inhibicije nativnih kolinesteraza oksimima određene su iz Hunter-Downsovog prikaza:

$$K_{i,\text{app}} = \frac{v_i \cdot [\text{OX}]}{v_0 - v_i} \quad (5)$$

$$K_{i,\text{app}} = K_i + \frac{K_i}{K_S} \cdot [\text{S}] \quad (6)$$

gdje su v_0 i v_i aktivnosti enzima u odsutnosti odnosno prisutnosti oksima kao inhibitora (i), dok $K_{i,\text{app}}$ predstavlja prividnu konstantu disocijacije kompleksa između enzima i oksima, budući da se inhibicija prati u prisutnosti supstrata [S]. Utjecaj supstrata na vezanje inhibitora

na pretpostavljeno mjesto na enzimu (aktivno/alosteričko mjesto) opisan je jednačom (6). Ovdje K_i predstavlja stvarnu konstantu disocijacije kompleksa između enzima i oksima, dok K_S predstavlja konstantu disocijacije kompleksa enzim-supstrat (Michaelis-Mentenin tip kompleksa). Iz ovisnosti $K_{i,app}$ određenih jednačom (5) o koncentraciji supstrata, određene su konstante K_i (odsječak na ordinati) i K_S (odsječak na apscisi) korištenjem jednačbe (6) (slika 3.1.). Iz navedene se ovisnosti pretpostavio i tip reverzibilne inhibicije odnosno mjesto vezanja oksima. Naime, ako je riječ o kompetitivnoj inhibiciji vrijednost $K_{i,app}$ će se mijenjati ovisno i o koncentraciji inhibitora i o koncentraciji supstrata (tj. nagib pravca u Hunter-Downsovom prikazu slika 3.1. veći je od nule; $y = b + ax$, $a > 0$) i pretpostavlja se vezanje unutar aktivnog mjesta. Ako je riječ o nekompetitivnoj inhibiciji $K_{i,app}$ će ovisiti samo o koncentraciji oksima, tj. bit će neovisna o koncentraciji supstrata (nagib pravca Hunter-Downsovom prikazu slika 3.1. jednak je nuli; $y = b + ax$, $a \cong 0$) i pretpostavlja se vezanje na periferno alosteričko mjesto enzima. Tip reverzibilne inhibicije određen je usporedbom konstante K_S s prethodno određenom Michaelis-Menteninom konstantom K_m . Pri toj usporedbi kompetitivni tip inhibicije zadovoljavat će odnos $K_S \approx K_m$, dok će kod nekompetitivnog tipa inhibicije $K_S \gg K_m$.



Slika 3.1. Hunter-Downsov prikaz ovisnosti prividne konstante inhibicije ($K_{i,app}$) o koncentraciji supstrata (S); prikaz kompetitivne (označeno plavom bojom) i nekompetitivne reverzibilne inhibicije (označeno crvenom bojom). Iz ove ovisnosti moguće je odrediti stvarnu konstantu inhibicije K_i (odsječak na ordinati) i konstantu disocijacije kompleksa enzim-supstrat K_S (odsječak na apscisi).

3.8. Određivanje antibakterijske aktivnosti pripremljenih spojeva

Umnožavanje mikrobnih kultura provedeno je na kosom TrypticGlucoseYeast agaru (TGK; Biolife, Italija) sastava: pepton bio s D 5,0 g, kvašćev ekstrakt 2,5 g, glukoza 1,0 g, agar Bios LL 15 g. 23,5 g agara otopljeno je u demineraliziranoj vodi, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu na 121 °C 15 minuta. pH podloge: $7,0 \pm 0,2$. Sve kulture su, prije analize, regenerirane uzastopnim precjepivanjem na kosi TGK agar tijekom tri dana.

Određivanje minimalne baktericidne (MBK) i minimalne inhibitorne (MIK) koncentracije provedeno je u moždano – srčanom bujonu (eng. „*Brain heart infusion broth*“, BHI bujon) (Biolife, Italija). Sastav BHI bujona: ekstrakt moždanog tkiva 200 g, ekstrakt srčanog tkiva 250 g, peptokompleks 10 g, D-(+) glukoza 2,0 g, NaCl 5,0 g, Na₂HPO₄ 2,5 g. Otopljeno je 37 g bujona u 1000 mL demineralizirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu (121 °C / 15 minuta). pH podloge: $7,4 \pm 0,2$.

Pripremljeni su spojevi (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 i 16) neposredno prije ispitivanja otopljeni (0,04 g) u 4 mL DMSO-a i 6 mL 10 % Tween 80. Ako je topljivost spojeva u pripremljenoj otopini bila manja, otapanje je pospješeno u ultrazvučnoj kupelji. Nakon otapanja, otopine su sterilizirane filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 µm.

Minimalna baktericidna i inhibitorna koncentracija su određene u tri faze. U prvoj fazi, sterilnom pipetom preneseno je po 0,5 mL BHI bujona u sterilne, prazne epruvete. U drugoj fazi je u prvu epruvetu dodano 0,5 mL otopine ispitivanog spoja i promiješano. Serijskim prenošenjem (metodom razrjeđenja) po 0,5 mL, koncentracija je ispitivanog sastojka u svakoj epruveti smanjena na polovicu početne vrijednosti. Ovim su postupkom pripremljene sljedeće koncentracije svih ispitanih spojeva: 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm i 650 ppm. U trećoj fazi je pripremljena suspenzija stanica bakterija. Nakon usporedbe s McFarlandovim standardom 0,5 mL, suspenzija je razrijeđena u sterilnoj fiziološkoj otopini (na 1×10^6 CFU mL⁻¹), a potom je u svaku epruvetu, preneseno po 0,1 mL inokuluma. Jedna epruveta služi za kontrolu rasta bakterije u tekućoj podlozi, dok druga služi kao kontrola sterilnosti podloge i spoja i u nju kultura nije dodana.

Nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C, iz epruveta u kojima se bujon nije zamutio, preneseno je 100 µL uzgoja u epruvetu s BHI bujonom: Nakon dodatne inkubacije (24 h; 37 °C) provjeren je porast mikrobne kulture. Budući da bakterija vrste *Pseudomonas syringae* raste

pri nižoj temperaturi od ostalih ispitanih vrsta, temperatura inkubacije je za nju bila niža, 25 °C. U slučaju da se nakon dodatne inkubacije, podloga nije zamutila, pripadajuća koncentracija soja iz prve epruvete (u kojoj je podloga bila bistra) je MBK koncentracija ispitivanoga spoja. Ako je kultura porasla nakon inkubacije (što je vidljivo prema zamućenju podloge, a precijepljena je iz bistrog bujona), u pripadnoj se epruveti nalazi MIK ispitivanoga spoja.

4. REZULTATI

4.1. Priprava polaznog spoja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (piridoksal-oksima) (1)

Postupak

Piridoksin-hidroklorid (24,6 g; 0,12 mol) otopljen je uz miješanje u 400 mL 0,3 mol/L H₂SO₄. Otopini je dodan manganov(IV) oksid (10,8 g, 0,124 mol) aktiviran sušenjem u sušioniku pri temperaturi od 125 °C 15 sati i smjesa je miješana pri sobnoj temperaturi 3 h. Zatim je reakcijskoj smjesi dodan natrijev acetat (32,8 g; 0,4 mol) i hidroksilamin hidroklorid (12,4 g; 0,179 mol), a zagrijavanje je produženo još 10 minuta pri istoj temperaturi. Hlađenjem (nakon 24 h u hladnjaku) istaložio je oksim koji je odsisan, dobro ispran vodom i osušen. Prekristalizacijom iz etanola dobiven je 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridin (1) (7,71 g; 35,27 %) u obliku kristala sivosmeđe boje.

Tablica 4.1. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (1).

Molekulska formula	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃
Molarna masa	182,19
Talište (°C)	218,7 - 219,3
IR(KBr) (cm⁻¹)	3454 (O-H); 3090 (=C-H); 2900 (CH ₃ i CH ₂); 1636 (C=N); 1559 - 1458 (C=C)

4.2. Sinteza kvaternih soli piridoksal-oksima MW zračenjem i mehanosintezom

Reakcijsko vrijeme i prinosi u sintezi kvaternih soli piridoksal-oksima pod utjecajem mikrovalnog zračenja za seriju spojeva **2 - 10** prikazani su u tablici 4.2. dok su za postupak mehanosinteze prikazani u tablici 4.3.

Tablica 4.2. Vrijeme i prinosi reakcija u mikrovalnoj sintezi: A – postupak u acetonu i B – suhi postupak.

Produkt	R	MW A		MW B		Klasična metoda [Gašo-Sokač, 2009]	
		t (min)	Prinos (%)	t (min)	Prinos (%)	t (tjedni)	Prinos (%)
2	4'-Cl	5	75	10	63	3	66
3	4'-Br	4,5	89	10	74	3	44
4	4'-H	5	73	7	53	1	38
5	4'-CH ₃	4	94	8	76	1	62
6	4'-NO ₂	4,5	80	10	80	1	60
7	4'-F	3	70	10	48	3	36
8	4'-OCH ₃	5	90	10	71	3	67
9	4'-Ph	5	79	10	46	1	46
10	2'-OCH ₃	5	58	10	41	12	12

Tablica 4.3. Vrijeme i prinosi reakcija u mehanosintezi (C) kvaternih piridinijevih soli.

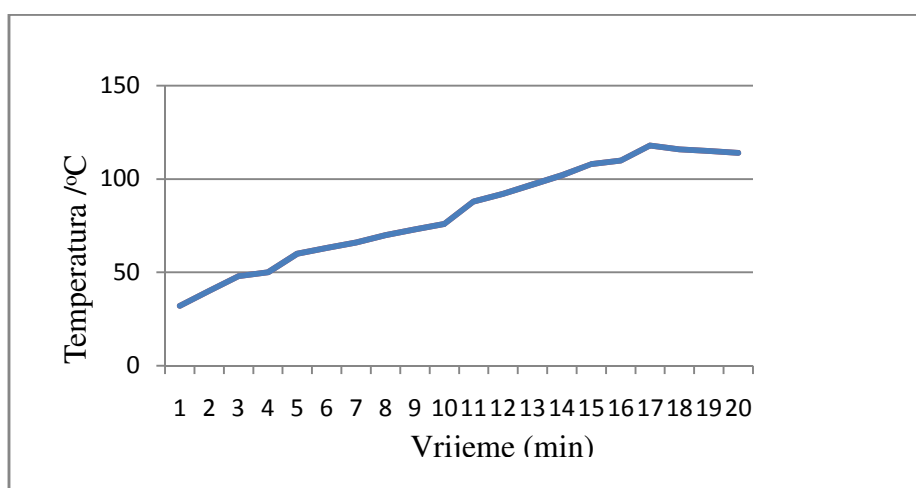
Produkt	R	Mehanosinteza LAG (EtOH)		Klasična metoda [Gašo-Sokač, 2009]	
		t (min)	Prinos (%)	t (tjedni)	Prinos (%)
2	4'-Cl	30	82	3	66
3	4'-Br	15	76	3	44
4	4'-H	30	63	1	38
5	4'-CH ₃	20	61	1	62
6	4'-NO ₂	30	70	1	60
7	4'-F	20	38	3	36
8	4'-OCH ₃	15	88	3	67
9	4'-Ph	15	42	1	46
10	2'-OCH ₃	30	24	12	12

4.3. Obilježja sintetiziranih spojeva iz serije piridoksal oksima

Identifikacijom sintetiziranih spojeva iz serije kvaternih soli piridoksal-oksima **2** – **10** dobivena su obilježja dana u tablicama 4.4. do 4.12.

Tablica 4.4. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1-(4'-klorfenacil)-2-metilpiridinijeva bromida (**2**).

Molekulska formula	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄ BrCl
Molarna masa	415,66
Talište (°C)	230-233
IR (cm ⁻¹)	3385 (O-H); 3073-2986 (=CH); 1688 (C=O); 1637-1589 (C=N, C=C); 1261 (C-O-H); 1051-1003 (N-O, C-O)
¹ H-NMR (δ/ ppm)	12,78 (bs, 1H, NOH); 8,67 (bs, 1H, OH); 8,59 (s, 1H, H-6); 8,42 (s, 1H, HC=NO); 8,14 - 8,11 (d, 2H, J = 8,62 Hz, H-2', H-6'); 7,77 - 7,74 (d, 2H, J = 8,58 Hz, H-3', H-5'); 6,89 (s, 2H, CH ₂ CO); 5,84 (bs, 1H, CH ₂ OH); 4,81 (s, 2H, CH ₂ OH); 2,51 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C-NMR (δ/ ppm)	189,82 (C=O); 152,55 (C-3); 145,50 (CH=NOH); 145,46 (C-2); 139,65 (C-6); 137,28 (C-4); 135,10 (C-4'); 132,25 (C-1'); 130,43 (C-2', C-6'); 129,76 (C-3', C-5'); 128,98 (C-5); 64,48 (C iz CH ₂ CO); 58,47 (CH ₂ OH); 13,32 (CH ₃)



Slika 4.1. Termički profil reakcije kvaternizacije za reakciju piridoksal-oksima i 2-brom-1-(4-klorfenil)etanona (**2**) pri suhom postupku i mikrovalnoj snazi od 440 W.

Tablica 4.5. Obilježja 1-(4'-bromfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida (**3**).

Molekulska formula	$C_{16}H_{16}N_2O_4Br_2$
Molarna masa	460,12
Talište (°C)	196-198
IR (cm⁻¹)	3385 (O-H); 3073-2848 (=CH); 1686 (C=O); 1636-1456 (C=N, C=C); 1261 (C-O-H); 1049-980 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,99 (bs, 1H, NOH); 8,66 (bs, 1H, OH); 8,63 (s, 1H, H-6); 8,58 (s, 1H, HC=NO); 8,04 - 8,01 (d, 2H, <i>J</i> = 8,61 Hz, H-2', H-6'); 7,92 - 7,89 (d, 2H, <i>J</i> = 8,55 Hz, H-3, H-5); 6,61 (s, 2H, CH ₂ CO); 5,88 (bs, 2H, CH ₂ OH); 4,81 (s, 1H, CH ₂ OH); 2,3 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,02 (C=O); 152,47 (C-3); 145,47 (CH=NOH); 145,44 (C-2); 137,28 (C-6); 135,11 (C-4); 132,56 (C-4'); 132,06 (C-1'); 130,43 (C-2', C-6'); 128,93 (C-3', C-5'); 128,16 (C-5); 64,37 (CH ₂ CO); 58,46 (CH ₂ OH); 13,28 (CH ₃)

Tablica 4.6. Obilježja 1-fenacil-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida (**4**).

Molekulska formula	$C_{16}H_{17}N_2O_4Br$
Molarna masa	381,22
Talište (°C)	250-251
IR (cm⁻¹)	3275 (O-H); 3107-2727 (=C-H); 1701 (C=O); 1636-1449 (C=N, C=C); 1229 (C-O-H); 1084-980 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,47 (bs, 1H, NOH); 11,52 (bs, 1H, OH); 8,62 (s, 1H, H-6); 8,52 (s, 1H, HC=NO); 7,72 - 7,70 (d, 2H, <i>J</i> = 7,98 Hz, H-2', H-6'); 7,51 - 7,55 (m, 1H, H-4'); 7,39 - 7,36 (d, 2H, <i>J</i> = 8,16 Hz, H-3', H-5'); 6,00 (s, 2H, CH ₂ CO); 4,67 (s, 2H, CH ₂ OH); 2,51 (bs, 1H, CH ₂ OH); 2,50 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,70 (C=O); 152,50 (C-3); 149,28 (CH=NOH); 137,21 (C-2); 135,11 (C-6); 135,10 (C-4); 130,44 (C-4'); 128,30 (C-2', C-6'); 128,26 (C-1'); 128,10 (C-3', C-5'); 127,82 (C-5); 59,67 (CH ₂ CO); 58,44 (CH ₂ OH); 13,25 (CH ₃)

Tablica 4.7. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-metilfenacil) piridinijeva bromida (**5**).

Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₄ Br
Molarna masa	395,25
Talište (°C)	243 uz raspad
IR (cm⁻¹)	3385 (O-H); 3064-2853 (=C-H); 1684 (C=O); 1636-1541 (C=N, C=C); 1234 (C-O-H); 1088-980 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,87 (bs, 1H, NOH); 8,67 (bs, 1H, OH); 8,62 (s, 1H, H-6); 8,38 (s, 1H, HC=NO); 8,03 - 8,00 (d, 2H, J = 8,13 Hz; H-3', H-5'); 7,48 - 7,46 (d, 2H, J = 8,12 Hz, H-2', H-6'); 6,42 (s, 2H, CH ₂ CO); 4,81 (s, 2H, CH ₂ OH); 2,51 (bs, 1H, CH ₂ OH); 2,49 (s, 3H, CH ₃); 2,23 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,06 (C=O); 152,49 (C-3); 145,57 (CH=NOH); 145,50 (C-2); 145,31 (C-6); 137,24 (C-4); 135,19 (C-4'); 129,34 (C-2', C-6'); 128,59 (C-1'); 128,10 (C-3', C-5'); 127,80 (C-5); 64,42 (CH ₂ CO); 58,43 (CH ₂ OH); 21,28 (CH ₃); 13,25 (CH ₃)

Tablica 4.8. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-nitrofenacil) piridinijeva bromida (**6**).

Molekulska formula	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₆ Br
Molarna masa	426,22
Talište (°C)	235-237
IR (cm⁻¹)	3347 (O-H); 3069-2862 (=C-H); 1715 (C=O); 1604-1528 (C=N, C=C); 1217 (C-O-H); 1032-1001 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,54 (bs, 1H, NOH); 8,66 (bs, 1H, OH); 8,62 (s, 1H, H-6); 8,49 - 8,46 (d, 2H, J = 8,88 Hz, H-3', H-5'); 8,33 - 8,31 (d, 2H, J = 8,94 Hz, H-2', H-6'); 8,13 (s, 1H, HC=NO); 6,51 (s, 2H, CH ₂ CO); 4,82 (s, 2H, CH ₂ OH); 4,67 (bs, 1H, CH ₂ OH); 2,29 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,12 (C=O); 152,55 (C-3); 151,00 (CH=NOH); 150,68 (C-2); 146,90 (C-6); 145,60 (C-4); 145,51 (C-4'); 138,59 (C-1'); 138,23 (C-2', C-6'); 137,36 (C-3', C-5'); 130,05 (C-5); 64,68 (CH ₂ CO); 58,54 (CH ₂ CO); 13,34 (CH ₃)

Tablica 4.9. Obilježja 1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida (**7**).

Molekulska formula	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄ BrF
Molarna masa / M	399,21
Talište (°C)	226,8 uz raspad
IR (cm⁻¹)	3447 (O-H); 3064-2359 (=C-H); 1699 (C=O); 1599-1456 (C=N, C=C); 1233 (C-O-H); 1063-1001 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,95 (bs, 1H, NOH); 8,66 (bs, 1H, OH); 8,56 (s, 1H, H-6); 8,21 (s, 1H, HC=NO); 8,19 - 8,18 (d, 2H, J = 8,82 Hz, H-2', H-6'); 7,52 - 7,49 (d, 2H, J = 8,82 Hz, H-3', H-5'); 6,26 (s, 2H, CH ₂ CO); 5,38 (s, 1H, CH ₂ OH); 4,67 (s, 2H, CH ₂ OH); 2,27 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	189,31 (C=O); 164,17 (C-3); 152,53 (CH=NOH); 145,50 (C-2); 145,44 (C-6); 137,29 (C-4); 131,73 (C-4'); 131,62 (C-2', C-6'); 130,30 (C-1'); 128,13 (C-3', C-5'); 128,10 (C-5); 66,32 (CH ₂ CO); 58,49 (CH ₂ OH); 13,25 (CH ₃)

Tablica 4.10. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-metoksifenacil) piridinijeva bromida (**8**).

Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₅ Br
Molarna masa	411,25
Talište (°C)	267-268
IR (cm⁻¹)	3383 (O-H); 3042-2843 (=C-H); 1676 (C=O); 1638-1516 (C=N, C=C); 1244 (C-O-H); 1045-980 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	13,00 (bs, 1H, NOH); 8,66 (bs, 1H, OH); 8,56 (s, 1H, H-6); 8,13 (s, 2H, CH ₂ CO); 8,08 - 8,05 (d, 2H, J = 8,34 Hz; H-3', H-5'); 7,20 - 7,17 (d, 2H, J = 8,97 Hz; H-2', H-6'); 6,55 (s, 2H, CH ₂ OH); 4,83 (bs, 1H, CH ₂ OH); 3,91 (s, 3H, OCH ₃); 2,51 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	188,73 (C=O); 164,42(C-3); 152,49 (C-4'); 145,52 (C-2); 145,33 (C-6); 135,11 (CH=NOH); 137,25 (C-4); 130,97 (C-2', C-6'); 128,05 (C-1'); 127,80 (C-5); 114,32 (C-3', C-5'); 64,10 (CH ₂ CO); 58,47 (CH ₂ OH); 38,67 (OCH ₃); 13,21 (CH ₃)

Tablica 4.11. Obilježja 1-(4'-fenilfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida (**9**).

Molekulska formula	C ₂₂ H ₂₁ N ₂ O ₄ Br
Molarna masa	457,32
Talište (°C)	228,4 uz raspad
IR (cm⁻¹)	3397 (O-H); 3075-2789 (=C-H); 1691 (C=O); 1604-1451 (C=N, C=C); 1237 (C-O-H); 1088-995 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	13,02 (bs, 1H, NOH); 12,78 (bs, 1H, OH); 8,60 (s, 1H, H-6); 8,24 (s, 1H, H-4'); 8,19 – 8,17 (d, 2H, J = 8,43 Hz, H-3', H-5'); 8,00 – 7,97 (d, 2H, J = 8,43 Hz, H-2', H-6'); 7,58 -7,45 (m, 5H, Ph); 6,64 (s, 2H, CH ₂ CO); 4,81 (s, 2H, CH ₂ OH); 4,75 (bs, 1H, CH ₂ OH); 2,50 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,13 (C=O); 152,46 (C-3); 151,70 (CH=NOH); 146,02 (C-2); 145,49 (C-4); 145,38 (C-6); 142,86 (C-4'); 138,45 (C-2', C-6'); 138,05 (C-1'); 137,30 (C-3', C-5'); 136,83 (C-5); 129,22 (C-1''); 129,11 (C-3'', C-5''); 128,72 (C-2'', C-6''); 127,05 (C-4''); 64,40 (CH ₂ CO); 58,48 (CH ₂ OH); 13,22 (CH ₃)

Tablica 4.12. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(2'-metoksifenacil) piridinijeva bromida (**10**).

Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₅ Br
Molarna masa	411,25
Talište (°C)	217-219
IR (cm⁻¹)	3309 (O-H); 3102-2949 (=C-H); 1674 (C=O); 1597-1437 (C=N, C=C); 1252 (C-O-H); 1055-980 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,95 (bs, 1H, NOH); 8,67 (bs, 1H, OH); 8,61 (s, 1H, H-6); 7,86 - 7,84 (d, 2H, J = 6,03 Hz, H-3', H-5'); 7,36 - 7,33 (d, 2H, J = 8,40 Hz, H-2', H-6'); 7,66 (s, 2H, CH ₂ CO); 6,53 (bs, 1H, CH ₂ OH); 4,80 (s, 3H, OCH ₃); 4,04 (s, 2H, CH ₂ OH); 2,51 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,26 (C=O); 159,98 (C-3); 145,58 (CH=NOH); 145,58 (C-4); 145,51 (C-2); 145,51 (C-6); 145,19 (C-4); 137,09 (C-4'); 136,97 (C-1'); 136,27 (C-2', C-6'); 130,25 (C-3', C-5'); 128,00 (C-5); 67,86 (CH ₂ CO); 58,45 (CH ₂ OH); 13,19 (CH ₃)

4.3.1. Analiza spektara kvaternih soli piridoksal-oksima

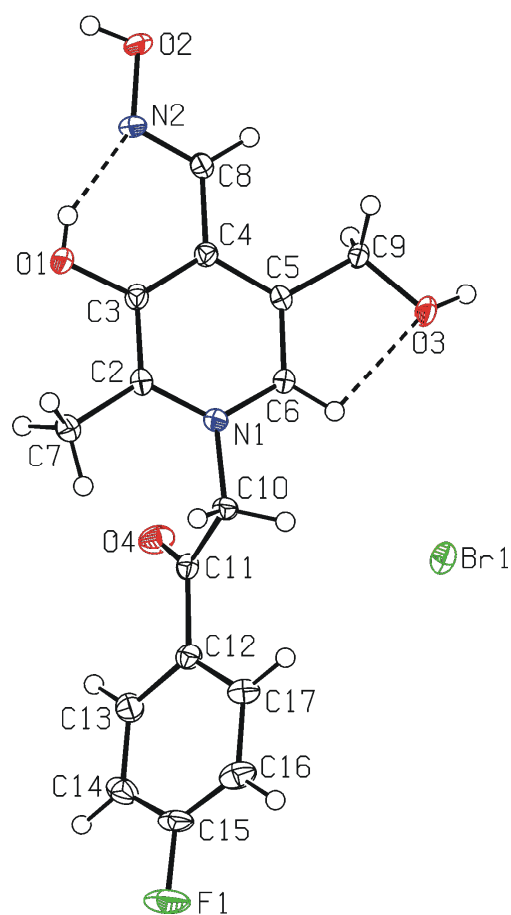
U IR-spektrima kvaternih soli piridoksal-oksima **2 - 10** u području valnih brojeva 3397 - 3275 cm^{-1} apsorpcijske vrpce potječu od vibracija istezanja oksimske hidroksilne skupine (-OH), vibracija istezanja intramolekularno vezanih hidroksilnih skupina kao i aromatskog C-H. U području valnih brojeva 1715 - 1674 cm^{-1} javljaju se apsorpcijske vrpce uzrokovane vibracijama istezanja C = O skupine u alifatskom lancu, te C = N i C = C veza između atoma u piridinskom prstenu, a položaj i intenzitet tih vrpce ovise o prirodi prstena i vrsti supstitucije. U području valnih brojeva 1088 - 980 cm^{-1} pojavljuju se apsorpcijske vrpce vezane uz vibracije istezanja skupine N - O i C - O, dok se u području ispod 1000 cm^{-1} pojavljuju vrpce uzrokovane vibracijama savijanja "izvan ravnine", a njihov je položaj određen položajem supstituenata.

$^1\text{H-NMR}$ spektri spojeva **2 - 10** sadrže signale protona metilne skupine vezane u položaju dva piridinskoga prstena kod $\delta = 2,27 - 2,51$ ppm. Kemijski pomaci $\delta = 3,80 - 4,82$ ppm odgovaraju metilenskim protonima hidroksimetilne skupine u položaju pet piridinskog prstena, a $\delta = 4,67 - 6,59$ ppm metilenskim protonima vezanim uz C = O skupinu u lancu. U području kemijskih pomaka između 7,46 i 8,59 ppm pojavljuju se protoni fenilnog prstena, dok se kod $\delta = 8,49 - 8,67$ ppm pojavljuju signali protona vezanih na piridinski prsten u položaju šest. Kemijski pomaci $\delta = 8,66 - 12,78$ ppm odgovaraju protonu hidroksilne skupine u položaju tri piridinskog prstena, a $\delta = 12,47 - 13,02$ ppm hidroksilnom protonu hidroksiimino skupine vezane za piridinski prsten u položaju četiri.

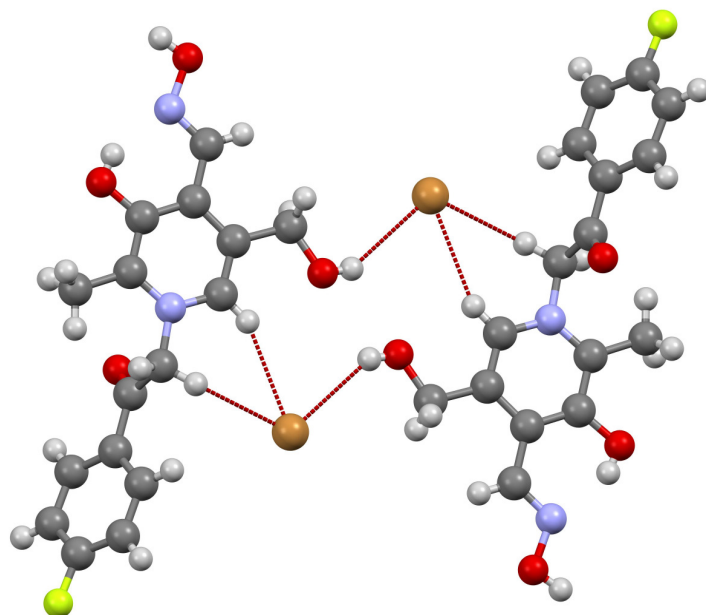
Iz $^{13}\text{C-NMR}$ spektra spojeva **2 - 10** vidi se da C-atomi metilnih skupina daju signale kod $\delta = 12,81 - 13,44$ ppm, C-atomi metilenske skupine vezane za C = O skupinu od $\delta = 59,67 - 66,32$ ppm, dok C - atomi hidroksimetilne skupine daju signale kod $\delta = 58,43 - 58,49$ ppm. Signali za C atome fenilnog kao i piridinskog prstena pojavljuju se u području kemijskih pomaka $\delta = 128,13 - 145,51$ ppm, a C-atomi karbonilne skupine daju signale kod $\delta = 188,73 - 190,70$ ppm.

4.4. Rentgenska strukturna analiza

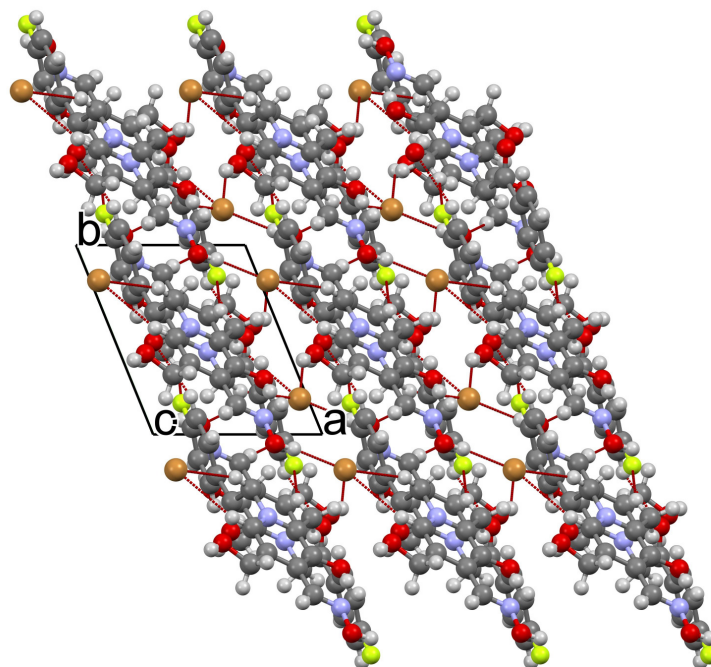
Kako bi se sa sigurnošću odredila struktura spoja **7**, [1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida] provedena je rentgenska strukturna analiza kojom je određena kristalna i molekulska struktura toga spoja (slika 4.2.).



Slika 4.2. Molekulska struktura spoja **7**. Unutarmolekulske su vodikove veze prikazane iscrtkanim linijama.



Slika 4.3. Dio kristalne strukture spoja 7, koji prikazuje stvaranje prstenova $\text{O-H}\cdots\text{Br}^-$ i $\text{C-H}\cdots\text{Br}^-$ vodikovim vezama, a u koje su uključena dva piridinijska kationa i dva bromidna iona. Međumolekulske su vodikove veze prikazane iscrtkanim linijama.



Slika 4.4. Kristalno pakiranje spoja 7, prikazano duž kristalografske osi c , koje prikazuje trodimenzijsku mrežu stvorenu $\text{O-H}\cdots\text{Br}^-$, $\text{C-H}\cdots\text{Br}^-$, $\text{C-H}\cdots\text{O}$ i $\text{C-H}\cdots\text{F}$ vodikovim vezama. Međumolekulske su vodikove veze prikazane iscrtkanim linijama.

Kako bi se sa sigurnošću odredila struktura spoja **7**, [1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida] provedena je rentgenska strukturalna analiza kojom je određena kristalna i molekulska struktura tog spoja (slika 4.2.).

Vezni je kut C2–N1–C6 u odnosu na ostale endocikličke kuteve piridinijeva prstena proširen i iznosi 123,2(2)^o. Ipak, zbroj svih endocikličkih veznih kuteva u prstenu iznosi 720^o, kao što se i očekuje za aromatski šesteročlani prsten.

Diedarski kut između usrednjenih ravnina piridinijskog i fenilnog prstena iznosi 55,38(13)^o. Takav položaj fenacilnog lanca, koji je zakrenut u odnosu na piridinijski prsten, potvrđuje i vrijednost torzijskog kuta C2–N1–C10–C11 u iznosu od 77,2(3)^o, što znači da se ugljikov C2 atom prstena nalazi u *sinklinalnom* položaju u odnosu na ugljikov C11 atom lanca. Za razliku od toga, N1 atom piridinijskog prstena i karbonilni O4 atom lanca nalaze se u *sinperiplanarnom* položaju [N1–C10–C11–O4 = 2,0(4)^o]. Dvije unutarmolekulske vodikove veze, jača O–H···N i slabija C–H···O [O1···N2 = 2,579(3) Å, C6···O3 = 2,648(3) Å], u piridinijskom kationu stvaraju šesteročlani, odnosno peteročlani prsten (slika 4.2.).

U povezivanju kationa i aniona spoja **7** sudjeluje veliki broj različitih tipova vodikovih veza. Dva piridinijska kationa povezana su jednom jakim O–H···Br[–] vodikovom vezom [O3···Br1 = 3,451(2) Å] i jednom slabijom C–H···Br[–] vodikovom vezom [C10···Br1 = 3,667(3) Å] u osamnaestoročlane prstenove (slika 4.3.). U povezivanju kationa putem premošćujućih bromidnih iona sudjeluje i jedna vrlo slaba C–H···Br[–] vodikova veza [C6···Br1 = 3,817(3) Å], na taj način stvarajući, zajedno s C10···Br1 vodikovom vezom, šesteročlani prsten.

U daljnjem povezivanju kationa i aniona sudjeluju još jedna O–H···Br[–], C–H···O i C–H···F vodikova veza [O2···Br1 = 3,131(2) Å; C8···O2 = 3,479(3); C7···F1 = 3,136(4) Å], koje zajedno s prethodno navedenim vodikovim vezama čine dvodimenzijisku mrežu. Nastala je mreža proširena u trodimenzijisku mrežu (slika 4.4.) pomoću jedne C–H···O međumolekulske vodikove veze [C16···O4 = 3,486(4) Å].

Kristalografski podatci za spoj **7** dani su u tablici 4.13.

Tablica 4.13. Kristalografski podatci za spoj **7**.

Spoj	7
Empirijska formula	C ₁₆ H ₁₆ BrFN ₂
Relativna molekulska masa, M_r	399,22
Temperatura / K	226,8
Kristalni sustav	triklinski
Prostorna skupina	<i>P</i> -1 (No. 2);
Dimenzije jedinične ćelije	
$a / \text{Å}$	6,7128(3),
$b / \text{Å}$	8,1316(4)
$c / \text{Å}$	15,9969(8)
$\alpha / ^\circ$	94,964(4)
$\beta / ^\circ$	92,224(4)
$\gamma / ^\circ$	111,877(5)
Volumen ćelije / Å^3	804,89(7)
Broj formulskih jedinki, Z	2
Računata gustoća, $D_{\text{calc.}} / \text{gcm}^{-3}$	1,647
Apsorpcijski koeficijent, μ / mm^{-1}	2,544
Kutno područje sakupljanja refleksa, $\theta / ^\circ$	27,0
Valjanost korištene težinske sheme, S	1,004
Faktor nepouzdanosti, R ($[I \geq 2\sigma(I)]$)	0,0357
Težinski faktor nepouzdanosti, wR ($[I \geq 2\sigma(I)]$)	0,0991

4.5. Kvaternizacija različitih derivata piridina

Kvaternizacijom različitih derivata piridina dobiveni su produkti u različitim prinosima. Reakcijski uvjeti i prinosi u navedenim reakcijama prikazani su u tablici 4.14.

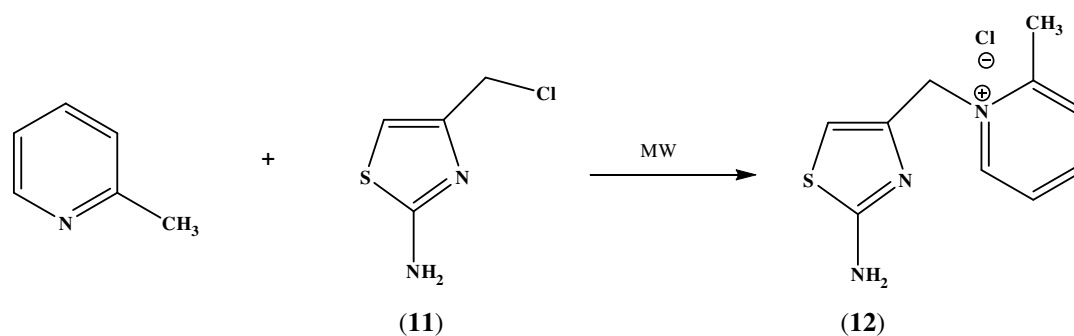
Tablica 4.14. Optimalni uvjeti i prinosi u reakciji kvaternizacije pod utjecajem MW zračenja različitih derivata piridina.

MW				
Spoj	Otapalo	t (min)	Snaga (W)	Prinos (%)
12	-	4	440	23
13	apsolutni etanol	2	440	26
14	apsolutni etanol	5	440	25
15	apsolutni etanol	5	440	30
16	apsolutni etanol	4	440	44
17	acetone	2	250	93
18	acetonitril	1	250	78
19	acetonitril	2	250	63
20	acetone	2	250	49
21	acetone	4	250	94
22	acetone	10	250	79

4.5.1. Priprava 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijeva klorida (**12**)

Postupak

Otopina 2-amino-4-klormetiltiazol hidroklorida (spoj **11**, pripravljen prema postupku Kanapickaitė i sur., 2006.) (0,2 g, 1,081 mmol) u 10 mL 2-metilpiridina podvrgnuta je MW zračenju (4 minute pri 440 W) nakon čega je nastala crna smola na dnu, a otopina je poprimila žuto-smeđu boju. Smola je uklonjena filtracijom, a u matičnici su nakon 2 tjedna iskristalizirali smeđi kristali koji su dobro isprani smjesom (EtOH : eter = 1 : 1). Dobiveno je 0,06 g (23 %) 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijeva klorida, spoj (**12**).



Shema 4.1. Sinteza spoja **12**.

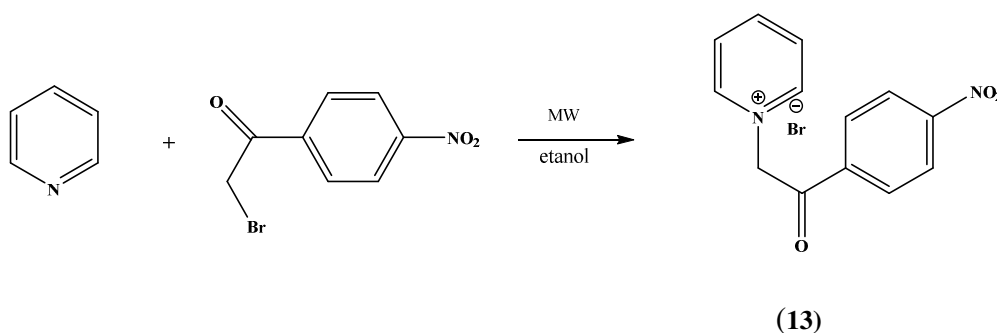
Tablica 4.15. Obilježja 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijeva klorida (**12**).

Molekulska formula	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ SCl
Molarna masa	241,74
Talište (°C)	217 – 219 uz raspad
IR (cm⁻¹)	3115 NH ₂ ; C-H 3013; (u tiazolnom prstenu) 1474; 1394; 1319; 1508-1456 (C = N, C = C); CH 876; 847; 725
¹H-NMR (δ/ ppm)	9,09 - 9,1 (d, 1H, <i>J</i> = 5,4 Hz, H-6); 8,52 - 8,49 (m, 1H, H-5); 8,08 - 8,07 (d, 1H, <i>J</i> = 7,9 Hz, H-3); 8,04 – 8,01 (m, 1H, H-4); 7,2 (bs, 2H, NH ₂); 6,8 (s, 1H, H-5'); 5,6 (s, 2H, CH ₂); 2,91 (s, 1H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	169,6 (C-3'); 155,5 (C-1'); 145,5 (C-2); 142,8 (C-6); 125,5 (C-5'); 129,8 (C-3, C-5); 106,5 (C-4); 56,6 (CH ₂); 19,8 (CH ₃)

4.5.2. Priprava 1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (13)

Postupak

Piridin (2 mmol) i 2-brom-4'-nitroacetofenon (2 mmol) otopljeni su u 30 mL apsolutnog etanola. Reakcijska je smjesa podvrgnuta MW zračenju (2 minute pri 440 W) sve dok produkt nije bio vidljiv na TLC-u. Crvenkasto-smeđi produkt je uparen do suha i ispran tri puta s po 10 mL etera te odsisan. Prekristalizacijom iz 40 mL smjese (EtOAc : EtOH = 1:1) dobiven je bijeložuti talog (0,17 g, 26,3 %).



Shema 4.2. Sinteza spoja 13.

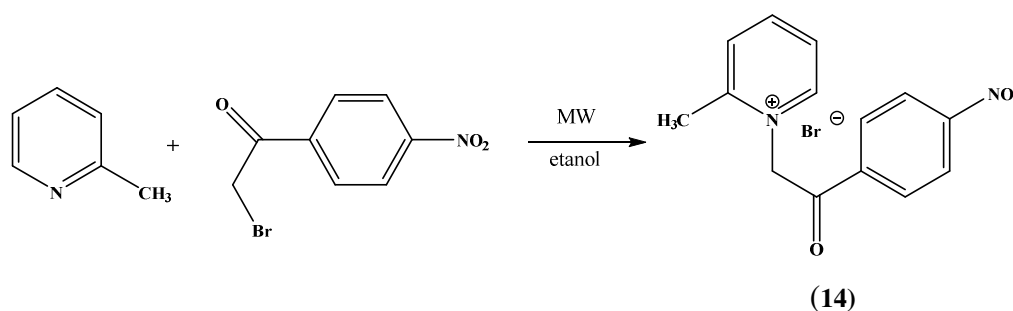
Tablica 4.16. Obilježja 1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (13).

Molekulska formula	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O ₃ Br
Molarna masa	323,14
Talište (°C)	262,0 – 262,5
IR (cm⁻¹)	1707 (C=O); 1525-1494 (C=N, C=C); 1950 (C-O), 1558, 1373 (NO ₂)
¹H-NMR (δ/ ppm)	9,1 - 9,09 (d, 2H, <i>J</i> = 5,52 Hz, H-2, H-6,); 8,79 (m, 1H, H-4); 8,76 - 8,77 (d, 2H, <i>J</i> = 7,86 Hz, H-3', H-5');; 8,47 - 8,48 (d, 2H, <i>J</i> = 8,81 Hz, H-2', H-6'); 8,31 - 8,33 (m, 2H, H-3, H-5); 6,6 (s, 2H, CH ₂)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,11 (C=O); 150,63 (C-4'); 146,59 (C-4); 146,27 (C-2, C-6); 138,27 (C-2', C-6'); 129,76 (C-3, C-5); 127,89 (C-1'); 124,11 (C-3', C-5'); 66,48 (CH ₂ CO)

4.5.3. Priprava 2-metil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (14)

Postupak

α -pikolin (2-metilpiridin) (18,6 mL) i 2-brom-4'-nitroacetofenon (2 mmol) otopljeni su u 20 mL apsolutnog etanola. Reakcijska je smjesa podvrgnuta MW zračenju (5 minuta pri 440 W) sve dok produkt nije bio vidljiv na TLC-u. Boja otopine postala je smeđa. Smjesa je potom uparena do pola, a nastali su smeđi kristali odsisani i dva puta dobro isprani eterom. Sirovi je smeđi produkt prekrizaliziran iz 15 mL smjese EtOAc : EtOH = 1:1, pri čemu je dobiven zlatno-žuti kristalinični spoj (14) (0,17 g, 25,2 %).



Shema 4.3. Sinteza spoja 14.

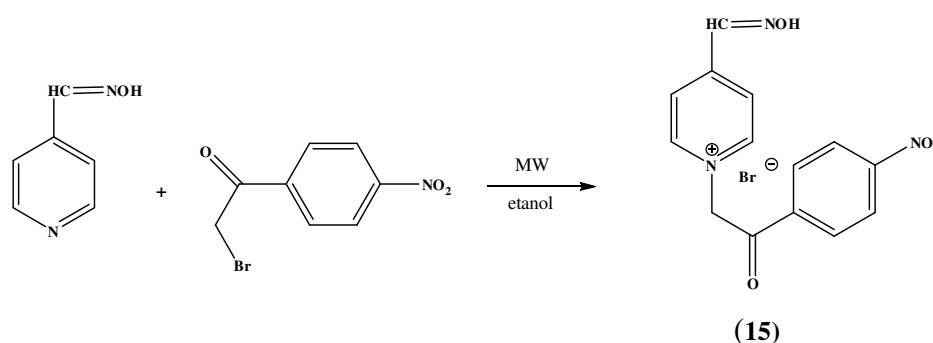
Tablica 4.17. Obilježja 2-metil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (14).

Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₃ Br
Molarna masa	337,17
Talište (°C)	251 – 252,2
IR (cm ⁻¹)	1716 (C=O); 1558 (C=N, C=C); 1558, 1373 (NO ₂)
¹ H-NMR (δ/ ppm)	8,24 (s, 1H, H-2); 8,24 - 8,23 (m, 1H, H-4); 8,17 - 8,16 (m, 1H, H-5); 7,96 - 7,97 (d, 2H, J = 8,82 Hz, H-3', H-5'); 7,42 - 7,44 (d, 2H, J = 9,00 Hz, H-2', H-6'); 6,90 (s, 2H, CH ₂); 6,72 - 7,75 (m, 1H, H-3); 2,5 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C-NMR (δ/ ppm)	196,5 (C=O); 155,1 (C-6); 152,3 (C-4'); 146,3 (C-4); 145,6 (C-2); 133,36 (C-1'); 129,7 (C-2', C-6'); 126,15 (C-5); 125,8 (C-3); 123,8 (C-3', C-5'); 96,89 (CH ₂ CO); 39,56 (CH ₃)

4.5.4. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (15)

Postupak

Piridin-4-aldoksim (0,24 g, 2 mmol) otopljen je u 10 mL apsolutnog etanola te je dodan otopini 2-brom-4'-nitroacetofenona (0,488 g, 2 mmol) u 10 mL apsolutnog etanola. Reakcijska je smjesa podvrgnuta MW zračenju (5 minuta pri 440 W) sve dok produkt nije bio vidljiv na TLC-u. Boja se otopine promijenila iz žute u smeđu. Etanol je djelomično uparen. Nastali je talog odsisan te prekrizaliziran iz smjese otapala EtOAc : EtOH = 1:1, 40 mL. Dobiven je spoj (15) u obliku sedefastih bijeložutih kristala (0,22 g, 30 %).



Shema 4.4. Sinteza spoja 15.

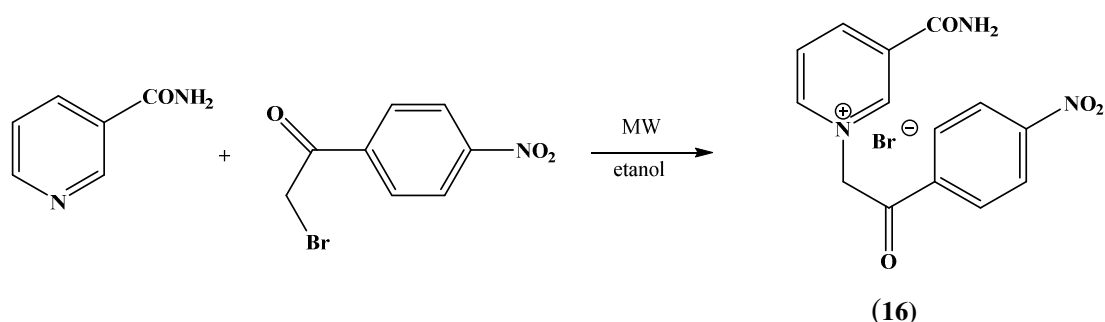
Tablica 4.18. Obilježja 4-hidroksiiminometil-1-(2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil)piridinijeva bromida (15).

Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₂ BrN ₃ O ₄
Molarna masa	366,17
Talište (°C)	229-232
IR (cm⁻¹)	3342 (O-H); 3055-2895 (=CH); 1703 (C=O); 1645-1601 (C=N, C=C); 1228 (C-O-H); 1047-993 (N-O, C-O); 1467, 1321 (NO ₂)
¹H-NMR (δ/ ppm)	12,9 (s, 1H, NOH); 9,00 - 8,48 (d, 2H, <i>J</i> = 6,86 Hz, H-2, H-6); 8,48 (s, 1H, HC=NOH); 8,46 - 8,44 (d, 2H, <i>J</i> = 8,23 Hz, H-3', H-5'); 8,37 - 8,36 (d, 2H, <i>J</i> = 6,86 Hz, H-2', H-6'); 8,30 - 8,28 (d, 2H, <i>J</i> = 8,69 Hz, H-3, H-5); 6,59 (s, 2H, CH ₂ CO)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	190,15 (C=O); 152,20 (C-4'); 150,62 (HC=NOH); 149,29 (C-4); 146,42 (C-2, C-6); 145,19 (C-1'); 129,76 (C-2', C-6'); 124,09 (C-3, C-5); 123,83 (C-3', C-5'); 66,04 (CH ₂ O)

4.5.5. Priprava 3-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (16)

Postupak

Nikotinamid (0,244 g, 2 mmol) i 2-brom-4'-nitroacetofenon (0,488 g, 2 mmol) otopljeni su u 20 mL apsolutnog etanola. Reakcijska je smjesa podvrgnuta MW zračenju (4 minute pri 440 W) sve dok produkt nije bio vidljiv na TLC-u. Hlađenjem su se istaložili žućkasto-bijeli sedefasti kristali koji su isprani etanolom te prekrystalizirani iz 40 mL smjese otapala EtOAc : EtOH = 1:1. Dobiveni su sedefasti bijeložuti kristali spoja (16) (0,32 g, 43,7 %).



Shema 4.5. Sinteza spoja 16.

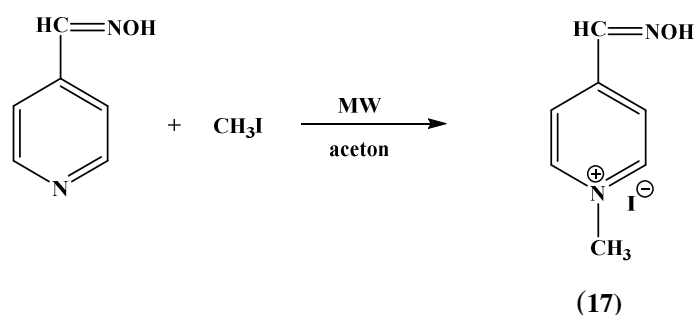
Tablica 4.19. Obilježja 3-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (16).

Molekulska formula	C ₁₄ H ₁₂ BrN ₃ O ₄
Molarna masa	366,17
Talište (°C)	250,2 – 250,9
IR (cm⁻¹)	3317 (NH ₂); 3134 CH; 1680 (CO); 1236 C-N; 938 C-NH ₂ ; 1521, 1398 (NO ₂)
¹H-NMR (δ/ ppm)	9,54 (s, 1H, H-2); 9,19 - 9,18 (d, 1H, <i>J</i> = 6,17 Hz, H-4); 9,15 - 9,13 (d, 1H, <i>J</i> = 8,23 Hz, H-5); 8,66 (s, 1H, H-6); 8,46-8,44 (d, 2H, <i>J</i> = 8,74 Hz, H-3', H-5'); 8,30 - 8,28 (d, 2H, <i>J</i> = 8,75 Hz, H-2', H-6'); 8,19 (s, 2H, CONH ₂); 6,65 (s, 2H, CH ₂ CO)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	189,94 (C=O); 162,77 (C=O iz CONH ₂); 150,60 (C-1'); 147,77 (C-4'); 146,77 (C-4); 144,14 (C-2); 138,24 (C-3); 133,49 (C-6); 129,75 (C-5); 127,56 (C-2', C-6'); 124,14 (C-3', C-5'); 66,67 (CH ₂ CO)

4.5.6. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (17)

Postupak

Piridin-4-aldoksim (0,871 g, 4 mmol) i metil-jodid (765 mL) otopljeni su u 5 mL acetona. Reakcijska je smjesa podvrgnuta MW zračenju (2 minute pri 250 W) sve dok produkt nije bio vidljiv na TLC-u. Reakcijska je smjesa nakon MW zračenja poprimila narančastu boju, pri čemu su se hlađenjem odmah istaložili žuti kristali koji su odfiltrirani, isprani acetonom te prekrizalizirani iz etanola. Dobiven je spoj (17) (0,98 g, 93,3 %).



Shema 4.6. Sinteza spoja 17.

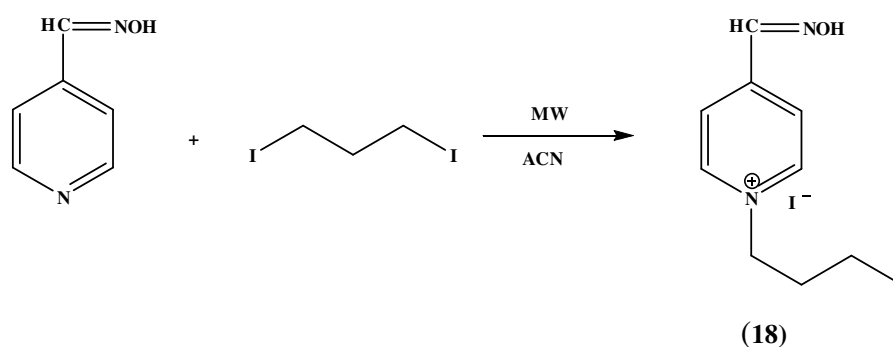
Tablica 4.20. Obilježja 4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (17).

Molekulska formula	C ₇ H ₉ N ₂ OI
Molarna masa	264,06
Talište (°C)	183-186
IR (cm⁻¹)	3311 (O-H); 3064-2893 (=CH); 1749 (C=O); 1618-1583 (C=N, C=C); 1205 (C-O-H); 1128-947 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	13,01 (bs, 1H, NOH); 8,98 - 8,97 (d, 2H, <i>J</i> = 6,17 Hz, H-2, H-6); 8,65 (s, 1H, CH=NOH); 8,37 - 8,35 (d, 2H, <i>J</i> = 7,89 Hz, H-3, H-5); 4,36 (s, 3H, CH ₃)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	146,48 (CH=NOH); 144,97(C-4); 141,68 (C-2, C-6); 127,13 (C-3, C-5); 46,24 (CH ₃)

4.5.7. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (**18**)

Postupak

Piridin-4-aldoksimu (0,5 g, 4,09 mmol) otopljenom u acetonitrilu (2 mL) dodan je 2,35 mL 1,3-dijodpropana. Već nakon jedne minute mikrovalnog zračenja pri 250 W primijećeno je nastajanje produkta u obliku promijene boje reakcijske smjese u žuto-smeđu. Hlađenjem su iskristalizirali žuti kristali koji su nakon odsisavanja tri puta isprani eterom i acetonom. Dobiven kromatografski čisti produkt (**18**), (1,33 g, 77, 8 %).



Shema 4.7. Sinteza spoja **18**.

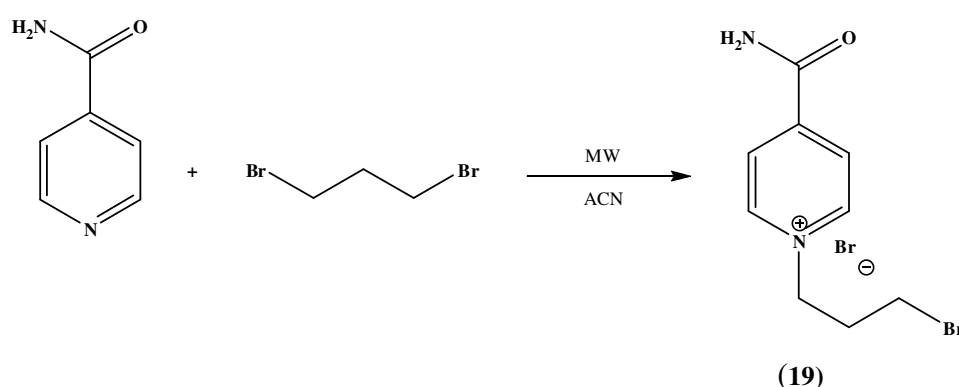
Tablica 4.21. Obilježja 4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (**18**).

Molekulska formula	C ₉ H ₁₂ I ₂ N ₂ O
Molarna masa	418,01
Talište (°C)	181,5
IR (cm ⁻¹)	3450 (O-H); 3444-2360 (=CH); 2360-2341 (N-O)
¹ H-NMR (δ/ ppm)	12,81 (s, 1H, NOH); 8,45 (s, 1H, HC=NOH); 8,56 - 8,54 (d, 2H, J = 6,69 Hz, H-2, H-6); 8,26 - 8,24 (d, 2H, J = 6,87 Hz, H-3, H-5); 4,65 - 4,61 (t, 2H, J = 13,84 Hz, H-1'); 3,29 - 3,24 (t, 2H, J = 14,29 Hz, H-3', CH ₂ I); 2,53 - 2,44 (m, 2H, H-2', CH ₂)
¹³ C-NMR (δ/ ppm)	149 (HC=NOH); 145,63 (C-2, C-6); 128,16 (C-3, C-5); 124,6 (C-4); 39,23 (C-1', CH ₂); 34,39 (C-2', CH ₂); 1,88 (C-3', CH ₂ I)

4.5.8. Priprava 1-(3-brompropil)-4-karbamoilpiridinijeva bromida (**19**)

Postupak

Otopini izonikotinamida (0,5 g, 4,09 mmol) u 3 mL acetonitrila dokapano je 2 mL 1,3-dibrompropana te je reakcijska smjesa ozračena u MW pećnici dvije minute pri 250 W. Hlađenjem kristaliziraju svijetlo-žuti kristali. Sirovi je produkt dobro ispran eterom i acetonom, a produkt je prekrizaliziran iz metanola. Dobiveno je 0,83 g spoja (**19**) (62,6 %).



Shema 4.8. Sinteza spoja **19**.

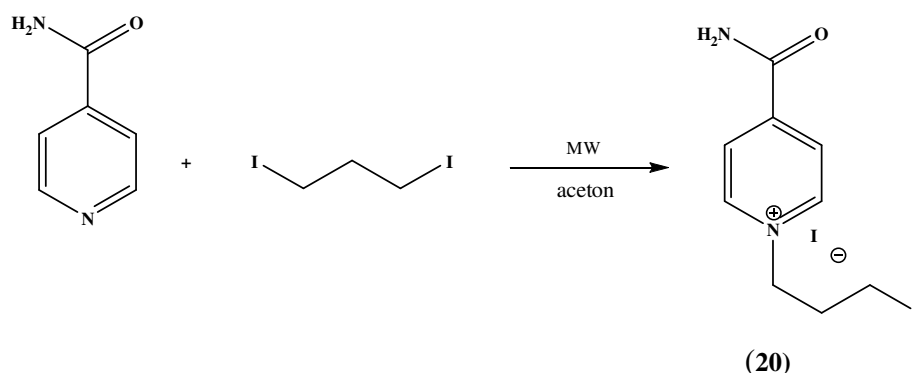
Tablica 4.22. Obilježja 1-(3-brompropil)-4-karbamoilpiridinijeva bromida (**19**).

Molekulska formula	C ₉ H ₁₂ N ₂ O Br ₂
Molarna masa	324,01
Talište (°C)	195-201
IR (cm ⁻¹)	3373 NH ₂ ; C-H (3136-3001); 1691 (C=O); 1124 (C-C); 597 O-C-N
¹ H-NMR (δ/ ppm)	9,34 - 9,33 (d, 2H, <i>J</i> = 6,69 Hz, H-2, H-6); 8,49 - 8,48 (d, 2H, <i>J</i> = 6,69 Hz, H-3, H-5); 8,28 (s, 2H, NH ₂); 4,83 - 4,80 (t, 2H, <i>J</i> = 14,83 Hz, H-1', CH ₂); 3,62 - 3,60 (t, 2H, <i>J</i> = 12,63 Hz, H-3', CH ₂ I); 2,56 - 2,51 (m, 2H, H-2', CH ₂)
¹³ C-NMR (δ/ ppm)	163,24 (C=O); 150,06 (C-4); 145,99 (C-2, C-6); 125,88 (C-3, C-5); 59,55 (C-1'); 33,04 (C-2'); 30,09 (C-3')

4.5.9. Priprava 4-karbamoil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (**20**)

Postupak

Otopini izonikotinamida (0,5 g, 4,09 mmol) u 10 mL acetona dokapano je 2,360 mL 1,3-dijodpropana te je reakcijska smjesa ozračena dvije minute pri 250 W. Hlađenjem kristaliziraju tamnožuti kristali. Sirovi je produkt odsisan, dobro ispran eterom i acetonom i prekrizaliziran iz etanola. Dobiveno je 0,83 g spoja (**20**) (48,6 %).



Shema 4.9. Sinteza spoja **20**.

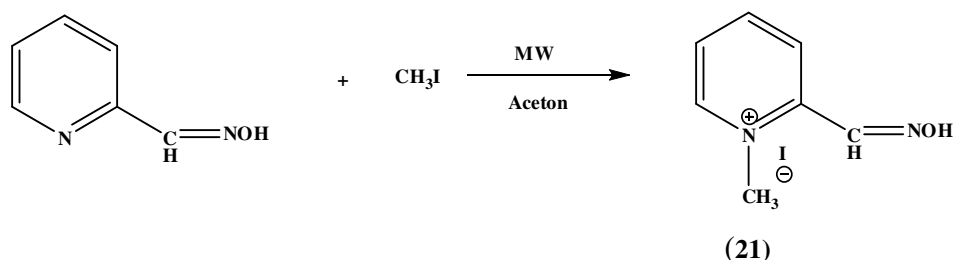
Tablica 4.23. Obilježja 4-karbamoil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (**20**).

Molekulska formula	C ₉ H ₁₂ N ₂ OI ₂
Molarna masa	418,01
Talište (°C)	216,6-217
IR (cm⁻¹)	3371 NH ₂ ; C-H (3190-3022); 1668 (C=O); 1126 (C-C); 602 O-C-N
¹H-NMR (δ/ ppm)	9,27 - 9,26 (d, 2H, <i>J</i> = 6,76 Hz, H-2, H-6); 8,65 (bs, 2H, NH ₂); 8,45 - 8,43 (d, 2H, <i>J</i> = 6,76 Hz, H-3, H-5); 4,72 - 4,70 (t, 2H, <i>J</i> = 14,28 Hz, CH ₂); 3,28 - 3,26 (t, 2H, <i>J</i> = 14,28 Hz, CH ₂ I); 2,53-2,49 (m, 2H, CH ₂)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	163,25 (CO); 148,24 (C-4); 145,93 (C-2, C-6); 125,87 (C-3, C-5); 61,43 (C-1'); 30,90 (C-2'); 1,27 (C-3')

4.5.10. Priprava 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (21)

Postupak

Piridin-2-aldoksim (2 g, 16,38 mmol) otopljen je u 10 mL acetona a potom mu je dokapano 3,48 g metil-jodida. Reakcijska je smjesa podvrgnuta MW zračenju (4 minute pri 250 W) pri čemu su hlađenjem odmah iskristalizirali svijetložuti kristali. Nakon odsisavanja su kristali isprani eterom i prekrizalizirani iz apsolutnog etanola. Dobiveno je 3,77 g (93,54 %) zlatnožutih kristala spoja (21).



Shema 4.10. Sinteza spoja 21.

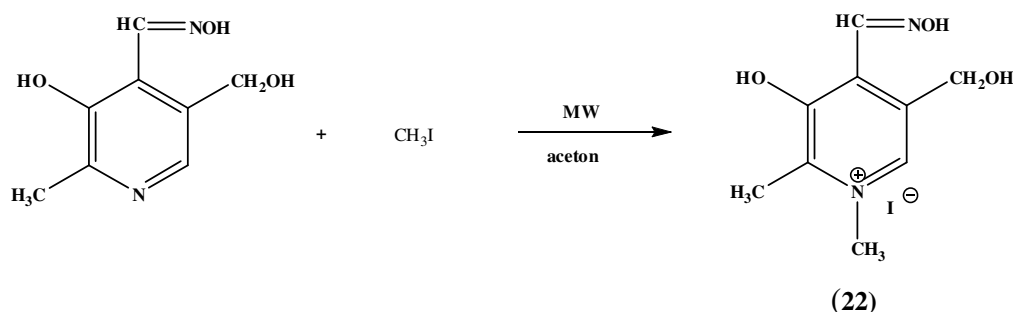
Tablica 4.24. Obilježja 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (21).

Molekulska formula	C ₇ H ₉ N ₂ OI
Molarna masa	264,06
Talište (°C)	225-227
IR (cm ⁻¹)	3072 (O-H); 3032-2868 (=C-H); 1624-1591 (C=N, C=C); 1294 (C-O-H)
¹ H-NMR (δ/ ppm)	13,06 (bs, 1H, NOH); 8,99 - 8,97 (d, 1H, J = 6,08 Hz, H-6); 8,65 (s, 1H, HC=NOH); 8,53 - 8,51 (t, 1H, J = 15,93 Hz, H-4); 8,50 - 8,49 (m, 1H, H-5); 8,37-8,35 (d, 1H, J = 7,66 Hz, H-3); 4,36 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C-NMR (δ/ ppm)	147,38 (C-2); 146,46 (HC=NOH); 145,34 (C-4); 141,7 (C-6); 127,11 (C-3); 124,86 (C-5); 46,24 (CH ₃)

4.5.11. Priprava 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijeva jodida (**22**)

Postupak

Piridoksal-oksime (0364 g, 2 mmol) je otopljen je uz zagrijavanje na magnetskoj mješalici u 100 mL acetona. Otopini je potom dokapan metil-jodid (0,622 mL, 10 mmol). Reakcijska je smjesa potom podvrgnuta mikrovalnom zračenju (10 minuta pri 250 W) nakon čega je uočeno nastajanje produkta. Reakcijska je smjesa ostavljena u tami i pritom se istaložio produkt u obliku smečkastozelenih kristalića. Dobiven je spoj (**22**) (0,51 g, 78,7 %).



Shema 4.11. Sinteza spoja **22**.

Tablica 4.25. Obilježja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijeva jodida (**22**).

Molekulska formula	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ I
Molarna masa	324,12
Talište (°C)	185,5
IR (cm⁻¹)	3402 (O-H); 3041-2853 (=C-H); 1647-1541 (C=N, C=C); 1267 (C-O-H); 1045-987 (N-O, C-O)
¹H-NMR (δ/ ppm)	13,34 (s, 1H, NOH); 8,62 (s, 1H, OH, C-5); 8,55 (s, 1H, HC=NOH); 8,50 (s, 1H, H-2); 4,76 (s, 2H, CH ₂ OH); 4,52 (s, 1H, CH ₂ OH); 4,27 (s, 3H, CH ₃); 2,66 (s, 3H, CH ₃ , C-6)
¹³C-NMR (δ/ ppm)	152,84 (C-5); 146,27 (HC=NOH); 145,50 (C-6); 137,17 (C-2); 135,11 (C-4); 127,42 (C-3); 58,81 CH ₂ OH; 46,76 (CH ₃); 13,83 (CH ₃ , C-6)

4.5.12. Analiza spektara kvaternih soli derivata piridina

Intenzivna vrpca rastezanja OH skupine u oksimima (**15**, **17**, **18**, **21** i **22**) nalazi se u području $3450 - 3030 \text{ cm}^{-1}$. Vrpca skupne $C = N$ pojavljuje se između 1615 i 1585 cm^{-1} , a u ovisnosti o daljnjim arilnim supstituentima većinom pri nešto većim valnim duljinama. Budući da se u istom području javljaju vibracije aromatskog prstena, vrpca $C = N$ većinom nije jednoznačno određiva. Vrpca istezanja $N - O$ nalazi se u području $1055 - 870 \text{ cm}^{-1}$ i podijeljena je često na više maksimuma.

Intenzivna vrpca za NH_2 skupinu u spojevima **16**, **19** i **20** pokazuje frekvenciju istezanja $N - H$ skupine u području $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$.

Nitro skupina u spojevima **13**, **14**, **15**, **16** se pojavljuje u dvije intenzivne vrpce: antisimetričnog (oko 1550 cm^{-1}) i simetričnog (oko 1360 cm^{-1}) istezanja.

Karbonilna skupina u aromatskim karbonilnim spojevima pokazuje intenzivnu vrpcu oko 1700 cm^{-1} . Aromatski prsten ovdje djeluje u pravilu kao elektrondonor i uzrokuje pomak $\nu(C = O)$ prema većim valnim duljinama.

Strukture spojeva **12** - **22** su određene na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta sprega spin-spin između jezgara H-H.

Spektri 1H -NMR za spoj **12** (1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijev klorid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-3, H-4, H-5 i H-6) te signal za metilenske protone između tiazolnog i piridinskog prstena te signal za jedan proton u tiazolnom prstenu (H-5'). Uočen je također signal za dva protona u amino skupini vezanoj na tiazolnom prstenu te signal za metilnu skupinu na piridinskom prstenu (α -pikolina). Spektri ^{13}C -NMR za spoj **12** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), zatim signal atoma ugljika vezanog na C-2 položaj piridinskog prstena kao i signale atoma ugljika u tiazolnom prstenu (C-1', C-3', C-5'), te signal za ugljikov atom metilenske skupine između tiazolnog i piridinskog prstena (tablica 4.15.).

Spektri 1H -NMR za spoj **13** (1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), zatim signale za protone metilenske skupine vezane za N atom piridinskog prstena te signale za protone fenilnog prstena (H-2', H-3', H-5', H-6'). Spektri ^{13}C -NMR za spoj **13** pokazuju signale atoma

ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signale atoma ugljika u fenilnom prstenu (C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), te signal za ugljikov atom metilenske skupine vezane na dušikov atom piridinskog prstena te signal za karbonilni ugljik vezan na fenilni prsten (tablica 4.16.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **14** (2-metil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-4, H-5), zatim signale za protone metilenske skupine vezane za N atom piridinskog prstena te signale za protone fenilnog prstena (H-2', H-3', H-5', H-6') te signal za protone metilne skupine vezane na C-6 atom piridinskog prstena. Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **14** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signale atoma metilne skupine na šestom C atomu piridinskog prstena te signale ugljika u fenilnom prstenu (C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), signal za ugljikov atom metilenske skupine vezane na dušikov atom piridinskog prstena te signal za karbonilni ugljik vezan na fenilni prsten (tablica 4.17.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **15** (4-hidroksiiminometil-1-(2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-5, H-6), jedan široki signal za proton iz hidroksilne oksimske skupine te proton vezan za ugljik ne koje m se nalazi oksimska skupina, zatim signale za protone metilenske skupine vezane za N atom piridinskog prstena te signale za protone fenilnog prstena (H-2', H-3', H-5', H-6'). Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **15** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma na koji je vezana oksimska skupina, signale ugljika u fenilnom prstenu (C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), signal za ugljikov atom metilenske skupine vezane na dušikov atom piridinskog prstena te signal za karbonilni ugljik vezan na fenilni prsten (tablica 4.18.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **16** (3-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-4, H-5, H-6), signal za protone iz karboksamidne skupine, zatim signale za protone metilenske skupine vezane za N atom piridinskog prstena te signale za protone fenilnog prstena (H-2', H-3', H-5', H-6'). Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **16** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma iz karboksamidne skupine, signale ugljika u fenilnom prstenu (C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), signal za ugljikov atom metilenske skupine vezane na dušikov atom piridinskog prstena te signal za karbonilni ugljik vezan na fenilni prsten (tablica 4.19.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **17** (4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev jodid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-5, H-6), jedan široki signal za proton iz hidroksilne oksimske skupine te proton vezan za ugljik na kojem se nalazi oksimska skupina te signale za protone metilne skupine vezane za dušikov atom piridinskog prstena. Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **17** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma na koji je vezana oksimska skupina te signal za ugljikov atom metilne skupine vezane za dušikov atom piridinskog prstena (tablica 4.20.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **18** (4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijev jodid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-5, H-6), jedan široki signal za proton iz hidroksilne oksimske skupine te proton vezan za ugljik na kojem se nalazi oksimska skupina te signale iz bočnog lanca vezanog za dušikov atom (H-1', H-2', H-3'). Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **18** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma na koji je vezana oksimska skupina te signal za ugljikove atome bočnog lanca povezanog za dušikov atom piridinskog prstena (C-1', C-2' i C-3') (tablica 4.21.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **19** (1-(3-brompropil)-4-karbamoilpiridinijev bromid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-5, H-6), jedan signal za protone iz karboksamidne skupine, te signale iz bočnog lanca vezanog za dušikov atom (H-1', H-2', H-3'). Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **19** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma karboksamidne skupine, te signal za ugljikove atome bočnog lanca povezanog za dušikov atom piridinskog prstena (C-1', C-2' i C-3') (tablica 4.22.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **20** (4-karbamoil-1-(3-jodpropil)piridinijev jodid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-2, H-3, H-5, H-6), jedan signal za protone iz karboksamidne skupine, te signale iz bočnog lanca vezanog za dušikov atom (H-1', H-2', H-3'). Spektri $^{13}\text{C-NMR}$ za spoj **20** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma karboksamidne skupine, te signal za ugljikove atome bočnog lanca povezanog za dušikov atom piridinskog prstena (C-1', C-2' i C-3') (tablica 4.23.).

Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spoj **21** (2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev jodid) pokazuju signale za protone piridinskog prstena (H-3, H-4, H-5, H-6), jedan široki signal za proton iz hidroksilne oksimske skupine te proton vezan za ugljik na kojem se nalazi oksimska skupina,

te signale iz metilne skupine vezane za dušikov atom. Spektri ^{13}C -NMR za spoj **21** pokazuju signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma na koji je vezana oksimska skupina te signal za metilnu skupinu vezanu za dušikov atom piridinskog prstena (tablica 4.24.).

Spektri ^1H -NMR za spoj **22** (3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijev jodid) pokazuju signale za proton piridinskog prstena, protone iz hidroksimetilne skupine vezane na položaju tri piridinskog prstena, jedan široki signal za proton iz hidroksilne oksimske skupine, proton vezan za ugljik na položaju četiri piridinskog prstena, signal protona hidroksilne skupine na položaju pet piridinskog prstena te signal metilne skupine na položaju šest piridinskog prstena. Spektri ^{13}C -NMR za spoj **22** pokazuju signal atoma ugljika iz CH_2OH skupine, signale atoma ugljika piridinskog prstena (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), signal ugljikovog atoma na koji je vezana oksimska skupina, signal metilne skupine sa položaja šest piridinskog prstena kao i metilne skupine vezane za dušikov atom (tablica 4.25.).

4.6. Ispitivanja reaktivacijske sposobnosti pripremljenih oksima

Pripremljenim je oksimima (2 - 10) ispitana sposobnost reaktivacije ljudske eritrocitne AChE i serumske BChE inhibirane bojnim otrovima tabunom i VX-om te pesticidom paraoksonom. Ispitivanja su provedena na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. U tablicama 4.26. do 4.31. izračunate su konstante brzine reaktivacije (k_{obs}) prema izrazu (1) iz poglavlja 3.6., maksimalna reaktivacija prema izrazu (3) iz poglavlja 3.6. (Kovarik i sur., 2008.) te je dano vrijeme reakcije koje govori kada je postignut maksimum reaktivacije.

Tablica 4.26. Oksimima potpomognuta reaktivacija ljudske eritrocitne AChE inhibirane VX-om.

Oksimi	k_{obs} (min^{-1})	Maksimalna reaktivacija (%)	Vrijeme reakcije (h)
2	0,0004	60	23
3	0,0003	50	23
4	0,0008	75	23
5	0,0005	70	23
6	0,0004	40	23
7	0,0008	80	23
8	0,0008	70	23
9	0,0010	85	23
10	0,0010	40	12

Tablica 4.27. Oksimima potpomognuta reaktivacija ljudske eritrocitne AChE inhibirane tabunom.

Oksimi	k_{obs} (min^{-1})	Maksimalna reaktivacija (%)	Vrijeme reakcije (h)
2	-	< 15	24
3	-	< 10	24
4	-	< 15	24
5	-	< 10	24
6	-	< 10	24
7	-	< 10	24
8	-	< 10	24
9	-	< 10	24
10	-	< 10	24

Tablica 4.28. Oksimima potpomognuta reaktivacija ljudske eritrocitne AChE inhibirane paraoksonom.

Oksimi	k_{obs} (min^{-1})	Maksimalna reaktivacija (%)	Vrijeme reakcije (h)
2	0,0006	40	24
3	0,0008	50	24
4	0,0013	60	24
5	0,0009	50	24
6	0,0008	40	24
7	0,0011	40	24
8	0,0009	60	24
9	0,0011	40	24
10	0,0013	75	24

Tablica 4.29. Oksimima potpomognuta reaktivacija BChE inhibirane VX-om.

Oksimi	k_{obs} (min^{-1})	Maksimalna reaktivacija (%)	Vrijeme reakcije (h)
2	0,0017	75	23
3	0,0009	65	23
4	0,0034	95	12
5	0,0051	90	8
6	0,0007	40	10
7	0,0027	85	12
8	0,0087	95	5
9	0,0026	100	23
10	0,0040	95	12

Tablica 4.30. Oksimima potpomognuta reaktivacija BChE inhibirane tabunom.

Oksimi	k_{obs} (min^{-1})	Maksimalna reaktivacija (%)	Vrijeme reakcije (h)
2	-	< 10	24
3	-	< 10	24
4	-	< 10	24
5	-	< 10	24
6	-	< 10	24
7	-	< 10	24
8	-	< 10	24
9	-	< 10	24
10	-	< 10	24

Tablica 4.31. Oksimima potpomognuta reaktivacija BChE inhibirane paraoksonom.

Oksimi	k_{obs} (min^{-1})	Maksimalna reaktivacija (%)	Vrijeme reakcije (h)
2	0,0004	35	23
3	0,0004	35	23
4	0,0011	60	23
5	0,0013	70	23
6	0,0010	20	8
7	0,0013	65	23
8	0,0013	65	23
9	0,0009	80	23
10	0,0005	30	23

4.7. Reverzibilna inhibicija AChE i BChE sintetiziranim oksimima

U tablicama je prikazana reverzibilna inhibicija AChE i BChE pomoću oksima sintetiziranih u okviru ovoga rada. Konstanta inhibicije za oba enzima određena je u prisutnosti supstrata acetiltiokolina (0,05 - 0,50 mM) prema izrazu (6) iz poglavlja 3.7. (Kovarik i sur., 2008.; Katalinić, 2011.).

Tablica 4.32. Reverzibilna inhibicija ljudske rekombinantne AChE oksimima 2 - 10.

Oksimi	Koncentracija oksima (μM)	K_i (μM)
2	100-330	127 \pm 23
3	83-125	42 \pm 5
4	100-300	231 \pm 34
5	100-300	104 \pm 22
6	200-330	167 \pm 26
7	100-300	436 \pm 85
8	100-300	126 \pm 11
9	200-330	127 \pm 36
10	200-330	89 \pm 45

Tablica 4.33. Reverzibilna inhibicija BChE izolirane iz ljudske plazme oksimima 2 - 10.

Oksimi	Koncentracija oksima (μM)	K_i (μM)
2	50-300	69 \pm 17
3	17-167	8 \pm 3
4	100-300	204 \pm 53
5	50-300	164 \pm 56
6	100-500	112 \pm 53
7	100-300	222 \pm 56
8	100-670	469 \pm 121
9	100-500	168 \pm 99
10	100-670	228 \pm 72

4.8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih spojeva

Spojevima sintetiziranim u okviru ove disertacije ispitano je antibakterijsko djelovanje na dvije Gram-pozitivne bakterije (*Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*) i dvije Gram-negativne bakterije (*Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas syringae*). Antibakterijska je aktivnost izražena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) koja odgovara koncentraciji pri kojoj je rast stanica inhibiran, ali se prenošenjem u novu sterilnu podlogu stanice umnožavaju te minimalna baktericidna koncentracija (MBK) koja odgovara koncentraciji pri kojoj su stanice uništene.

U tablici 4.34. prikazane su MIK te MBK za seriju spojeva pripremljenih iz piridoksaloksima i različitih fenacil-bromida (**2 – 10**) te u tablici 4.35. za neke pripravljene kvaterne soli derivata piridina (**12, 13, 14, 16**).

Tablica 4.34. Minimalna inhibitorna koncentracija i minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih tvari na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije za seriju spojeva pripremljenih iz piridoksal-oksima i različitih fenacil-bromida. (MIK i MBK su izražene u ppm)

Vrsta bakterije		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
		MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Gram-pozitivne	<i>Enterococcus faecalis</i>	2500	-	5000	-	2500	-	5000	-	5000	-	5000	-	5000	-	-	-	5000	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2500	-	2500	-	5000	-	5000	-	2500	-	2500	-	5000	-	5000	-	5000	-
Gram-negativne	<i>Salmonella enteritidis</i>	5000	-	5000	-	5000	-	5000	-	2500	-	5000	-	5000	-	5000	-	5000	-
	<i>Pseudomonas syringae</i>	2500	>2500	2500	>5000	2500	>2500	2500	>2500	1250	>5000	2500	>5000	5000	>5000	5000	>5000	1250	>2500

Tablica 4.35. Minimalna inhibitorna koncentracija i minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih tvari na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije za različite analoge piridina (MIK i MBK su izražene u ppm)

Vrsta bakterije		12		13		14		16	
		MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Gram-pozitivne	<i>Enterococcus faecalis</i>	2500	-	1250	5000	5000	-	2500	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2500	-	625	625	2500	-	5000	5000
Gram-negativne	<i>Salmonella enteritidis</i>	5000	-	625	2500	2500	-	2500	-
	<i>Pseudomonas syringae</i>	1250	5000	625	625	625	5000	625	625

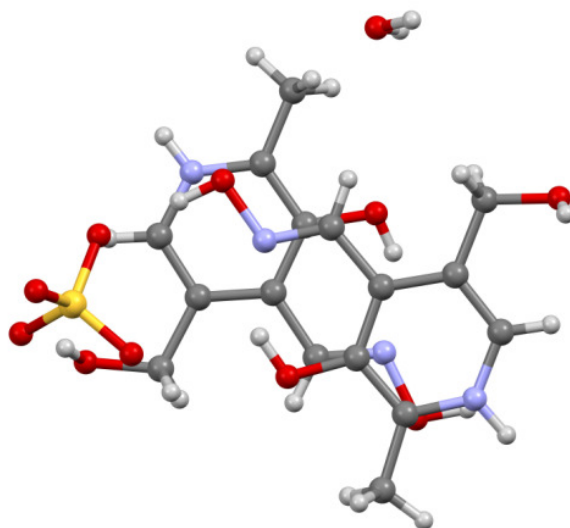
5. RASPRAVA

5.1. Priprava polaznog spoja 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridina (piridoksal-oksima) (1)

S ciljem pripreme kvaternih soli piridoksal-oksima pripravljen je polazni spoj - piridoksal-oksime (1) na dva načina:

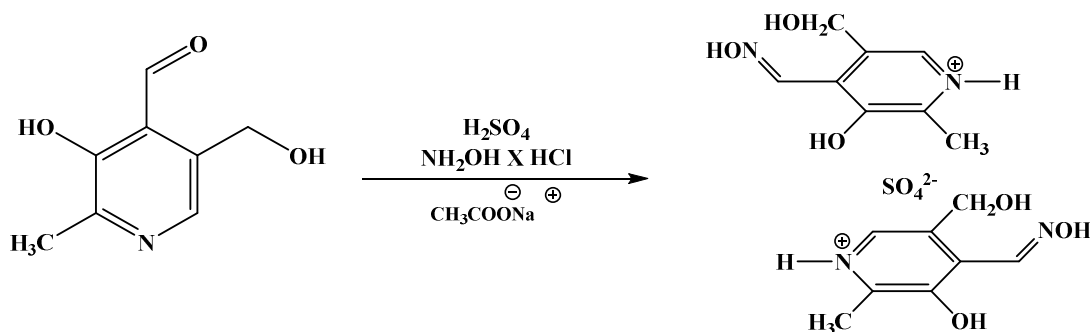
- i. oksimiranjem piridoksala
- ii. oksidacijom piridoksina i oksimiranjem nastalog piridoksala bez prethodne izolacije (*in situ*)

U namjeri skraćenja sintetskog puta provedeno je oksimiranje piridoksala pomoću hidroksilamin hidroklorida u prisutnosti sumporne kiseline. Dobiven je bijeli kristalinični produkt koji je kromatografski bio identičan piridoksal-oksimu pripravljenom po metodi (ii) (Gašo-Sokač, 2009). Međutim, tako pripravljeni spoj nije reagirao s fenacil-bromidima pa je podvrgnut kristalografskoj analizi. Ta je analiza pokazala da se radi o neklasičnom dimeru piridina koji je građen od dvaju protoniranih piridinskih prstena između kojih je inkorporirana sulfatna skupina (slika 5.1., shema 5.1.).



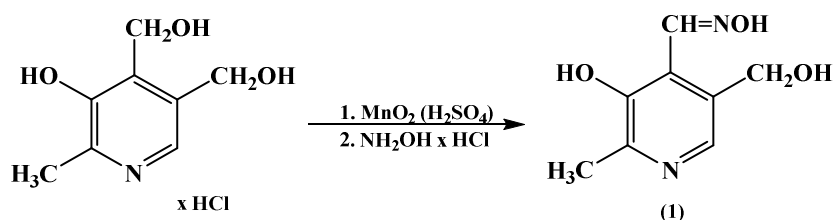
Slika 5.1. Molekulska struktura kompleksa dviju molekula piridinijeva oksima i sulfatne skupine.

Kao što se vidi dva, piridinijska kationa nisu direktno povezana vodikovim vezama, već su povezani preko sulfatne skupine. Piridinijski prstenovi su međusobno približno paralelni te se nalaze pod kutom od 30 °.



Shema 5.1. Nastajanje piridinskog dimera oksimiranjem piridoksala.

Priprava kvaternih soli piridoksal-oksima bila je uspješna samo iz oksima pripravljenog drugom metodom tj. oksidacijom piridoksina pomoću manganova(IV) oksida (Gašo-Sokač 2009.).



Shema 5.2. Reakcija priprave piridoksal-oksima.

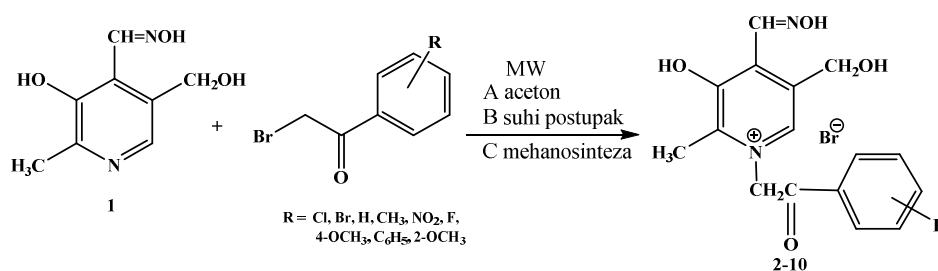
Učinkovitost ove oksidacijske metode ovisi o aktivnosti manganova(IV) oksida, odnosno o načinu njegovog aktiviranja. On se aktivira u sušioniku pri temperaturi od 110 do 120 °C u vremenu od 12 do 24 sata. Utvrđeno je da se njegova aktivnost povećava sušenjem pri 125 °C u vremenu dužem od 24 sata. Poznato je da se manganov(IV) oksid koristi u

oksidaciji alilnih i benzilnih alkohola do enona ili enala u slabo kiseloj sredini (Fatiadi, 1976.).

Dobiveni piridoksal nije izoliran iz reakcijske smjese nego je odmah podvrgnut oksimiranju. Nastao je piridoksal-oksim kao monomerni produkt koji je uspješno reagirao s fenacil-bromidima u svrhu dobivanja kvaternih soli.

5.2. Priprava kvaternih soli piridoksal-oksima

S ciljem ekološki prihvatljivije priprave monokvaternih soli piridoksal-oksima izvedene su reakcije kvaternizacije piridoksal-oksima (**1**) s fenacil-bromidima supstituiranim u položaju 4' (R = Cl, Br, H, CH₃, NO₂, F, OCH₃, C₆H₅) i 2' (R = OCH₃), (shema 5.3.)



Shema 5.3. Priprava kvaternih soli piridoksal-oksima **2 - 10**.

Za piridinijeve su spojeve **2 - 10** ispitane tri ekološki prihvatljive sintetske metode (tablice 4.2. i 4.3.). Produkti reakcija koji su nastali hlađenjem ozračene smjese bili su uglavnom kromatografski čisti. Prekristalizirani su iz odgovarajućih otapala: metanola i etil-acetata, ovisno o topljivosti pojedinog produkta. Tako su spojevi **2, 4, 5 i 10** prekristalizirani iz metanola dok su spojevi **3, 6, 7, 8 i 9** prekristalizirani iz etil-acetata.

U nemodificiranoj kućnoj mikrovalnoj pećnici nije uvijek moguće djelotvorno prilagoditi snagu za odvijanje određene sinteze. Optimiranjem reakcijskih uvjeta pri različitoj snazi od 240 W, 440 W, 600 W i 850 W, koja je ujedno bila i najveća za primijenjenu kućnu mikrovalnu pećnicu utvrđeno je da su najbolji rezultati, uz optimalno vrijeme i najmanje nusprodukata dobiveni pri srednjoj snazi od 440 W. Stoga su daljnje kvaternizacije aktivirane mikrovalnim zračenjem na piridoksal-oksimu izvršene pri snazi od 440 W. Aceton je odabran kao najprikladnije MW otapalo zbog toga što su u klasičnoj sintezi u njemu dobivena najviša iskorištenja, (u usporedbi s metanolom i *N,N*-dimetilformamidom u kojima su iskorištenja klasičnom metodom bila znatno niža) (Gašo-Sokač disertacija, 2009.). Zanimljivo je da su reakcije izvedene u acetonu klasičnim postupkom trajale od jednog do tri tjedna s izuzetkom

2-brom-2'-metoksiacetofenona koja je trajala 3 mjeseca. Vrijeme zračenja u MW pećnici u acetonu iznosilo je najviše 5 minuta nakon čega je produkt hlađenjem smjese potpuno iskristalizirao za samo nekoliko dana. Naime, u samom postupku prilikom aktivacije MW zračenjem odmah je vidljivo nastajanje produkta i kromatografski i prema promjeni boje otopine u intenzivno žutu. Neki su produkti kristalizirali odmah, a kristalizacija je kod većine dovršena tijekom nekoliko dana.

Veliku važnost u mikrovalnoj organskoj sintezi ima učinkovitost molekula otapala u apsorpiranju MW energije. Pri odabiru otapala za MW sintezu vrelišta nisu odlučujući čimbenik jer se djelovanjem MW energije sva otapala zagriju do temperature vrelišta u nekoliko sekundi. Nadalje, kad su otapala izložena MW zračenju, vrelišta su viša u odnosu na klasično zagrijavanje što se naziva učinkom pregrijavanja. Aceton ima niski tangens δ gubitka što znači da manje djelotvorno pretvara mikrovalnu energiju u termičku energiju te se sporije zagrijava. Najveće iskorištenje u mikrovalnom postupku s acetonom bilo je za spoj 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-metilfenacil)piridinijev bromid (**5**), a iznosilo je 94 % dok je u suhom postupku najveće iskorištenje postignuto za spoj 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-nitrofenacil) piridinijev bromid (**6**) i iznosio je 80 %. Najmanje je iskorištenje bilo u reakciji kvaternizacije piridoksal-oksima s 2-brom-2'-metoksiacetofenomom, iznosilo je samo 41 % u suhom postupku odnosno 58 % u mikrovalnom postupku u acetonu. Nisko se iskorištenje može pripisati steričkim smetnjama metoksi skupine u *ortho*- položaju elektrofila koja ometa kvaternizaciju nukleofilnog dušikova atoma piridoksal-oksima.

Istaknuto mjesto u reakcijama potpomognutim MW zračenjem zauzimaju reakcije u kojima se ne rabe otapala (engl. „*solvent free reaction* ili *dry-media reaction*“) ili reakcije uz najmanju količinu otapala (engl. „*liquid-assisted grinding*“, LAG). Sintetske tehnike koje se često primjenjuju u MW sintezi reakcije su u kojima se rabe nerazrijeđeni reagensi i reaktanti te sinteze na anorganskim nosačima. U ovom je istraživanju izveden postupak kvaternizacije miješanjem reaktanata bez otapala. Na ovoj vrsti spojeva navedeni postupak dosada nije bio primijenjen. Za kvaternizaciju aktiviranu MW zračenjem nije bilo dovoljno samo pomiješati dva polazna spoja, već je bilo potrebno dodati i anorganski nosač koji je aktivirao reakciju. Kao nosač je korišten silikagel na koji su se adsorbirali reaktanti te je izlaganjem MW zračenju primijećeno nastajanje produkta i kromatografski i značajnom promjenom boje najčešće u narančastosmeđu. U nekim su istraživanjima osim silikagela korišteni i drugi anorganski nosači (aluminijevi oksidi, gline i zeoliti) (Varma, 1999.; Loghmani-Khouzani i

sur.; 2002.; Lalitha i Sivakamasundari, 2010.). Izbor čvrstog nosača ovisi o tipu reakcije, a u nekim reakcijama čvrsti nosač djeluje i kao katalizator te ga je moguće reciklirati. Primjerice, aluminijski oksidi djeluju kao baze, silikagel kao slaba kiselina, a montmorilonitne su gline slične kiselosti kao sumporna kiselina (Clark i Macquarrie, 1997.; Clark i Macquarrie, 1996.). S obzirom na to da se ove reakcije odvijaju pri sobnoj temperaturi moguće je korištenje mineralnih smola budući da one imaju nisku moć apsorpcije MW zračenja i slabu termičku vodljivost. U provedenim je suhim postupcima korištena mala količina silikagela (500 mg), dovoljna za adsorpciju reaktanata na njegovu površinu, te za aktivaciju reakcije. Kao što se moglo očekivati reakcije kvaternizacije suhim postupkom odvijale su se u kraćem vremenu i uz bolja iskorištenja nego klasičnim putem (tablica 4.2.).

Za reakciju kvaternizacije piridoksal-oksima s 2-brom-1-(4-klorfenil)etanonom pri mikrovalnoj snazi 440 W prikazan je termički profil (slika 4.1.). Pri optimiziranju reakcije kao prvi korak izabrano je vrijeme od 20 minuta. Početna temperatura iznosila je 25 °C, a najveća je temperatura uočena u sedamnaestoj minuti i iznosila je 118 °C. Nakon toga temperatura je počela opadati. Vidljiva je promjena boje iz sivkastobijele u smeđu. Nakon 20 minuta u reakcijskoj je smjesi bilo dosta nusprodukata, koji nisu naknadno identificirani. Najviši prinosi postignuti su oko desete minute. U reakcijskoj smjesi nije identificirano puno nusprodukata, a izmjerena je temperatura od 76 °C. Budući da reakcija nije kvantitativna, nakon mikrovalnog zračenja u reakcijskoj smjesi zaostaje dio polaznog materijala. Zbog toga je postupak pročišćavanja bio znatno duži nego kod klasične metode. Da bi se produkt oslobodio s površine silikagela bilo ga je potrebno ekstrahirati odgovarajućim otapalom. Kao otapalo za ekstrakciju korišten je aceton. Potom je silikagel odvojen filtracijom, a ostatak preostalog produkta sa silikagela ekstrahiran je etanolom. Silikagel je odvojen filtracijom, etanol uparen te suhi ostatak otopljen u acetonu. Acetonski su ekstrakti sjedinjeni, budući da iz acetonskog ekstrakta kristalizira kromatografski čist produkt koji nije topljiv u acetonu. Iako je postsintetička faza u suhom postupku bila duža i zahtjevnija nego ona u postupku s otapalom, postupak je ipak prihvatljiv jer su prinosi viši nego kod klasične metode.

Mehanokemijske reakcije pružaju novi pristup zelenoj kemiji koji do sada nije bio posebno istraživani. Iz dosadašnjeg literaturnog pregleda vidljivo je da metoda mehanokemije pruža nove mogućnosti u sintetskoj organskoj kemiji i primjeni za druge reakcije (James i sur., 2012.; Beyer i sur., 2005.). Dobiveni rezultati vlastitih istraživanja ukazuju kako je ova metoda prikladna za izvođenje reakcije kvaternizacije piridoksal-oksima i serije fenacil-

bromida, budući da je riječ o krutim polaznim supstancijama. Od više mogućih mehanokemijskih metoda, izabrana je najjednostavnija u tarioniku s tučkom. Usitnjavanjem čestica u tarioniku dolazi do povećanja površine i pobuđivanja lokalnih reakcijskih mjesta kao posljedica prijenosa mehaničke energije izazvane različitim izvorima poput udara, trenja, smičnih i posmičnih naprezanja. Pri tome na pojedinim mjestima nastaju lokalne točke visokog tlaka koji aktivira lokalna reakcijska mjesta. Razvija se i toplina te dolazi do boljeg kontakta reaktanata, budući da je unesena samo najmanja količina otapala (mikrolitarska količina). Usitnjavanjem piridoksal-oksima (**1**) i odgovarajućih 2-bromacetofenona u stehiometrijskom omjeru 1:1 pri sobnoj temperaturi nije uočeno nastajanje produkta niti nakon 60 minuta usitnjavanja u tarioniku. Međutim, dodatak otapala povećao je brzinu kemijske reakcije i nastanak produkta u mehanokemijskoj sintezi. Dodatkom 300 μL apsolutnog etanola u reakcijsku smjesu i male količine silikagela (500 mg), uočeno je nastajanje produkta već nakon 10 do 30 minuta usitnjavanja u tarioniku. Dobivena iskorištenja bila su za većinu spojeva viša od onih dobivenih klasičnom sintezom, a iznosila su od 24 % za spoj (**10**) do 88 % za spoj (**8**). Sinteze uz mikrolitarsku količinu otapala mogu se smatrati „suhim postupkom“. Silikagel koji se koristio kao anorganski nosač može se vrlo lako i jednostavno regenerirati. Iako sinteza ima značajne prednosti u odnosu na klasičnu metodu još uvijek postoje određene poteškoće u postsintetskom postupku pročišćavanja dobivenog produkta. Postupak pročišćavanja bio je znatno duži nego kod mikrovalne sinteze u acetonu.

5.3. Spektralna obilježja spojeva iz serije piridoksal-oksima

Nakon izolacije i pročišćavanja sirovih produkata, dobiveni su kromatografski čisti spojevi **2 - 10** kojima su snimljeni spektri (IR, $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$) (tablice 4.4. do 4.12.).

U IR-spektrima kvaternih soli piridoksal-oksima **2 - 10** položaji vrpce i asignacija koje potječu od vibracija istezanja oksimske hidroksilne skupine (-OH), vibracija istezanja intramolekularno vezanih hidroksilnih skupina kao i aromatskog C-H u skladu su sa literaturom (Günzler i Gremlich, 2006.). Apsorpcijska vrpca istezanja veze C = O je velikog intenziteta i nalazi se uvijek u području između 1800 i 1650 cm^{-1} . Za sve spojeve iz serije piridoksal-oksima položaj vrpce karbonilne skupine je također u skladu s literaturom (Günzler i Gremlich, 2006.). Položaji vrpce i asignacija koje potječu od vibracija C = N i C = C veza između atoma u piridinskom prstenu poklapaju se s literaturnim podacima (Günzler i Gremlich, 2006.).

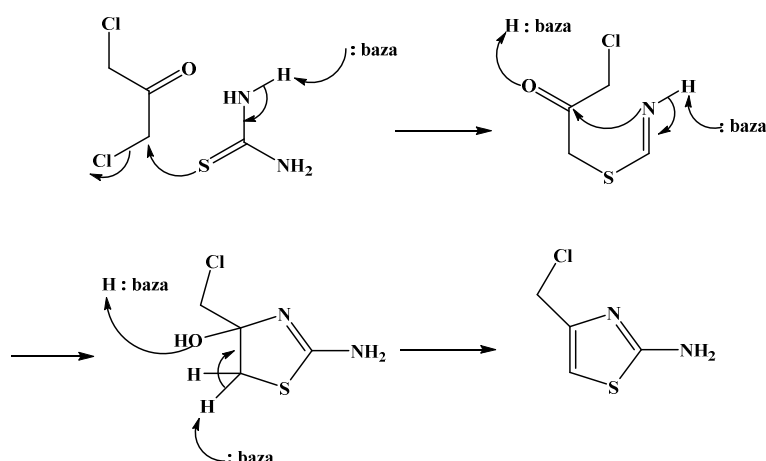
Strukture spojeva **2 - 10** su određene pomoću nuklearne magnetske rezonancije na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta sprega spin-spin između jezgara H-H. Spektri $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **2 - 10** pokazuju signale za protone na piridinskom prstenu te protone u supstituirajućim skupinama na piridinskom prstenu. Uočeni su signali protona za metilnu skupinu na položaju dva piridinskog prstena te široki signal za proton hidroksilne skupine na položaju tri piridinskog prstena. Spektri pokazuju signal široke vrpce za oksimsku hidroksilnu skupinu te signal za proton vezan za ugljik na kojem je vezana oksimska skupina. Uočeni su signali protona u hidroksimetilnoj skupini na položaju pet te proton na položaju šest piridinskog prstena. Svi spojevi te serije pokazuju signal za protone metilenske skupine vezane za dušikov atom piridinskog prstena te odgovarajuće protone fenilnog lanca u ovisnosti o vrsti supstituenta. Signale protona pokazuju i supstituenti (R = H, C_6H_5 , CH_3 , 4- OCH_3 i 2- OCH_3). Svi kemijski pomaci u $^1\text{H-NMR}$ spektrima su u skladu s literaturom (Bovey, 1969.). $^{13}\text{C-NMR}$ spektri pokazuju signale svih ugljikovih spojeva u piridinskom prstenu (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6), zatim signale za ugljikove atome u skupinama vezanim za piridinski prsten (CH_3 , HC=NOH , CH_2OH), za metilensku skupinu vezanu na dušikov atom te za ugljik karbonilne skupine. Signali protona prikazani su za sve ugljike fenilnog prstena kao i neke supstituente (R = C_6H_5 , CH_3 , OCH_3). Svi kemijski pomaci u $^{13}\text{C-NMR}$ spektrima odgovaraju podacima navedenim u literaturi (Bovey, 1969.).

5.4. Rentgenska strukturna analiza

Rentgenska strukturna analiza izvršena je radi potvrde strukture spoja 7, 1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida. Radi se o spoju koji do sada na taj način nije opisan u literaturi.

5.5. Kvaternizacija različitih derivata piridina

Osim na piridoksal-oksimu u ovom je radu pomoću MW zračenja izvedena kvaternizacija piridina, α -pikolina, piridin-4-aldoksima, piridin-2-aldoksima, nikotinamida i izonikotinamida različitim alkil-halogenidima: 2-brom-4'-nitroacetofenom, 2-amino-4-klormetiltiazol hidrokloridom, metil-jodidom, 1,3-dijodpropanom i 1,3-dibrompropanom (tablica 4.14.). Navedene reakcije provedene su pod utjecajem mikrovalnog zračenja u različitim otapalima (apsolutnom etanolu, acetonitrilu i acetonu), ovisno o topljivosti polaznih sirovina. Za sintezu spoja (**12**) nije bilo potrebno otapalo jer se tiazolni reaktant dobro otapao u α -pikolinu. Za mikrovalno je zračenje korištena različita snaga mikrovalne pećnice (250 W i 440 W), a bilo je potrebno različito vrijeme ozračivanja do nastajanja produkata (od 1 minute do 10 minuta). S ciljem pripreve spoja (**12**) 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijevog klorida bilo je potrebno prirediti polazni 2-amino-4-klormetiltiazol (**11**) Hantzchovom sintezom iz tiouree i dikloracetona (Kanapickaitė i sur., 2006.). Hantzchova je sinteza kondenzacija α -halogenkarbonilnog spoja s tioureom (shema 5.4.).

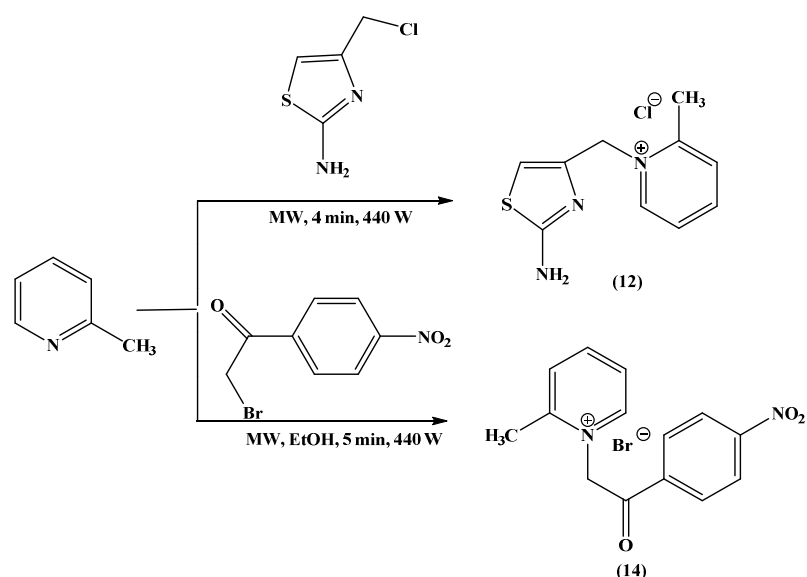


Shema 5.4. Mehanizam Hantzchove sinteze i priprava 2-amino-4-klormetiltiazola.

Uspješno je izvedena kvaternizacija α -pikolina 2-amino-4-klormetiltiazolom, pri čemu je dobiven spoj (**12**) u obliku smeđih kristala (23 %), dok kvaternizacija piridina, γ -pikolina i

piridoksal-oksima nije bila uspješna. Za pripravu 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijevog klorida (**12**) klasičnom je sintezom bilo potrebno 24 sata pri čemu je iskorištenje reakcije iznosilo 53 % (Kanapickaitė i sur., 2006.), dok je pod utjecajem mikrovalnog zračenja uočeno nastajanje produkta već nakon 4 minute pri 440 W, ali s prinosom od 23 % (shema 5.5.). Premda je prinos za spoj **12** u reakciji izvedenoj pod utjecajem mikrovalnog zračenja bio nizak (niži nego u klasičnoj metodi) zanimljivo je da je produkt dobiven u znatno kraćem reakcijskom vremenu u odnosu na klasične sinteze (Kanapickaitė i sur., 2006.).

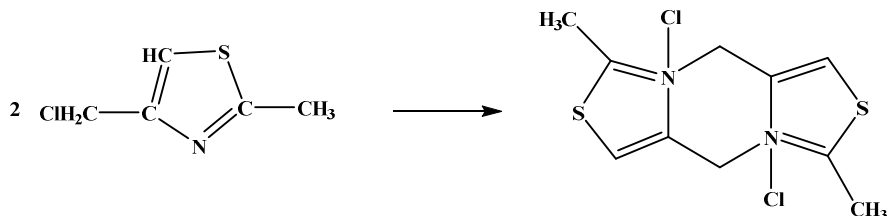
Pod utjecajem MW zračenja uspješno je izvršena i kvaternizacija α -pikolina 2-brom-4'-nitroacetofenom. Već nakon 5 minuta MW zračenja pri snazi od 440 W dobiven je spoj (**14**) u 25 %-tnom prinosu (shema 5.5.).



Shema 5.5. Priprava 1-[(2-aminotiazol-4-il)metil]-2-metilpiridinijeva klorida (**12**) i 2-metil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (**14**).

Reakcija tioacetamida i dikloroacetona nije dovela do nastanka produkta koji bi mogao kvaternizirati jer je vjerojatno došlo do stvaranja njegova polimernoga spoja (Hooper EF, Johnson, 1934.). Originalni je tiazol bezbojno ulje koje pri sobnoj temperaturi polimerizira u kristaliničan polimer, pri čemu se halogen premiješta sa ugljika na dušik. Ova se promjena

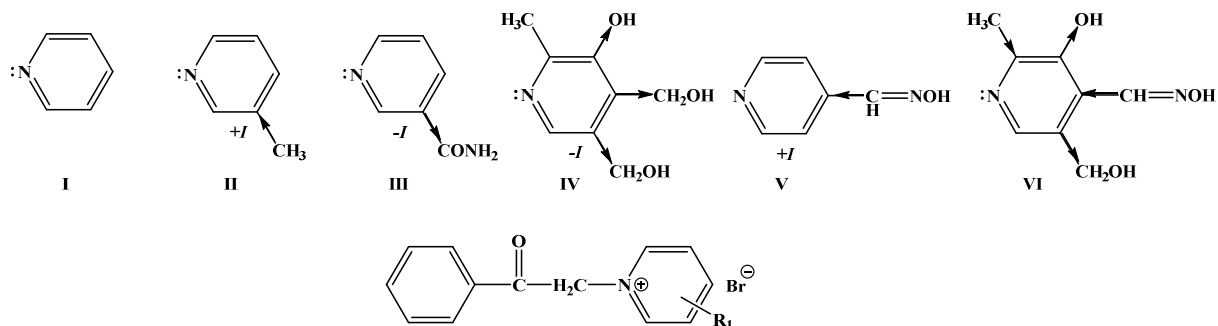
može ubrzati zagrijavanjem. Zbog bazičnosti tiazolne jezgre polimerizacija tiazola može dovesti do piperazinskog spoja (shema 5.6.).



Shema 5.6. Polimerizacija 4-klormetil-2-metiltiazola do piperazinskog derivata.

Kvaterne soli nastaju alkiliranjem amina koje se odvija prema S_N2 mehanizmu stoga prinos i brzina reakcije ovise o strukturi obaju reaktanata. U toj reakciji heterociklički amini djeluju kao nukleofili a njihova reaktivnost je ovisna o elektronskoj gustoći na dušikovu atomu.

U klasičnim sintezama (Zhuravlev i sur., 2010.) utvrđeno je da su elektrondonorski supstituenti povoljno utjecali na kvaternizaciju dušikova atoma, dok je kod elektronakceptorskih supstituenata prinos kvaternog spoja bio niži. U sintezama pod utjecajem mikrovalnog zračenja te razlike nisu uočene (tablica 5.1.). Utjecaj indukcijskog efekta na nukleofile u reakciji kvaternizacije prikazan je na shemi 5.7.

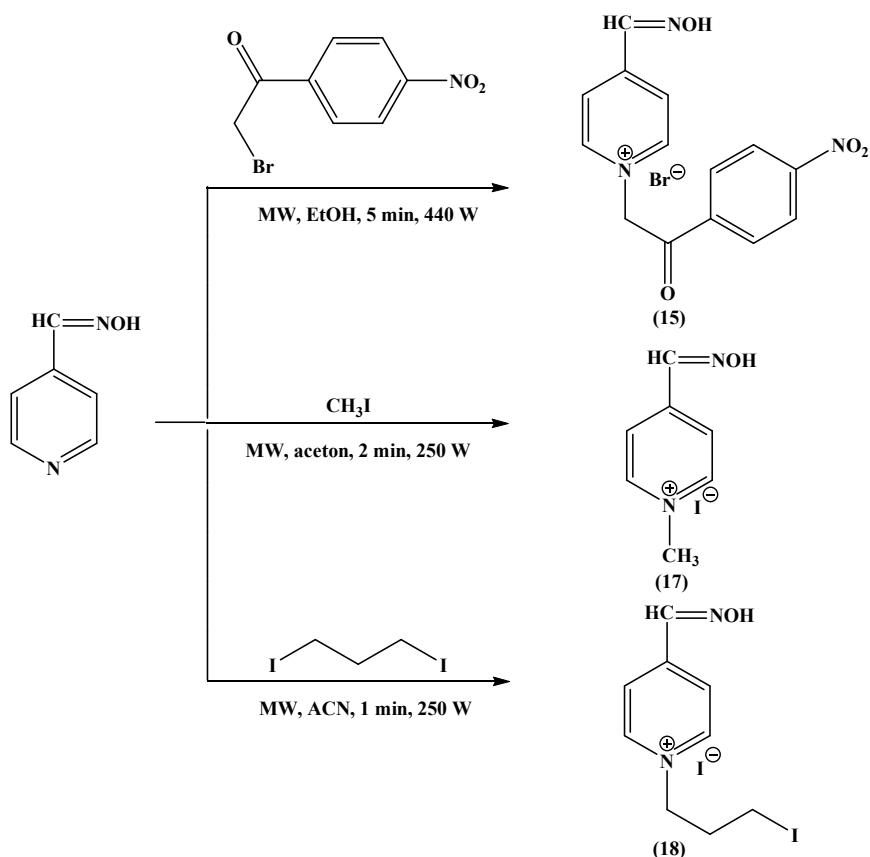


Shema 5.7. Utjecaj indukcijskog efekta na nukleofile u reakciji kvaternizacije.

Tablica 5.1. Prinosi u reakciji kvaternizacije pomoću različitih nukleofilnih reagenasa i 2-brom-4'-nitroacetofenona.

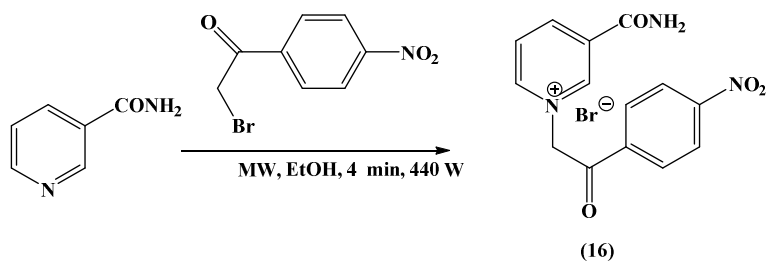
Nukleofili	Prinos (%) (Zhuravlev i sur., 2010.)	Prinos (%) Vlastita istraživanja MW zračenjem
Piridin	89	26
α - Pikolin	96	25
Nikotinamid	44	44
Piridoksin	40	-
Piridin-4-aldoksim	-	30
Piridoksal-oksim	-	80

Izvedena je također reakcija kvaternizacije sa nukleofilnim piridin-4-aldoksimom pomoću tri različita elektrofila pod utjecajem mikrovalnog zračenja (shema 5.8.). Pomoću elektrofilnog 2-brom-4'-nitroacetofenona u etanolu kao otapalu dobiven je 4-hidroksiiminometil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid (**15**) u prinosu od 30 %. Etanol je korišten kao otapalo budući da su oba polazna reaktanta dobro topljiva u njemu. Kvaternizacijom piridin-4-aldoksima metil-jodidom dobiven je spoj (**17**) odnosno 4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijev jodid u prinosu od 93 % nakon samo 2 minute mikrovalnog zračenja pri snazi od 250 W u acetonu. Klasičnom se metodom alkiliranje na piridinskim spojevima postiže u reakciji s elektrofilnim alkil-halogenidima. Općenita metoda pripreme kvaternih piridinijevih spojeva obuhvaća djelovanje alkil-halogenida na bazični piridin (tzv. Menshutkin-ova reakcija). Piridin je nukleofil koji zamjenjuje halogenidni ion u molekuli alkil-halogenida. Utvrđeno je kako polarna otapala djeluju povoljno na reakciju kvaternizacije budući da solvativiraju halogenidni ion (Weissberger, 1961.). Reakcijom piridin-4-aldoksima i dijodpropana dobiven je 4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijev jodid (**18**) u 78 %-tnom prinosu za samo jednu minutu mikrovalnog zračenja pri snazi od 250 W u acetonitrilu. Acetonitril je odabran kao otapalo budući da su polazni materijali dobro topljivi u njemu dok je produkt netopljiv pa odmah kristalizira. U reakcijskoj je smjesi dobiven još jedan produkt koji nije identificiran. Pretpostavlja se da je došlo do vezanja dviju molekula piridin-4-aldoksima na dijodpropan te da je nastao biskvaterni derivat.



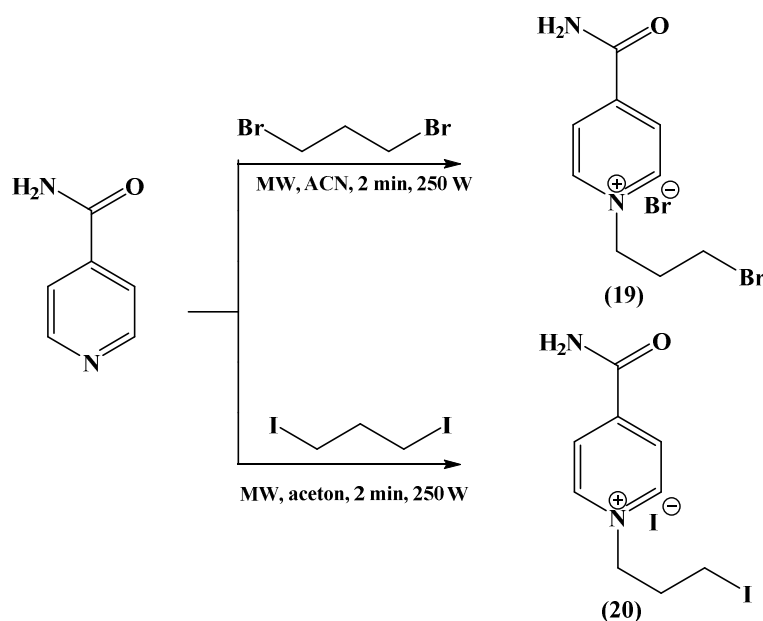
Shema 5.8. Priprava 4-hidroksiiminometil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (15), 4-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (17) i 4-hidroksiiminometil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (18).

Nadalje, izvedena je kvaternizacija nikotinamida elektrofilnim 2-brom-4'-nitroacetofenonom pod utjecajem MW zračenja u etanolu pri čemu je u trajanju od 4 minute dobiven prinos od 44 % (shema 5.9.).



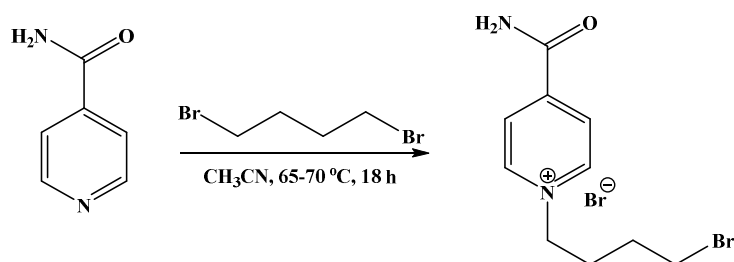
Shema 5.9. Priprava 3-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida (16).

Osim na nikotinamidu izvedena je i kvaternizacija pod utjecajem MW zračenja na izonikotinamidu pomoću dvaju elektrofila: dibromopropana i dijodopropana pri čemu su dobiveni produkti (19) i (20) u 63 %-tnom i 49 %-tnom prinosu pri snazi od 250 W (shema 5.10).



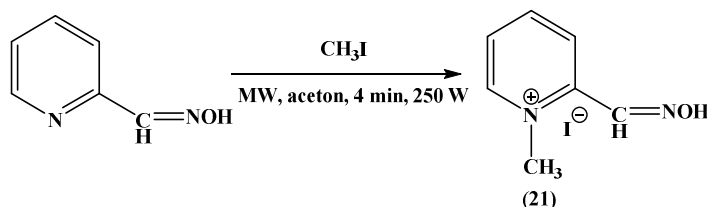
Shema 5.10. Priprava 1-(3-bromopropil)-4-karbamoilpiridinijeva bromida (19) i 4-karbamoil-1-(3-jodpropil)piridinijeva jodida (20).

Kuča i suradnici, 2003. su izvršili sličnu sintezu na izonikotinamidu klasičnim putem. Izonikotinamid su kvaternizirali 1,4-dibrombutanom u acetonitrilu pri čemu su nakon 18 sati pri temperaturi 65 do 70 °C dobili produkt s 96 %-tnim prinosom (shema 5.11.).



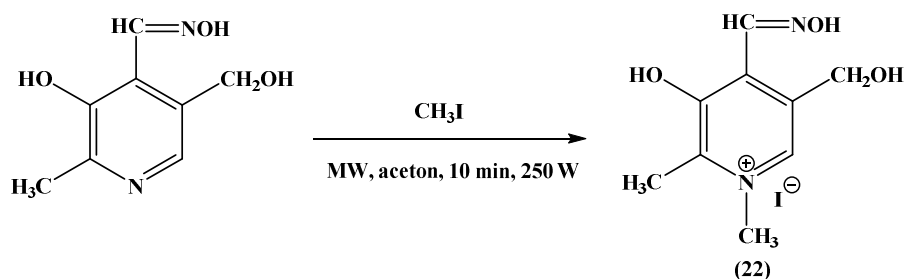
Shema 5.11. Kvaternizacija izonikotinamida dibromopropanom (Kuča i sur., 2003.).

Musilek i suradnici, 2006. sintetizirali su potencijalne reaktivatore AChE od kojih je jedan (2-hidroksiiminometil-1-metil-piridinijev jodid) kemijski sličan komercijalnom 2-hidroksiiminometil-1-piridinijevom kloridu (2-PAM-u). Postupak sinteze klasičnim putem obuhvaćao je refluksiranje u acetonu oko 4 sata pri 60 °C, pri čemu je dobiveno 69 %-tno iskorištenje produkta. U ovom je istraživanju isti spoj 2-hidroksiiminometil-1-metil-piridinijev jodid (**21**) dobiven na jednostavniji način uz kraće reakcijsko vrijeme (4 minute) pri mikrovalnoj snazi od 250 W i uz veće iskorištenje od 94 % (shema 5.12.). Talište dobivenog spoja iznosilo je 225-227 °C što je u skladu s literaturnim podatkom od 224-225 °C (Ginsberg i sur., 1957.).



Shema 5.12. Priprava 2-hidroksiiminometil-1-metilpiridinijeva jodida (**21**).

Uspješno je izvršena također i kvaternizacija piridoksal-oksima metil-jodidom pri čemu je nastao 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijev jodid (**22**) u 79 %-tnom prinosu nakon 10 minuta MW zračenja pri snazi od 250 W. Reakcija je rađena u acetonu budući da su polazne supstancije topljive u acetonu a produkt nije pa je nastankom odmah kristalizirao (shema 5.13.).



Shema 5.13. Priprava 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinijeva jodida (**22**).

Nakon izolacije i pročišćavanja sirovih produkata, dobiveni su kromatografski čisti derivati piridina **12** - **22** kojima su snimljeni (IR, ^1H i ^{13}C NMR spektri) (tablice 4.15. – 4.25.).

U IR spektrima položaji vrpce i asignacija koje potječu od vibracija istežanja oksimske hidroksilne skupine (-OH) u spojevima (**15**), (**17**), (**18**), (**21**) i (**22**) u skladu su s literaturnim podacima. Intenzivna vrpca za NH_2 skupinu u spojevima (**16**), (**19**) i (**20**) pokazuje frekvenciju istežanja N - H skupine u području $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ što je također u skladu s literaturnim podacima (Günzler i Gremlich, 2006.).

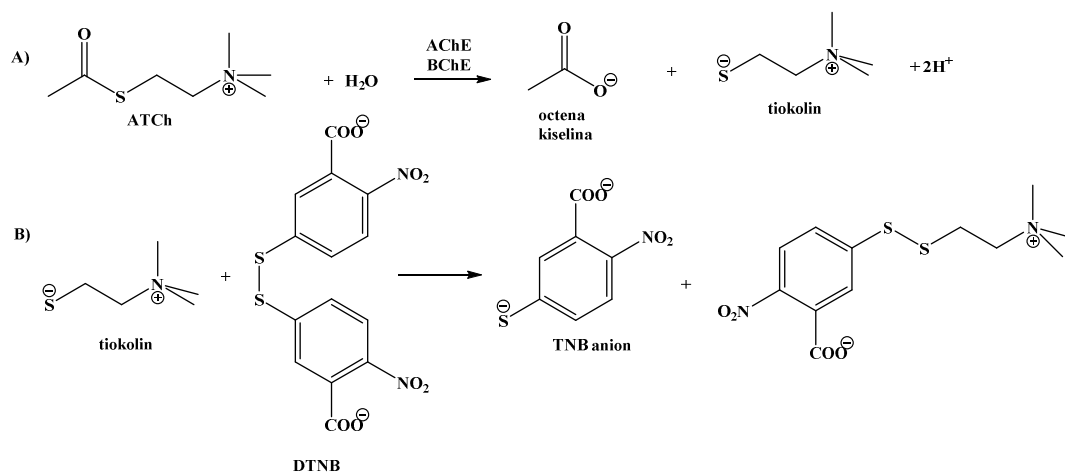
Nitro skupina se prema literaturi pojavljuje u dvije intenzivne vrpce: antisimetričnog (1550 cm^{-1}) i simetričnog (1360 cm^{-1}) istežanja. U spojevima (**13**), (**14**), (**15**), (**16**) došlo je do malog pomaka valne duljine. U spojevima (**13**) i (**14**) vrpce se pojavljuju pri višim valnim duljinama 1558 cm^{-1} . Spoj (**13**) ima vezan piridinijev prsten na *p*-nitrofenacilnu jedinicu dok spoj **14** ima vezan α -pikolin na *p*-nitrofenacilnu jedinicu. Spojevi (**15**) i (**16**) pokazali su nešto nižu valnu duljinu 1467 i 1521 cm^{-1} . U spoju (**15**) na *p*-nitrofenacilnu jedinicu je vezan piridin-4-aldoksim dok je u spoju (**16**) vezan nikotinamid.

Karbonilna skupina u aromatskim karbonilnim spojevima pokazuje intenzivnu vrpcu oko 1700 cm^{-1} . Aromatski prsten ovdje djeluje u pravilu kao elektrondonor i uzrokuje pomak $\nu(\text{C} = \text{O})$ prema većim valnim duljinama. Položaji vrpce karbonilne skupine u svim je derivatima u skladu s literaturnim podacima (Günzler i Gremlich, 2006.).

Svi ^1H -NMR i ^{13}C -NMR podatci za pripravljene derivate piridina su u skladu s literaturom (Bovey, 1969.).

5.6. Reaktivacija enzima sintetiziranim derivatima piridoksal-oksima

Enzimsku aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze prema supstratu acetiltiokolinu (ATCh) u odsutnosti i u prisutnosti inhibitora mjerena je spektrometrijskom metodom po Ellmanu koristeći 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevu kiselinu (DTNB-u) kao tiolni reagens. Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolin koji reagira sa DTNB-om pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻ anion), a porast apsorbancije aniona prati se pri valnoj duljini $\lambda = 412 \text{ nm}$ (shema 5.14.).



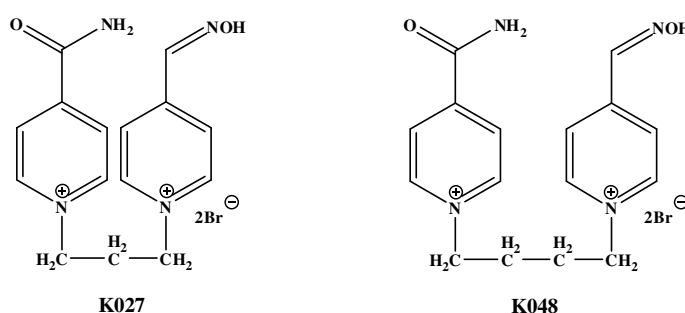
Shema 5.14. Ellmanova metoda: A) enzimskom hidrolizom acetiltiokolina oslobađa se tiokolin, B) oslobođeni tiokolin reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuti anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻).

Budući da piridoksal-oksime sadrži sve elemente „dobrog“ reaktivatora inhibiranih enzima ispitana su reaktivatorska svojstva cijele serije sintetiziranih derivata piridoksal-oksima. Piridoksal-oksime sadrži kvaterni dušikov atom u piridinijevom prstenu koji je odgovoran za povećanje afiniteta vezanja na aktivnu stranu ždrijela AChE i BChE. Povoljna je orijentacija u aktivnoj strani ždrijela sa oksimskom skupinom usmjerenom prema fosfiliranom katalitičkom serinu jedan od najvažnijih čimbenika za djelotvornost oksima u reaktivaciji (Wong i sur, 2000.; Kovarik i sur, 2004.; Worek, 2004.). Piridoksal-oksime također posjeduje oksimsku skupinu u položaju četiri neophodnu za reaktivacijsko djelovanje, što

osigurava bolji afinitet i povoljniju orijentaciju u katalitičkom mjestu enzima. Uzevši u obzir sva ova antidotska obilježja očekivalo se da će novosintetizirani spojevi piridoksal-oksima pokazati učinkovitu reaktivaciju enzima inhibiranih nekim od živčanih bojnih otrova. Budući da je riječ o derivatima vitamina B6, pretpostavlja se da sintetizirani spojevi imaju vrlo nisku toksičnost te se kao takvi mogu rabiti u profilaksi pri trovanju organofosforinim spojevima.

U ovom je radu ispitano devet strukturno sličnih oksima na reaktivaciju acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze inhibiranih živčanim bojnim otrovima tabunom i VX-om te pesticidom paraoksonom. Niti jedan od pripremljenih reaktivatora nije mogao reaktivirati AChE i BChE inhibiranu svim ispitanim OP-spojevima. Utvrđena je ipak različita moć reaktivacije prema svakom pojedinom OP-spoju. Pripremljeni spojevi **2 - 10** pokazali su značajnu reaktivacijsku sposobnost kod trovanja VX-om (tablice 4.26. i 4.29.). Najveću sposobnost reaktivacije AChE inhibirane VX-om pokazao je spoj (**9**) i to 85 % dok su najnižu sposobnost pokazali spojevi (**6**) i (**10**) i to 40 %. Konstante brzine reaktivacije AChE (k_{obs}) inhibirane VX-om iznosile su od $0,0003 \text{ min}^{-1}$ za spoj (**3**) do $0,001 \text{ min}^{-1}$ za spojeve (**9**) i (**10**).

Kuča i suradnici, 2005. su ispitali kinetiku reaktivacije kvaternih piridinijevih aldoksima na AChE inhibiranu VX-om. Utvrđeno je da je pri koncentraciji 10^{-3} M obidoksima utvrđena reaktivacija od 75 % za AChE inhibiranu VX-om, dok je za pripravljene spojeve K027 i K048 maksimalna reaktivacija pri istoj koncentraciji iznosila 70 i 71 % (shema 5.15.).



Shema 5.15. Strukture ispitanih oksima na AChE inhibiranu VX-om (Kuča i sur., 2005.).

Budući da su vrijednosti maksimalne reaktivacije pripremljenih spojeva u ovom radu iznosile od 40 % za spojeve (**6**) i (**10**) do 85 % za spoj (**9**) može se potvrditi kako su te

vrijednosti monokvaternih piridinijevih spojeva slične vrijednostima biskvaternih sintetiziranih spojeva (Kuča i sur., 2005.).

Pripravljene spojevi **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** i **10** imaju ograničenu ili slabu reaktivacijsku sposobnost kod trovanja tabunom. Sposobnost pripremljenih spojeva da reaktiviraju AChE inhibiranu tabunom iznosi najviše 15 % za spojeve (**2**) i (**4**) te < 10 % za sve ostale ispitane spojeve (tablica 4.27.). Reaktivacija *in vitro* treba prelaziti 10 % da bi spoj bio značajan reaktivator te da bi se nastavila daljnja ispitivanja (Musilek i sur., 2008.). Budući da je reaktivacija AChE inhibirane tabunom iznosila manje od 15 % konstante reaktivacije (k_{obs}) nisu određene.

Ispitivanja Milatovića i suradnika, 1989. pokazala su da spojevi koji u svojoj strukturi imaju jedinicu piridoksal-oksima također pokazuju slab reaktivacijski potencijal kod trovanja tabunom. Kovarik i suradnici, 2008. su pokazali da za učinkovitu reaktivaciju AChE tabunom oksimska skupina mora biti usmjerena u *para* položaj u piridinskom prstenu, a poveznica između dvaju prstena bi morala sadržavati tri ili četiri ugljikova atoma. Istražene su također *in vitro* reakcije aldoksima kao reaktivatora ljudske eritrocitne AChE inhibirane tabunom, pri čemu su povezane molekulske karakteristike jedanaest aldoksima s njihovim brzinama reaktivacije. Uočeno je da je učinkovita reaktivacija inhibirane AChE postignuta sa savitljivim bispiridinijevim *para*-aldoksimima koji imaju propilensku ili butilensku poveznicu. Iako piridinijevi ili imidazolijevi aldoksimi s oksimskom skupinom u *ortho*-položaju nisu učinkovito reaktivirali fosforiliranu AChE, oni su je štitili od fosforilacije tabunom zbog njihovog visokog afiniteta vezanja za nativnu AChE (Kuča i sur., 2003.; Kuča i sur., 2005.; Maksimović i sur., 1980.).

Od spojeva pripremljenih u ovom radu, najveću sposobnost reaktivacije acetilkolinesteraze inhibirane paraoksonom (75 %) prikazao je spoj (**10**) (tablica 4.28.). Sposobnost reaktivacije komercijalno upotrebljivanih oksima iznosi za pralidoksim 42 %; HI-6 35 %, obidoksim 76 %, trimedoksim 46 % pri koncentracijama 10^{-4} dok su spojevi sintetizirani u okviru ove disertacije slabo reaktivirali AChE pri koncentraciji 10^{-3} , dakle znatno su slabiji reaktivatori od konvencionalnih oksima u trovanju OP-spojevima.

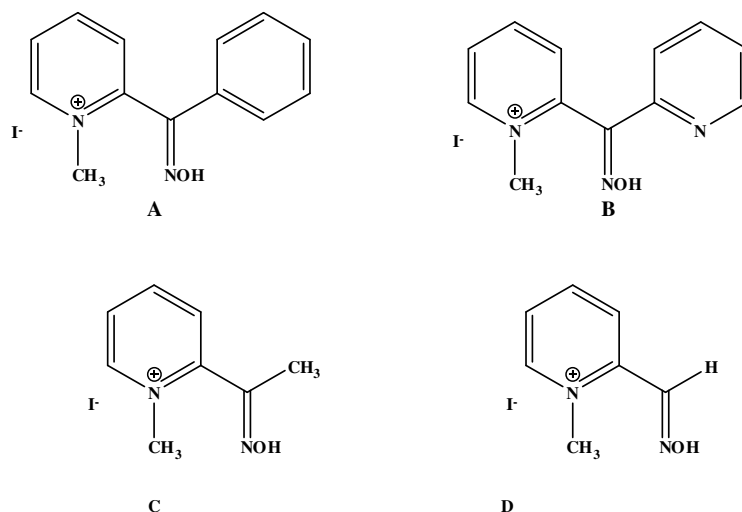
Konstante brzine reaktivacije AChE (k_{obs}) inhibirane paraoksonom iznosile su od $0,0006 \text{ min}^{-1}$ za spoj (**2**) 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-1-(4'-klorfenacil)-2-metilpiridinijev bromid do $0,0013 \text{ min}^{-1}$ za spoj (**4**) i za spoj (**10**) odnosno 3-hidroksi-4-

hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(2'-metoksifenacil) piridinijev bromid koji je ujedno pokazao i najbolju reaktivaciju.

Oksimima potpomognuta reaktivacija BChE inhibirane VX-om prikazana je u tablici 4.29. Potpunu reaktivaciju (100 %) BChE inhibirane VX-om pokazao je spoj **(9)** 1-(4'-fenilfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev bromid, dok su spojevi **(4)**, **(8)** i **(10)** pokazali 95 %-tnu reaktivaciju prema istom inhibiranom enzimu što znači da bi se mogli uzeti u razmatranje za terapiju pri trovanju BChE VX-om.

Oksimima potpomognuta reaktivacija BChE inhibirane tabunom prikazana je u tablici 4.30. Svi sintetizirani oksimi pokazali su slabu sposobnost reaktivacije BChE inhibirane tabunom (reaktivacija < 10 %). Budući da su reaktivacije bile jako niske nisu se mogle odrediti konstante brzina reaktivacije BChE (k_{obs}).

Kuča i suradnici, 2005. su ispitali također reaktivacijska svojstva 4 pripremljena oksima na AChE inhibiranu VX-om (shema 5.16.).



Shema 5.16. Strukture ispitanih oksima (Kuča i sur., 2005.)

Ti reaktivatori su bili u mogućnosti reaktivirati AChE inhibiranu VX-om, međutim piridin-2-aldoksim-*N*-metil klorid (2-PAM) je ipak bio najbolji reaktivator.

U tablici 4.31. prikazana je reaktivacija BChE inhibirane pesticidom paraoksonom. Spoj **(9)** pokazao je najveću sposobnost reaktivacije (80 %) dok su drugi spojevi pokazali umjerenu reaktivaciju BChE inhibirane paraoksonom.

Pri 1 mM koncentraciji svih devet sintetiziranih analoga piridoksal-oksima brže je reaktiviralo BChE inhibiranu VX-om nego AChE inhibiranu VX-om. [$k_{\text{obs}}(\text{BChE}) > k_{\text{obs}}(\text{AChE})$]. Spojevi (5), (6), (7) i (8) brži su reaktivatori BChE inhibirane paraoksonom nego AChE inhibirane paraoksonom.

Razvoj novih reaktivatora nije važan samo za antidote odnosno protuotrove za živčane bojne otrove već i za tretiranje trovanja pesticidima. Reaktivacija AChE inhibirane paraoksonom bila je brža od reaktivacije AChE inhibirane VX-om dok je kod butirilkolinesteraze bilo obrnuto (reaktivacija je bila brža kod BChE inhibirane VX-om, a sporija kod BChE inhibirane paraoksonom). Pesticid paraokson odabran je za ovo ispitivanje jer posjeduje strukturnu sličnost sa živčanim bojnim otrovima. Za razliku od insekticida parationa koji je relativno netoksičan zbog dvostruke veze između atoma fosfora i sumpora u usporedbi sa živčanim bojnim otrovima, paraokson sadržava dvostruku vezu između atoma fosfora i kisika što ga čini letalnim spojem.

Razlike u reaktivaciji AChE i BChE posljedica su međusobnih razlika u građi aktivnog mjesta enzima odnosno razlika u aminokiselinama koje tvore aktivna mjesta ova dva enzima. AChE ima za 200 Å manje aktivno mjesto od BChE (Saxena i sur, 1999) budući da se kod BChE umjesto aromatskih aminokiselina AChE nalaze alifatske aminokiseline. Aromatske aminokiseline AChE, tirozin 72, tirozin 124, triptofan 286, fenilalanin 295, fenilalanin 297 i tirozin 337 zamjenjuju odgovarajuće alifatske aminokiseline u strukturi ljudske BChE: asparagin 68, glutamin 119, alanin 277, leucin 286, valin 288 i alanin 328. Stoga se može zaključiti da je mogućnost reaktivacije posljedica steričkih razlika u veličini aktivnih mjesta ovih enzima.

5.7. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima

Oksimi su također toksični spojevi. Oni se vežu za AChE kao reverzibilni inhibitori i stvaraju komplekse s AChE u aktivnom centru ili na alosteričkoj strani enzima. Reverzibilni inhibitori, poput oksima, dodatno štite slobodnu AChE od fosfiliranja. Ako se reverzibilni inhibitor veže na aktivnu stranu enzima zaštita se zasniva na izravnoj kompeticiji između OP spoja i reverzibilnog inhibitora. Ukoliko se inhibitor veže za alosteričku stranu, opet se neizravno štiti aktivna strana enzima (Reiner, 2001.).

Reverzibilna inhibicija nativnih kolinesteraza oksimima određena je praćenjem promjene brzine enzimске hidrolize supstrata ATCh u prisutnosti serije kvaternih soli piridoksal-oksima. Disocijacijske konstante za reverzibilni kompleks enzima i oksima u aktivnom mjestu (K_i) određene su kao funkcije koncentracije (0,05 - 0,5 mM) acetiltiokolina, supstrata tih enzima. Koncentracije acetiltiokolina koje pripadaju navedenom rasponu bile su 0,05; 0,2; 0,35 i 0,5 mM. Koncentracijski raspon oksima za inhibiciju odabran je tako da pri svakoj korištenoj koncentraciji supstrata inhibicija kolinesteraze bude u rasponu od 20 % do 80 % budući da se pri nižim koncentracijama supstrata oksim natječe sa supstratom u vezanju za aktivno mjesto što rezultira inhibicijom enzima dok se pri višim koncentracijama supstrata manje oksima natječe sa supstratom za aktivno mjesto enzima pa postaje izraženiji učinak vezanja oksima na alosteričko mjesto enzima čime se isti aktivira. Za svaku koncentraciju supstrata izmjerena je aktivnost enzima uz barem tri koncentracije oksima. Reverzibilna inhibicija AChE i BChE oksimima mjerena je pri rasponu koncentracija ATCh od 0,05 - 0,50 mM. Njihove su disocijacijske konstante dane u tablicama 4.32. i 4.33. Disocijacijska konstanta K_i iznosila je najmanje $8 \pm 3 \mu\text{M}$ za spoj 1-(4'-bromfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev bromid (**3**) pri koncentraciji 17 - 167 μM što znači da je taj oksimski spoj pokazao najveći afinitet vezanja za katalitičku stranu BChE dok je najveći afinitet za vezanje na katalitičku stranu AChE pokazao također spoj 1-(4'-bromfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev bromid (**3**) čija je K_i iznosila 42 ± 5 pri koncentraciji od 83 - 125 μM . Disocijacijska konstanta za AChE iznosila je najviše $436 \pm 85 \mu\text{M}$ za 1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev bromid, spoj (**7**), pri koncentraciji 100 - 300 μM , što znači da je taj oksim pokazao najmanji afinitet za AChE. Za BChE K_i je iznosila $469 \pm 121 \mu\text{M}$ za 3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metil-1-(4'-metoksifenacil) piridinijev

bromid, spoj (8), pri koncentraciji 100 - 300 μM te je taj spoj pokazao najmanji afinitet prema BChE.

Čalić i suradnici, 2006. odredili su disocijacijske konstante enzim-oksim kompleksa K_i za pet bispiridinijevih oksima te za dva konvencionalana antidota TMB-4 i HI-6. Za TMB-4 pri koncentraciji od 100 do 700 μM K_i je iznosila 180 μM dok je za HI-6 pri koncentraciji 50 do 400 μM iznosila 31 μM . Ispitane K_i konstante spojeva sintetiziranih u okviru ove disertacije bile su slične konstantama drugih monopiridinijevih spojeva kao npr. 2-PAM-a (Simeon i sur., 1981.), a slične su bile i konstantama nekih bispiridinijevih spojeva (Pang i sur., 2003., Škrinjarić-Špoljar i sur., 1988.) pa je potvrđeno da drugi piridinski prsten ne utječe na stabilizaciju veze enzim-oksim, kako je očekivano. Vezujući afiniteti ispitanih oksima nisu bili u korelaciji sa učinkovitošću reaktivacije. Iz konstanti disocijacije K_i pokazano je kako svi ispitani oksimi reverzibilno inhibiraju AChE i BChE, a time štite enzime od fosfilacije katalitičkog serina organofosforinim spojevima. Stoga ovi oksimi mogu biti zanimljivi u profilaksi zbog svog afiniteta prema enzimima AChE i BChE.

5.8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih spojeva

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih spojeva korištene su dvije Gram-pozitivne (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) i dvije Gram-negativne bakterije (*Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas syringae*). Rezultati pokazuju vrlo slab učinak ispitivanih tvari na Gram-pozitivne bakterije te ograničen učinak na Gram-negativne bakterije (tablica 4.34. i tablica 4.35.). Najniža MIK za Gram-pozitivne bakterije iznosila je 2500 ppm za spojeve (2) i (4) prema bakteriji *Enterococcus faecalis* te za spojeve (2), (3), (6) i (7) za bakteriju *Staphylococcus aureus*. Utvrđeno je da pripremljeni spojevi ne posjeduju baktericidno djelovanje na ispitane Gram-pozitivne bakterije.

Pripremljeni su spojevi pokazali vrlo slabu učinkovitost na bakteriju *Salmonella enteritidis*. Naj snažniju antimikrobnu aktivnost na Gram-negativnu bakteriju *Salmonella enteritidis* pokazao je spoj 6 iz serije kvaternih soli piridoksal-oksima i supstituiranih fenacilbromida. Njegova je MIK iznosila 2500 ppm, za razliku od ostalih spojeva koji su pokazali MIK od 5000 ppm za istu bakteriju. Niti jedan od pripremljenih spojeva iz te serije nije pokazivao baktericidnu aktivnost prema toj bakteriji. U ovom je istraživanju jedino spoj (13) (1-(2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid) pokazao MBK 2500 ppm i najnižu MIK od 625 ppm, što znači da bi se mogao primjenjivati za suzbijanje bakterijskoga rasta.

Najveću osjetljivost na spojeve pripremljene iz piridoksal-oksima pokazala je bakterija *Pseudomonas syringae*. Najmanju MIK za tu bakteriju pokazali su spojevi (6) i (10) pri čemu je ona iznosila 1250 ppm, dok su najmanju MBK od 2500 ppm pokazali spojevi (2), (4), (5) i (10). Uočena je veća osjetljivost prema istoj bakteriji i kod drugih kvaternih soli, derivata piridina, pri čemu je najniža MBK za spojeve (13) i (16) iznosila 625 ppm, dok je najniža MIK utvrđena za spojeve (13), (14) i (16) iznosila 625 ppm.

Uvidom u sve MIK i MBK utvrđeno je da kvaterni piridinijevi soli pokazuju vrlo slabu antimikrobnu aktivnost te se kao takve ne mogu uporabiti za dodatnu antimikrobnu zaštitu, osim spoja 1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijeva bromida, spoja 13, koji bi mogao biti primjenjiv.

6. ZAKLJUČCI

Oksidacijom piridoksina pripremljen je piridoksal-oksime (1). Kvaternizacijom piridoksal-oksima s fenacil-bromidima supstituiranim u položaju 4' (R = Cl, Br, H, CH₃, NO₂, F, OCH₃, C₆H₅) i 2' (R = OCH₃) pripravljene su kvaternarne soli **2** - **10** pod utjecajem MW zračenja pomoću dviju metoda:

1. djelovanjem MW zračenja u acetonu kao otapalu
2. djelovanjem MW zračenja bez otapala (suhi postupak)

Strukture pripremljenih spojeva potvrđene su spektroskopskim metodama. Rentgenskom strukturnom analizom jednog predstavnika te serije spojeva 1-(4'-fluorfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijeva bromida (**7**), dodatno je potvrđena njihova struktura.

Objektive korištene metode pod utjecajem mikrovalova imaju nekoliko prednosti pred konvencionalnom odnosno klasičnom metodom, a to su: kraće reakcijsko vrijeme, veći prinos te ušteda na energiji.

Kod sinteze u otapalu (acetonu), uz mikrovalno zračenje, postsintetički je postupak puno jednostavniji nego kod iste sinteze bez otapala gdje je postsintetički postupak bio nešto duži i kompliciraniji.

Derivati piridoksal-oksima sintetizirani su i mehanosintezom pri čemu je korišten LAG postupak odnosno postupak uz minimalnu količinu otapala koji je u skladu s principima zelene kemije. Osim minimalne količine potrebnih otapala, prednost ove metode je u većem prinosu od onoga u klasičnim postupcima. Nedostatak ove metode je također u postsintetičkoj obradi koja je znatno kompliciranija i dugotrajnija od klasične metode.

U ovom je radu uspješno izvedena kvaternizacija piridina, α -pikolina, piridin-4-aldoksima, piridin-2-aldoksima, nikotinamida i izonikotinamida pod utjecajem mikrovalnog zračenja pomoću različitih elektrofila: 2-brom-4'-nitroacetofenona, 2-amino-4-klormetiltiazol hidroklorida, metil-jodida, 1,3-dijodpropana i 1,3-dibrompropana. Prednost sinteze uz uporabu mikrovalnog zračenja je u skraćanju reakcijskog vremena te u nekim slučajevima, i u znatno većem iskorištenju (spojevi **17**, **21** i **22**).

Dakle, dokazano je da se kvaternizirani derivati piridina mogu uspješno pripremiti pomoću novih ekološki prihvatljivih metoda koje za ovu vrstu spojeva još do sada nisu bile primjenjivane.

Sintetizirani spojevi piridoksal-oksima ispitani su kao reaktivatori ljudske eritrocitne acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze inhibirane bojnim otrovima VX-om i tabunom te pesticidom paraoksonom.

Derivati piridoksal-oksima nisu učinkovito reaktivirali AChE inhibiranu živčanim bojnim otrovom tabunom (reaktivacija manja od 15 %).

Reaktivacija pripremljenih oksimskih spojeva bila je podjednaka za živčani bojni otrov VX (od 40 do 85 %) te pesticid paraokson (40 – 75 %). Oksimi su također bili neučinkoviti kod BChE inhibirane živčanim bojnim otrovom tabunom (reaktivacija manja od 10 %).

Derivati piridoksal-oksima pokazali su se znatno učinkovitijim reaktivatorima BChE inhibirane VX-om, (reaktivacija 40 – 100 %) te BChE inhibirane paraoksonom (reaktivacija 20 – 80 %).

Iako derivati piridoksal-oksima nisu učinkovito reaktivirali fosforilirane AChE i BChE oni su ih ipak štitili od fosfilacije živčanim bojnim otrovima zbog visokog afiniteta vezanja za nativne kolinesteraze. Spoj **(3)**, 1-(4'-bromfenacil)-3-hidroksi-4-hidroksiiminometil-5-hidroksimetil-2-metilpiridinijev bromid, pokazao je najveći afinitet vezanja i za AChE (K_i je iznosila $42 \pm 5 \mu\text{M}$ pri koncentraciji od 83 do 125 μM) i za BChE (K_i je iznosila $8 \pm 3 \mu\text{M}$ pri koncentraciji od 17 do 167 μM). Može se zaključiti da bi se spojevi **2 - 10** mogli komercijalno koristiti kao reaktivatori BChE inhibirane živčanim otrovom VX-om nakon što se ispita njihova toksičnost.

Ispitana je antibakterijska aktivnost nekih pripremljenih spojeva 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 i 16. Određene su minimalna baktericidna i minimalna inhibitorna koncentracija. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da spojevi imaju slabu antimikrobnu aktivnost. Baktericidnu je aktivnost za sve ispitane bakterije pokazao jedino 1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid, spoj **13**, dakle nakon određivanja njegove toksičnosti mogao bi se primjenjivati kao baktericid.

7. LITERATURA

1. Agner G, Kaulinb YA, Gurnev PA, Szaboa Z, Schagina LV, Takemotoc JY, Blasko K. Membrane-permeabilizing activities of cyclic lipodepsipeptides, syringopeptin 22A and syringomycin E from *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* in human red blood cells and in bilayer lipid membranes. *Bioelectrochem* (2000) 52: 161–167.
2. Alptüzün V, Taşli H, Erciyas E. Synthesis and antimicrobial activities of some pyridinium salts. *J Fac Pharm Ankara* (2006) 35(3): 177–188.
3. Anastas PT, Warner JC, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, (1998) str 30.
4. Antonijević B, Stojiljković MP. Unequal Efficacy of Pyridinium Oximes in Acute Organophosphate Poisoning. *Clin Med Res* (2007) 5(1): 71-82.
5. Aupoix A, Pégot B, Vo-Thanh G. Synthesis of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids and application of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as pre-catalysts for the benzoin condensation using solvent-free and microwave activation. *Tetrahedron* (2010) 66: 1352–1356.
6. Axelsen PH, Harel M, Silman I, Sussman JL. Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: Synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography. *Protein Sci* (1994) 3: 188-197.
7. Bendale AR, Bhatt R, Nagar A, Jadhav AG, Vidyasagar G. Schiff base synthesis by unconventional route: An innovative green approach. *Der Pharma Chemica* (2011) 3(2): 34-38.
8. Beyer MK, Clausen-Schaumann H. Mechanochemistry: The mechanical activation of covalent bonds. *Chem Rev* (2005) 105(8): 2921-2948.
9. Bharatea SB, Thompsona CM. Antimicrobial, antimalarial and antileishmanial activities of mono- and bisquaternary pyridinium compounds. *Chem Biol Drug Des* (2010) 76(6): 546-551.
10. Bosak A. Organofosforni spojevi: klasifikacija i reakcije s enzimima. *Arh Hig Rada Toksikol* (2006) 57: 445-447.
11. Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z. Cholinesterases: structure, role, and inhibition Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija. *Arh Hig Rada Toksikol* (2011) 62: 175-190.
12. Bovey AF. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Academic Press New York and London (1969).
13. Burke JR, Frey PA. Correlation of Electronic Effects in *N*-Alkylnicotinamides with NMR Chemical Shifts and Hydride Transfer Reactivity. *J Org Chem* (1996) 61: 530–533.

14. Burla MC, Caliandro R, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, De Caro L, Giacobozzo C, Polidori G, Spagna R. An improved tool for crystal structure determination and refinement. *J Appl Crystallogr* (2005) 38: 381–388.
15. Carpio RA, King LA, Lindstrom RE, Nardi JC, Hussey CL. Density, Electric Conductivity, and Viscosity of Several *N*-Alkylpyridinium Halides and Their Mixtures with Aluminum Chloride. *J Electrochem Soc* (1979) 126(10): 1644-1650.
16. Clark JH, Macquarrie DJ. Environmentally friendly catalytic methods. *Chem Soc Rev* (1996) 25: 303.
17. Clark JH, Macquarrie DJ. Supported Reagents: Preparation, Analysis, and Applications. *Org Proc Res Dev* (1997) 1: 149.
18. Çokuğras NA. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* (2003) 28: 54-61.
19. Cravotto G, Gaudino EC, Boffa L, Lévêque JM, Estager J, Bonrath W. Preparation of Second Generation Ionic Liquids by Efficient Solvent-Free Alkylation of *N*-Heterocycles with Chloroalkanes. *Molecules* (2008) 13: 149-156.
20. Čalić M, Vrdoljak AL, Radić B, Jelić D, Jun D, Kuca K, Kovarik Z. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology* (2006) 15:219(1-3): 85-96.
21. Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol* (2013) 11: 315-335.
22. De la Hoz A, Díaz-Ortiz Á, Moreno A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev* (2005) 34: 164-178.
23. Delfino RT, Ribeiro TS, Figueroa-Villar JD. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. *J Braz Chem Soc* (2009) 20: 407-428.
24. Eddleston M, Szinicz L, Eyer P, Buckley N. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *QJM* (2002) 95(5): 275-83.
25. Ellman K, George L, Courtney D, Andres V, Robert M. Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharm* (1961) 7(2): 88–90.
26. Fatiadi LAJ. Active Manganese Dioxide Oxidation in Organic Chemistry. *Synthesis* (1976) 1(2): 65-144.
27. Gašo-Sokač D. Sinteza analoga vitamina B6 (potencijalnih reaktivatora inhibirane acetilkolinesteraze). disertacija Zagreb (2009).

28. Gedye RN, Smith F, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Rousell J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett* (1986) 27: 279.
29. Ginsburg S, Wilson IB. Oximes of the Pyridine Series. *J Am Chem Soc* (1957) 79: 481.
30. Goncalves AS, Franca TCC, Wilter A, Figueroa-Villar JD. Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun. *J Braz Chem Soc* (2006) 17: 968-975.
31. Guntaka RV, Brain WJ, Mahr J, Michael B, Varmus HE. Ethidium Bromide Inhibits Appearance of Closed Circular Viral DNA and Integration of Virus-Specific DNA in Duck Cells Infected by Avian Sarcoma Virus. *Nature* (1975) 253: 507–511.
32. Günzler H, Gremlich HU. Uvod u infracrvenu spektroskopiju. Urednik. Bukan G, Školska knjiga, Zagreb (2006).
33. Gutiérrez E, Loupy A, Bram G, Ruiz-Hitzky E. Inorganic solids in “dry media” an efficient way for developing microwave irradiation activated organic reactions. *Tetrahedron Lett* (1989) 30: 945-946.
34. Holmstedt B. Cholinesterase inhibitors: an introduction. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. Urednik. Giacobini E, London (2000) str. 1-8.
35. Hooper EF, Johnson TB. The Polymerization of 2-methyl-4-chloromethylthiazole, New Haven Conn (1934) 1: 470-471.
36. Horikoshi S, Hamamura T, Kajitani M, Yoshizawa-Fujita M, Serpone N, Green Chemistry with a Novel 5.8-GHz Microwave Apparatus. Prompt One-Pot Solvent-Free Synthesis of a Major Ionic Liquid: The 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate. *Org Process Res Dev Development* (2008) 12: 1089–1093.
37. Hossein S, Oskooie A, Heravi MM, Sarmad N, SaedniaA, Ghassemzades M. A rapid method for oxidative deprotection of trimethylsilyl ether with wet alumina supported Dess-Martin periodinane in solventless system under microwave irradiation. *Indian J Chem* (2003) 42B: 2890-2891.
38. Huskić I, Halasz I, Frišćić T, Vančik H. Mechanochemistry of nitrosobenzenes: a proof-of-principle study in combining solvent-free synthesis with solvent-free separations. *Green Chem* (2012) 14: 1597.
39. Jukić M, Đaković S, Filipović-Kovačević Ž, Vorkapić-Furač J. “Zelena” kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kem Ind* (2004) 53(5): 217–224.
40. Jukić M, Đaković S, Filipović-Kovačević Ž, Kovač V, Vorkapić-Furač J. Dominantni trendovi zelene kemije. *Kem Ind* (2005) 54(5): 255–272.

41. Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. Medicinska bakteriologija i mikologija, Urednica Smiljka Kalenić, Prehrambeno tehnološki Inženjering, Zagreb 1995, 189, 192-198, 214-218, 237-242.
42. Kanapickaitė V, Girnienė J, Šačkus A. Quaternisation of pyridines with 2-methyl- and 2-amino-4-(chloromethyl)thiazoles. *Chemija* (2006) 17(2–3): 30–33.
43. Kappe CO. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew Chem* (2004) 43(46): 6250-84.
44. Katalinić M. Učinkovitost bispiridinijevih oksima u reaktivaciji tabunom inhibiranih kolinesteraza, doktorska disertacija. Zagreb: Prirodoslovno matematički fakultet, (2011).
45. Khadilkar BM, Rebeiro GL. Microwave assisted synthesis of room temperature ionic liquid precursor quaternary salts in closed vessel. *Org Process Res Dev* (2002) 6: 826-828.
46. Kourai H, Machikawa F, Horie T, Takeichi K, Shibasaki I. The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts. Part VII. Quantitative Relation Between Antimicrobial Activity and Adsorbability of *N*-Octylquinolinium Iodide on *Escherichia Coli* K12. *J Antibac Antifung Agents* (1983) 11: 51–54.
47. Kourai H, Manabe Y, Matsutani E, Hasegawa Y, Nakagawa K. Antimicrobial Activities of Alkylallyldimethylammonium Iodides and Alkylallyldiethylammonium Iodides. *J Antibact Antifung Agents* (1995) 23: 271–280.
48. Kovarik Z, Radić Z., Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates. *Biochem* (2004) 39: 3222-3229.
49. Kovarik Z, Čalić M, Bosak A, Šinko G, Jelić D. *In vitro* Evaluation of Aldoxime Interactions with Human Acetylcholinesterase. *Croat Chem Acta* (2008) 81 (1): 47-57.
50. Kuća K, Bielavsky J, Cabal J, Kassa J. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* (2003) 13: 3545-3547.
51. Kuća K, Bartosová L, Jun D, Patočka J, Cabal J, Kassa J, Kunesová G. New quaternary pyridine aldoximes as casual antidotes against nerve agents intoxications. *Biomed Pap Med* (2005) 149(1): 75-82.
52. Kuća K, Cabal J, Jun D, Musilek K, Soukup O, Pohanka M, Pejchal J, Oh KA, Yang GY, Jung YS. Reactivation of VX-inhibited AChE by novel oximes having two oxygen atoms in the linker. *Environ Toxicol Pharmacol* (2010) 30(1): 85-87.
53. Lagriffoul A, Boudenne JL, Absi R, Ballet JJ, Berjeaud JM, Chevalier S, Creppy EE, Gilli E, Gadonna JP, Gadonna-Widehem P, Morris k CE, Zini S. Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health? *Sci Total Environ* (2010) 408: 1659–1666.

54. Lalitha P, Sivakamasundari S. Solid supports in the synthesis of few vinyl quinolones. *J Chem Pharm Res* (2010) 2(3): 387-393.
55. Lidström P, Jason È, Tierney J, Watheyand B, Westman J. Microwave assisted organic synthesis. A review. *Tetrahedron* (2001) 57 A: 9225-9283.
56. Loghmani-Khouzani H, Sadeghi MM, Safari J. Silica gel Catalyzed Synthesis of Quinophthalone Pigments Under Solvent-Free Conditions Using Microwave Irradiation. *Molecules* (2002) 7: 135-139.
57. Loupy A, *Microwaves in Organic Synthesis*. Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2002).
58. Loupy A, Perreux L, Liagre M, Burle K, Moneuse M. Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanisms. *Pure Appl Chem* (2001) 73(1): 161-166.
59. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Shields GP, Taylor R, Towler M, van de Streek J. Mercury: Visualisation and analysis of crystal structures. *J Appl Crystallogr* (2006) 39: 453–457.
60. Maeda T, Goto S, Manabe Y, Okazaki K, Nagamune H, Kourai H. Bactericidal Action of *N*-Alkylcyanopyridinium Bromides Against *Escherichia Coli* K12 W3110. *Biocontrol Sci* (1996) 1: 41–49.
61. Maeda T, Okazaki K, Nagamune H, Manabe Y, Kourai H. Bactericidal Action of 4,4'-(α , ω -Polymethylenedithio)bis-(1-alkylpyridinium iodide)s. *Biol Pharm Bull* (1998) 21: 1057– 1061.
62. Maeda T, Manabe Y, Yamamoto M, Yoshida M, Okazaki K, Nagamune H, Kourai H. Synthesis and antimicrobial characteristics of novel biocides, 4,4'-(1,6-hexamethylenedioxydicarbonyl)bis(1-alkylpyridinium iodide)s. *Chem Pharm Bull* (1999) 47: 1020–1023.
63. Maksimović M, Bošković B, Radović L, Tadić V, Deljac V, Binenfeld Z. Antidotal effects of bis-pyridinium-2-monooxime carbonyl derivatives in intoxications with highly toxic organophosphorus compounds. *Acta Pharm Jugoslav* (1980) 30: 151–160.
64. Margetić D. Mehanokemijske organske reakcije bez uporabe otapala. *Kem Ind* (2005) 54(7-8): 351–358.
65. Mashkouri S, Reza M, Jamal N. Mechanochemical Solvent-Free and Catalyst-Free One-Pot Synthesis of Pyrano[2,3-d]Pyrimidine-2,4(1H,3H)-Diones with Quantitative Yields *Molecules* (2009) 14(1): 474-479.
66. McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids (error-prone

recombinational repair/7,12-dimethylbenzanthracene/aflatoxin/nitrofurans). Proc Nat Acad Sci (1975) 72: 979- 983.

67. Mercey G, Verdelet T, Renou J, Kliachyna M, Baati R, Nachon F, Jean L, Renard P-Y. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. Accounts Chem Res (2012) 45(5): 756-766.
68. Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neurosci (2002) 110: 627-39.
69. Milatović D, Vorkapić-Furač J, Škrinjarić-Špoljarić M, Reiner E. Synthesis of three pyridoxal oxime derivatives and their reactivating potency against phosphorylated acetylcholinesterase. Acta Pharm Jugosl (1989) 39: 281–287.
70. Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffie`A, Yan S, Dominguez H, Thompson BM. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. The ISME Journal (2008) 2: 321–334.
71. Musílek K, Lipka L, Račáková V, Kuča K, Jun D, Dohnal V, Doležal M. New methods in synthesis of acetylcholinesterase reactivators and evaluation of their potency to reactivate cyclosarin-inhibited AChE. Chem Pap (2006) 60(1): 48-51.
72. Musilek K, Kučera J, Jun D, Dohnal V, Opletalova V, Kuča K. Synthesis of monooxime-monocarbamoyl bispyridinium compounds bearing (*E*)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. Bioorg Med Chem (2008) 16: 8218-8223.
73. Nafisi S, Saboury AA, Keramat N, Neault JF, Riahi HAT. Stability and Structural Features of DNA Intercalation with Ethidium Bromide, Acridine Orange and Methylene Blue. J Mol Struct (2007) 827: 35–43.
74. Nishiwaki H, Miura M, Imai K, Ohno R, Kawashima K, Ezaki K, Ueda R, Yoshikawa H, Nagata K, Takeyama H, Yamada K. Experimental Studies on the Antitumor Effect of Ethidium Bromide and Related Substances. Cancer Res (1974) 34: 2699-2703.
75. Oh KA, Park NJ, Park NS, Kuca K, Jun D, Jung YS. Reactivation of DFP- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterases by pyridinium oximes. Chem Biol Interact (2008) 25 175(1-3): 365-7.
76. Okazaki K, Maeda T, Nagamune H, Manabe Y, Kourai H. Synthesis and Antimicrobial Characteristics of 4,4'-(α,ω -Polymethylenedithio)bis(1-alkylpyridinium iodide)s. Chem Pharm Bull (1997) 45: 1970–1974.
77. Ovchinnikova IG, Fedorova OV, Rusinov GL, Zueva MN, Mordovskoi GG. Synthesis and Antimicrobial Activity of *N*-Alkylpyridinium Podands. Khim-Farm (2003) 37: 17– 19.

78. Oxford Diffraction, Xcalibur CCD System. CrysAlisPro. Agilent Technologies, Abingdon, Engleska (2013).
79. Pang YP, Kollmeyer TM, Hong F, Lee J, Hammond PI, Haugabouk SP, Brimijoin S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chem Biol* (2003) 10: 491-502.
80. Perez E, Sotelo E, Loupy A, Mocelo R, Suarez M, Perez R, Autie M. An easy and efficient microwave-assisted method to obtain 1-(4-bromophenacyl)azoles in dry media. *Heterocycl* (1996) 43: 539–543.
81. Primožić I, Odžak R, Tomić S, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Pyridinium, imidazolium, and quinuclidinium oximes: synthesis, interaction with native and phosphorylated cholinesterases, and antidotes against organophosphorus compounds. *J Med Chem Def* (2004) 2: 1-30.
82. Primožić I, Tomić S. Imidazolijevi i kinuklidinijevi antidoti organofosfornih spojeva *Kem Ind* (2004) 53(9): 401-409.
83. Quin DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transitions states. *Chem Rev* (1987) 78: 955-79.
84. Raos N. Nove slike iz kemije, Zagreb (2004) 163-175.
85. Reiner E. Organophosphorus compounds and esterases: current research topics concerning the toxicity of and protection against organophosphates. *Arh Hig Rada Toksikol* (2001) 52(3): 323-31.
86. Rodriguez H, Perez R, Suarez M, Lam A, Cabrales N, Loupy A. Alkylation of Some Pyrimidine and Purine Derivatives Using Microwave-assisted Methods. *Heterocycl* (2001) 55(2): 291-301.
87. Saez-Valero J, Small DH. Altered glycosylation of cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Brain Res* (2001) 889: 247-50.
88. Saikia L, Baruah JM, Thakur AJ. A rapid, convenient, solventless green approach for the synthesis of oximes using grindstone chemistry. *Org Med Chem Lett* (2011) 1:12.
89. Saxena A, Redman AM, Jiang X, Lockridge O, Doctor BP. Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase *Chem-Biol Interact* (1999) 119(120): 61-69.
90. Sharma S, Gangal S, Rauf A. Green Chemistry approach to the sustainable advancement of the synthesis of heterocyclic chemistry. *Rasayan J Chem* (2008) 1(4): 693-717.
91. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr* (2008) A64: 112–122.

92. Shirai A, Maeda T, Hara I, Yoshinari A, Nagamune H, Kourai H. Antimicrobial Characteristics of Bis-Quaternary Ammonium Compounds Possessing a *p*-Phenylene group in their spacer chains. *Biocontrol Sci* (2003) 8: 151–157.
93. Schmidt MS, Reverdito AM, Kremenchuzky L, Perillo IA, Blanco MM. Simple and Efficient Microwave Assisted *N*-Alkylation of Isatin. *Molecules* (2008) 13: 831-840.
94. Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chem Biol Interact* (2008) 175: 3-10.
95. Silman I, Sussman J. Structural studies on acetylcholinesterase. Giacobini E. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: (2000) 9-26.
96. Simeon V, Radić Z, Reiner E. Inhibition of cholinesterase by the oximes 2-PAM and toxogonin. *Croat Chem Acta* (1981) 54: 473-480.
97. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase – new roles for and old actor. *Nat Rev Neurosci* (2001) 2: 294-302.
98. Spek AL. Structure validation in chemical crystallography. *J Appl Crystallogr* (2003) 36: 7–13.
99. Subash VK, Fareedullah MD, Y. Sudhakar Y, Venkateswarlu BE. Ashok KE. Current review on organophosphorus poisoning. *Archiv Appl Scie Res* (2010) 2(4): 199-215.
100. Surati MA, Jauhari S, Desai KR. A brief review: Microwave assisted organic reaction. *Archiv Appl Sci Res* (2012) 4(1): 645-661.
101. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* (1991) 253: 872-879.
102. Škrinjarić-Špoljar M, Simeon V, Reiner E, Krauthacker B. Bispyridinium compounds: Inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase and protection of the enzyme against phosphorylation. *Acta Pharm Jugosl* (1988) 38: 101-109.
103. Štrukil V, Igrc MD, Fábíán L, Eckert-Maksić M, Childs SL, Reid DG, Duer MJ, Halasz I, Mottillioe C, Frišćić T. A model for a solvent-free synthetic organic research laboratory: click-mechanosynthesis and structural characterization of thioureas without bulk solvents. *Green Chem* (2012) 14, 2462.
104. Thorsteinsson T, Masson M, Kristinsson KG, Hjalmarsdottir MA, Hilmarsson H, and Loftsson T. Soft Antimicrobial Agents: Synthesis and Activity of Labile Environmentally Friendly Long Chain Quaternary Ammonium Compounds. *J Med Chem* (2003) 46: 4173-4181.
105. Tullberg E, Peters D, Frejd T. Atom Efficient Organic Syntheses. *J Organomet Chem* (2004) 689: 3778–3781.

106. Tarkowski P, Vereecke D. Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotech Adv* (2014) 32: 215–229.
107. Varma RS. Solvent free organic syntheses – using supported reagents and microwave irradiation *Green Chem* (1999) 1(2) 43-55.
108. Varma RS, Namboodiri VV. Solvent-free preparation of ionic liquids using a household microwave oven. *Pure Appl Chem* (2001) 73(8): 1309–1313.
109. Varma RS. Greener organic syntheses under non-traditional conditions. *J Chem* (2006) 45B: 2305-2312.
110. Varma RS, Namboodiri, VV. An improved preparation of 1,3-dialkylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquids using microwaves. *Tetrahedron Lett* (2002) 43: 5381.
111. Vega JA, Vaquero JJ, Alvarez-Builla J, Ezquerra J, Hamdouchi C, A New Approach to the Synthesis of 2- Aminoimidazo[1,2-a]pyridine Derivatives Through Microwave-Assisted N-Alkylation of 2-Halopyridines. *Tetrahedron* (1999) 55: 2317-2326.
112. Vnutskikh ZA, Shklyayev YV, Odegova TF, Chekryshkin YS, Tolstikov AG, Elchishcheva NV, Syropyatov BY. Synthesis and Antimicrobial Activity of Mono- and Biquaternized Derivates of Dipyridylethanes and Dipyridylethylenes. *Khim-Farm.* (2006) 40: 19 – 22.
113. Vojvodić V, Zaštita okoliša: Zelena proizvodnja u farmaceutskoj industriji i smanjnjnja troškova, *Kem Ind* (2009) 58(1): 32-33.
114. Weissberger A. The chemistry of heterocyclic compounds- Pyridine and its derivatives, part two, Erwin Klingsberg, Edition American Cyanamid Company, Hound lirook, New Jersey (1961).
115. Wilkes JS, Levisky JA, Wilson RA, Hussey CL. Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorg Chem* (1982) 21(3): 1263–1264.
116. Wong L, Radić Z, Bruggemann RJ, Hosea N, Berman HA, Taylor P. Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analysed by chirality and mutagenesis. *Biocehm* (2000) 39: 5750-5757.
117. Worek F, Thiermann H, Sznicz L, Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem Pharmacol* (2004) 68: 2237-2248.
118. Zbancioc G, Bejan V, Risca M, Moldoveanu C, Mangalagiu II, Microwave Assisted Reactions of Some Azaheterocyclic Compounds. *Molecules* (2009) 14: 403-411.
119. Zhao T, Sun G. Hydrophobicity and antimicrobial activities of quaternary pyridinium salts. *J Appl Microbiol* (2008) 104: 824–830.

120. Zhuravlev OE, Verolainen NV, Voronchikhina LI. Effect of Structure of Nucleophile and Substrate on the Quaternization of Heterocyclic Amines. *Russian J Gen Chem* (2010) 80(5): 1025–1028.
121. Zrinski I, Eckert-Maksić M. Primjena mikrovalnog zračenja u organskoj sintezi. *Kem Ind* (2005) 54(11): 469–476.
122. Yoshida M, Maeda T, Okazaki K, Nagamune H, Kunikata K, Tsuchiya H, Namba T, Kourai H. Synthesis of 4,4'-(Tetramethylenedicarbonyldiamino)-bis(1-decylpyridinium bromide) and Its Antimicrobial and Deodorant Characteristics. *Biocontrol Sci* (2001) 6: 75–80.
123. Yoshida M, Maeda T, Okazaki K, Nagamune H, Kunikata K, Tsuchiya H. Synthesis and Antimicrobial Characteristics of *N,N'*-Hexamethylenebis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide). *Biocontrol Sci* (2000) (5): 65–71.

8. SAŽETAK

Problem zaštite prirodnog okruženja pred kemičare stavlja važan posao pronalaženja kemijskih reakcija koje su manje štetne za okoliš. U tu svrhu osmišljavaju se manje toksični industrijski procesi u kojima sudjeluju ili nastaju manje količine ekološki štetnih tvari i nusprodukata. Konačno, potpuno izuzimanje otapala u kemijskim je reakcijama za ljude i okoliš najpoželjnije. U ovom su radu izvedene reakcije kvaternizacije piridoksal-oksima sa serijom supstituiranih fenacil-bromida pomoću novih, ekološki prihvatljivijih metoda. Kvaterne su soli piridoksal-oksima sintetizirane pomoću dva nova postupka pod utjecajem mikrovalnog zračenja (u otapalu i suhim postupkom) te metodom mehanosinteze uz minimalnu količinu otapala. Osim na piridoksal-oksimum u ovom su radu, pod utjecajem mikrovalnog zračenja, izvedene i kvaternizacije na piridinu, α -pikolinu, piridin-4-aldoksimu, piridin-2-aldoksimu, nikotinamidu i izonikotinamidu pomoću različitih elektrofila: 2-brom-4'-nitroacetofenona, 2-amino-4-klormetiltiazol hidroklorida, metil-jodida, 1,3-dijodpropana i 1,3-dibrompropana. Pripravljenim je analogima piridoksal-oksima ispitana sposobnost reaktivacije acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) inhibirane bojnim otrovima VX-om i tabunom te pesticidom paraoksonom. Ispitana je također i reverzibilna inhibicija AChE i BChE sintetiziranim oksimima. Nekim je sintetiziranim spojevima ispitana i potencijalna antimikrobna aktivnost na dvije Gram-pozitivne i dvije Gram-negativne bakterije.

9. SUMMARY

Environmental problems have encouraged chemists to develop chemical reactions, which are less harmful for environment. In this regard, “green” industrial processes have been designed, which produce less chemical waste or use less toxic chemicals. The important step forward is to replace conventional with solvent-free processes. Chemical reactions conducted without a solvent are the most desirable from environmental point of view. In this thesis new eco-friendly methods of quaternization of pyridine and its derivatives with substituted phenacyl bromides were successfully performed. Microwave induced quaternization in the presence of a solvent, solvent free approach, and solid state reaction LAG mechanochemistry were examined. Furthermore, reactions of quaternization were made under microwave heating of pyridine, α -picoline, pyridine-4-aldoxyime, pyridine-2-aldoxime, nicotinamide and isonicotinamide with different electrophiles: 2-bromo-4'-nitroacetophenone, 2-amino-4-chloromethylthiazole hydrochloride, methyl iodide, 1,3-diiodopropane i 1,3-dibromopropane. The potential ability of synthesized oximes to reactivate acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibited by the nerve agents VX and tabun and pesticide paraoxon was also explored. In addition to that, reversible inhibition of AChE and BChE by synthesized oximes was measured. Finally, some of synthesized compounds regarding their potential antimicrobial activity against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria were tested.

10. PREGLED KORIŠTENIH SIMBOLA I OZNAKA

Kratica	Puni naziv
AADPC	4-acetilaminododecilpiridinijev klorid
AChE	acetilkolinesteraza
ACh	acetilkolin
ADPC	4-aminododecilpiridinijev klorid
Ala	alanin
BADPB	4-benzoilaminododecilpiridinijev bromid
BHI	moždano–srčani bujon (eng. <i>brain heart infusion broth</i>)
BChE	butirilkolinesteraza
[bmim]BF ₄	1-butil-3-metilimidazolijev tetrafluorborat
[C8mim][OTf]	1-oktil-3-metilimidazolijev triflat
[C8mim][NTf ₂]	1-oktil-3-metilimidazolijev <i>bis</i> (trifluormetansulfon)imid
[C4mim]Cl	1-butil-3-metilimidazolijev klorid
[C8Py]Cl	<i>N</i> -oktilpiridinijev klorid
[C4mim][PF ₆],	1-butil-3-metilimidazolijev heksafluorfosfat
[C4mim][BF ₄],[1-butil-3-metilimidazolijev tetrafluorborat
[C4mim][OTf]	1-butil-3-metilimidazolijev triflat
[C4mim][N(Tf) ₂].	1-butil-3-metilimidazolijev <i>bis</i> (trifluormetansulfon)imid
[C8Py][BF ₄]	<i>N</i> -oktilpiridinijev tetrafluorborat
[C8Py][OTf],	<i>N</i> -oktilpiridinijev triflat
[C8Py][N(Tf) ₂]	<i>N</i> -oktilpiridinijev <i>bis</i> (trifluormetansulfon)imid

DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
EC ₅₀	polovina maksimalne učinkovite koncentracije
EPA	američka agencija za zaštitu okoliša
EPN	<i>O</i> -etil- <i>O</i> -(4-nitrofenil)fenilfosfonotiolat
FTIR	Fourier–ove transformacije u infracrvenoj spektroskopiji (eng. <i>Fourier Transform Infrared Spectrometry</i>)
GHz	gigaherc
Gly	glicin
Glu	glutamin
HI-6	1-(2-hidroksiminometil-1-piridinijev)-3-(4-karbamoil-1-piridinijev)-2-oksapropan diklorid
His	histidin
HSVM	brzi vibracijski mlin (eng. <i>High speed vibrational mill</i>)
IC ₅₀	koncentracija inhibitora potrebna za inhibiciju 50 % aktivnosti enzima.
LAG	mehanosinteza uz minimalnu količinu otapala (eng. <i>Liquid-assisted grinding</i>)
LD ₅₀	letalna doza (50%) odnosi se na dozu toksične supstancije, koja ubija 50% ispitane populacije
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija

MIM	1-metilimidazol
NADPB	4-(1-naftoil)aminododecilpiridinijev bromid
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
MW zračenje	mikrovalno zračenje
OP	organofosforni
2-PAM	piridin-2-aldoksim- <i>N</i> -metil klorid
Ph	fenil-
Phe	fenilalanin
RNA	ribonukleinska kiselina
Ser	serin
<i>TcAChE</i>	acetilkolinesteraza izolirana iz raže
TGA i DSC	termogravimetrijska analiza i diferencijalna pretražna kalorimetrija
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
THF	tetrahidrofuran
TEPP	tetraetilpirofosfat
TMB-4	1,3-bis(4-hidroksiminometil-1-piridinijev)propan diklorid
TNB ⁻	anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline
UZ	ultrazvuk
VX	etil({2-[bis(propan-2-il)amino]etil}sulfanil)metilfosfinat

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. svibnja 1976. u Osijeku. Godine 1982. krenula sam u osnovnu školu „Vladimir Nazor“ u Brijesću u kojoj sam završila prva četiri razreda, a potom sam od četvrtog do osmog razreda pohađala OŠ „Vladimir Nazor“ u Čepinu gdje sam završila osnovnoškolsko obrazovanje. 1990. g sam upisala CUO „Braća Ribar“ u Osijeku, prirodoslovno-matematički smjer. 1992. godine sam pohađala školsku godinu u Čakovcu u Tehničkoj, industrijskoj i obrtničkoj školi, prirodoslovni smjer te 1993. g nastavila školovanje u III. gimnaziji u Osijeku. 1994. g sam upisala Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, smjer prehrambena tehnologija na kojem sam 17. studenoga 2000. godine diplomirala pod vodstvom mentorice profesorice Milene Mandić obranivši diplomski rad pod naslovom „Unos masti i masnih kiselina studentske populacije određen dvjema metodama“. Studij sam završila s prosječnom ocjenom 4,64. 2001. godine zaposlena sam na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku u svojstvu znanstvenog novaka na projektu 0113006 „Interakcije u sustavu metalni ambalažni materijal – hrana“. Upisala sam poslijediplomski magistarski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, smjer organska kemija. 2003. godine sam boravila na Institutu za kemiju i tehnologiju namirnica u Grazu, „Institut für Lebensmittelchemie und -technologie Technische Universität Graz“, gdje sam pod vodstvom profesora Michaela Murkovića i Wenera Pfannhausera izradila dio eksperimenta magistarskog rada „Izolacija i svojstva antocijanina iz različitih sorti višanja“ pod mentorstvom izv. prof. Spomenke Kovač. Rad sam obranila 14. listopada 2005. godine. Od 7. rujna 2007. godine postala sam zaposlenik Odjela za kemiju pri Sveučilištu J.J. Strossmayera u Osijeku gdje sam bila zaposlena kao asistent na kolegijima Organska kemija 1 i 2, Praktikum iz organske kemije 1 i 2 te na kolegiju Kemija prirodnih organskih spojeva. 1. srpnja 2013. godine prešla sam na Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku gdje sam zaposlena u funkciji asistenta na kolegijima Organska kemija, Praktikum iz organske kemije, Antioksidansi u hrani, Izolacijske tehnike i prečišćavanje i Zelena kemija.

Objavila sam 8 znanstvenih radova od kojih je 6 u znanstvenim časopisima koje citira CC. Sudjelovala sam na brojnim međunarodnim i domaćim kongresima te sam kao suautor napisala jedno poglavlje u knjizi. Bila sam neposredni voditelj nekoliko diplomskih radova. Član sam Hrvatskog kemijskog društva, Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Udana sam i majka dvoje djece, kćeri Mije i sina Andreja.

Popis znanstvenih radova

Poglavlje u knjizi

1. Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka, **Bušić Valentina**, Colin R. Martin, Vorkapić Furač Jasna. The Chemistry and Biochemistry of Vitamin B6: Synthesis of Novel Analogues of Vitamin B6. B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects, Victor R. Preedy (ur.). London: Royal Society of Chemistry (2012) 135-145.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u CC-u

1. Gašo-Sokač Dajana, **Bušić Valentina**, Cetina Mario, Jukić Marijana. An Efficient Synthesis of Pyridoxal Oxime Derivatives Under Microwave Irradiation. *Molecules*. (2014) 19 (6); 7610-7620.

2. **Bušić Valentina**, Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka. Novel and Cleaner Synthesis of Pyridinium Salts from Pyridoxal Oxime and Substituted Phenacyl Bromides. *Croatica chemica acta*. (2013) 86 3; 331-334.

3. Cetina Mario, Nagl Ante, Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka, **Bušić Valentina**, Saftić Dijana. Extensive Intramolecular and Intermolecular Interactions in Two Quaternary Salts of the Pyridoxal Oxime. *Journal of chemical crystallography*. (2012) 42 (7); 752-758.

4. Gašo-Sokač Dajana, Katalinić Maja, Kovarik Zrinka, **Bušić Valentina**, Kovač Spomenka. Synthesis and evaluation of novel analogues of vitamin B6 as reactivators of tabun and paraoxon inhibited acetylcholinesterase. *Chemico-biological interactions*. (2010) 187 1/3; 234-237.

5. **Bušić Valentina**, Kovač Spomenka, Gašo-Sokač Dajana, Lepeduš Hrvoje. Antioxidative Activity of Anthocyanins From Sour Cherries. *Acta Alimentaria*. (2008) 37 3; 391-397.

6. **Šimunić Valentina**, Kovač Spomenka, Gašo-Sokač Dajana, Pfannhauser Werner, Murkovic Michael. Determination of Anthocyanins in Four Croatian Cultivars of Sour Cherries (*Prunus Cerasus*). *European food research and technology*. (2005) 220; 575-578.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Gašo-Sokač Dajana, Nujić Marija, **Bušić Valentina**, Habuda-Stanić Mirna. Biocatalytic reductions by plant tissue — Green alternative for alcohol production. Croatian Journal of Food Science and Technology. 6 (2014) 1; 51-60.
2. Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka, **Bušić Valentina**. Isolation of Active Substances from the Seeds of the Plant Milk Thistle (*Silybum marianum*) and Determination of Antioxidant Activity. Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske. (2011) 60 9; 441-445.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

1. Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka, **Šimunić Valentina**. Isolation of active substances from the seeds of the plant Milk Thistle (*Silybum marianum*). Proceedings of 4th International Conference of PhD Students, Lehoczky, Laszlo. Kalmar Laszlo. (ur.). Miskolc: University of Miskolc, Innovation and Technology Transfer Centre (2003) 253-256.
2. **Šimunić Valentina**, Kovač Spomenka, Gašo-Sokač Dajana. Survey of analytical methods for polyphenol isolation and identification from fruits, Proceedings of 4th International Conference of PhD Students, Lehoczky, Laszlo. Kalmar Laszlo. (ur.). Miskolc: University of Miskolc, Innovation and Technology Transfer Centre (2003) 359-364.

Sažeci u zbornicima skupova

1. **Bušić Valentina**, Gašo-Sokač Dajana, Katalinić Maja. Evaluation of the potency of a new series of pyridoxal oxime derivatives in the reactivation of tabun, paraoxon and VX-phosphorylated acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, The Interplay of Biomolecules HDBMB 2014, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 24-27 September, 2014, Zadar, Croatia, Katalinić Maja ; Kovarik Zrinka (ur.). Zadar, Hrvatska : (2014) 82.
2. Gašo-Sokač Dajana, **Bušić Valentina**, Habuda-Stanić Mirna, Nujić Marija. Spectrophotometric studies of novel derivatives of vitamin B6, 15. Ružička days "Today Science Tomorrow Industry" Šubarić, Drago (ur.). Osijek: Grafika d.o.o., Osijek (2014) 31.

3. Gašo-Sokač Dajana, **Bušić Valentina**, Štivojević Marija, Habuda-Stanić Mirna, Nujić Marija. Biokatalytic reduction of prochiral ketones, International Scientific and Professional Conference 15 th Ružička days "Today science - Tomorrow industry" Osijek (ur.). Osijek: Grafika d.o.o., Osijek (2014) 32.
4. Spomenka Kovač, **Valentina Bušić**, Dajana Gašo-Sokač. Nova, čistija kvaternizacija piridoksal-oksima fenacil-bromidima, Knjiga sažetaka XXIII. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera, Hadžiev Andrea, Blažeković Zdenko (ur.). Zagreb: HDKI, Kemija u industriji (2013) 132.
5. **Bušić Valentina**, Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka. Kvaternizacija piridoksal-oksima sa fenacil-bromidima pod utjecajem mikrovalnog zračenja, Danas znanost - sutra industrija: knjiga sažetaka, Ante Jukić (ur.). Zagreb, Osijek : Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno tehnološki fakultet (2012) 40.
6. Rak Ivana, **Bušić Valentina**, Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka. Michael-ova kondenzacija pod utjecajem mikrovalnog zračenja, Danas znanost - sutra industrija : knjiga sažetaka, Jukić Ante (ur.). Zagreb, Osijek: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno tehnološki fakultet (2012) 41.
7. Gašo-Sokač Dajana, Kocevski Dragana, Kovač Spomenka, **Bušić Valentina**, Šrajer Gajdošik Martina, Pavlović Hrvoje. Synthesis of novel analogues of vitamin B6 and evaluation of their antibacterial activity, Book of Abstracts, Šubarić Drago (ur.). Osijek, (2010) 24.
8. Gašo-Sokač Dajana, Katalinić Maja, Kovarik Zrinka, **Bušić Valentina**, Kovač Spomenka. Synthesis and evaluation of novel analogues of vitamine B6 as reactivators of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase, 10th International Meeting on Cholinesterases, Šibenik, Hrvatska, Programme and Abstracts, Kovarik Zrinka (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (2009) 96-97.
9. Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka, **Bušić Valentina**, Saftić Dijana. Kvaternizacija piridoksal-oksima fenacil-halogenidima, XXI. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka, Predrag Novak (ur.). Trogir: HDKI, HKD (2009) 68.

10. **Bušić Valentina**, Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka. Antioksidacijska aktivnost antocijanina iz višanja određena fotokemiluminiscencijom, XX. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Đurđa Vasić-Rački (ur.). Zagreb: HDKI, Kemija u industriji (2007) 177.
11. Gašo-Sokač Dajana, **Bušić Valentina**, Hercog Rajna, Kovač Spomenka. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vrtnog čubra (*Satureja hortensis L.*) i miloduha (*Hyssopus officinalis L.*), XX. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Đurđa Vasić-Rački (ur.). Zagreb: HDKI, Kemija u industriji (2007) 107.
12. Gašo-Sokač Dajana, **Šimunić Valentina**, Kovač Spomenka. Antioksidacijska aktivnost antocijanina izoliranih iz pet različitih sorti višanja, Knjiga sažetaka XIX. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera Škare Danko (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (2005) 86.
13. Gašo-Sokač Dajana, Kovač Spomenka, **Šimunić Valentina**, Šeper Zlatibor. Izolacija i karakterizacija ulja i silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Sylibum marianum*), Knjiga sažetaka 11. Ružičkini dani. (2004) 35.
14. **Šimunić Valentina**, Kovač Spomenka, Lepeduš Hrvoje, Gašo-Sokač Dajana. Utjecaj antocijanina na ukupnu aktivnost gvajacilnih peroksidaza, Knjiga sažetaka 11. Ružičkini dani. (2004) 36.
15. **Šimunić Valentina**, Kovač Spomenka, Gašo-Sokač Dajana. Anthocyanins Profile of Five Different Cultivars of Sour Cherries (*Prunus Cerasus*), Book of abstracts of 2nd Central European Meeting 5th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists, and Nutritionists, Karlović Damir (ur.). Zagreb: Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists Society (2004) 39.