

O-tert-butiloksimi kinuklidina kao inhibitori butirilkolinesteraze

Perić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:646405>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dora Perić

O-TERT-BUTILOKSIMI KINUKLIDINA
KAO INHIBITORI
BUTIRILKOLINESTERAZE

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Organsku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.
Ines Primožič i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Alme Ramić

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta „Metom usmjerena sinteza inhibitora kolinesteraza
podržana strojnim učenjem“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost
(IP-2022-10-9525).

Zahvale

Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Primožič na pruženoj prilici, na praćenju kroz cijeli ovaj proces, strpljenju i pristupačnosti.

Hvala i mojoj dragoj asistentici dr. sc. Almi Ramić od koje sam zaista puno naučila. Uvijek je bila spremna odgovoriti na sva moja pitanja, dati mi korisne savjete i izdvojiti vrijeme da bi mi pomogla. Neizmjereno sam Vam zahvalna na svemu.

Hvala mojim roditeljima koji su me odmalena usmjeravali da se bavim onime što stvarno volim i da slijedim svoje srce. Zbog vas sam dospjela ovdje.

Hvala i mojoj sestri Heleni i svim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene. Hvala vam što ste vjerovali u mene i bodrili me da nastavljam dalje. Hvala mojoj prijateljici i kolegici Petri bez koje ovo studiranje ne bi bilo isto. Sve smo prolazile zajedno od početka, pa smo tako zajedno došle i do samog kraja ovog poglavlja naših života.

Sadržaj

| | |
|--|------|
| SAŽETAK..... | IX |
| ABSTRACT | XI |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Kinuklidin..... | 2 |
| 2.2. Bioaktivnost i sinteza etera oksima..... | 6 |
| 2.3. Alzheimerova bolest i acetilkolinesteraza (AChE)..... | 9 |
| 2.4. Butirilkolinesteraza (BChE)..... | 10 |
| 2.5. Inhibitori kolinesteraza | 12 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 14 |
| 3.1. Materijali i metode..... | 14 |
| 3.2. Priprava <i>O-tert</i> -butilnog etera kinuklidin-3-on-oksima (1)..... | 15 |
| 3.3. Sinteza kvaternih derivata <i>O-tert</i> -butilnog etera kinuklidin-3-on oksima | 15 |
| 3.3.1. Sinteza <i>N</i> -benzil-3-((<i>tert</i> -butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (2) | 15 |
| 3.4. Inhibitorna aktivnost sintetiziranih spojeva | 21 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 23 |
| 4.1. Uvod | 23 |
| 4.2. Priprava <i>O-tert</i> -butilnog etera kinuklidin-3-on oksima | 24 |
| 4.3. Sinteza kvaternih derivata <i>O-tert</i> -butilnog etera kinuklidin-3-on oksima | 25 |
| 4.4. Spektroskopska karakterizacija spojeva..... | 25 |
| 4.5. Inhibitorna aktivnost pripremljenih spojeva | 27 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 30 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 31 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI..... | 32 |
| § 8. DODATAK | XXXV |
| 8.1. IR i NMR spektri sintetiziranih spojeva..... | xxxv |
| § 9. ŽIVOTOPIS | LVII |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

O-TERT-BUTILOKSIMI KINUKLIDINA KAO INHIBITORI BUTIRILKOLINESTERAZE

Dora Perić

U okviru ovoga rada pripremljen je *O-tert*-butilni eter kinuklidin-3-on-oksima reakcijom hidroklorida *O-tert*-butilhidroksilamina i kinuklidin-3-ona klasičnom organskom sintezom bez korištenja baze. Kvaternizacijom tercijarnoga dušikovog atoma kinuklidina metil-jodidom te različito supstituiranim benzil-bromidima (metilna ili nitro skupina te atomi halogena u *meta* ili *para* položaju) pripremljena je serija od dvanaest novih *N*-kvaternih derivata *O-tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on-oksima. Struktura pripremljenih spojeva potvrđena je standardnim analitičkim postupcima koji uključuju infracrvenu spektroskopiju, 1D (¹H, ¹³C) i 2D spektroskopske metode NMR te spektrometriju masa. Svim pripremljenim spojevima određen je inhibitorski potencijal prema enzimu butirilkolinesterazi (EC 3.1.1.8) iz konjskog seruma korištenjem Ellmanove metode za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze.

(71 stranica, 21 slika, 3 tablice, 48 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: butirilkolinesteraza, inhibicija, kvaterni derivati, *O-tert*-butiloksim kinuklidina

Mentor: prof. dr. sc. Ines Primožič
Neposredni voditelj: dr. sc. Alma Ramić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
 2. doc. dr. sc. Adriana Kenđel
 3. prof. dr. sc. Jana Pisk
- Zamjena: doc. dr. sc. Nikola Cindro

Datum diplomskog ispita: 23. rujna 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

O-TERT-BUTYLOXIMES OF QUINUCLIDINE AS BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITORS

Dora Perić

In this work, *O*-tert-butyl ether of quinuclidin-3-one-oxime was prepared by the reaction of *O*-tert-butylhydroxylamine and quinuclidin-3-one hydrochloride by classic organic synthesis without using a base. By quaternization of the tertiary nitrogen atom of quinuclidine with methyl iodide and differently substituted benzyl bromides (methyl or nitro group and halogen atoms in the *meta* or *para* position), a series of twelve new *N*-quaternary derivatives of *O*-tert-butyl ether quinuclidin-3-one-oxime was prepared. The structure of the prepared compounds was confirmed by standard analytical procedures that include infrared spectroscopy, 1D (¹H, ¹³C) and 2D NMR spectroscopic methods and mass spectrometry. The inhibitory potential of all prepared compounds to the enzyme butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) from horse serum was determined using the Ellman method for colorimetric determination of cholinesterase activity.

(71 pages, 21 figures, 3 tables, 48 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: butyrylcholinesterase, inhibition, *O*-tert-butyl oxime of quinuclidine, quaternary derivatives

Mentor: Dr. Ines Primožič, Professor

Assistant mentor: Dr. Alma Ramić

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Professor
 2. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
 3. Dr. Jana Pisk, Professor
- Substitute: Dr. Nikola Cindro, Assistant Professor

Date of exam: September 23, 2024

§ 1. UVOD

Alzheimerova bolest vodeći je uzrok demencije (72 % slučajeva).¹ U svijetu trenutno više od 55 milijuna ljudi boluje od ove bolesti,² a procjenjuje se da će se taj broj udvostručivati svakih dvadeset godina.¹ Kod pacijenata s Alzheimerovom bolešću smanjena je razina acetilkolina, neurotransmitera koji je odgovoran za procese memorije i učenja. Enzimi acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza hidroliziraju acetilkolin te time direktno utječu na koncentraciju acetilkolina u organizmu. Iz tog razloga upravo se ovi enzimi koriste kao farmakološke mete za Alzheimerovu bolest, ali i neke druge neurodegenerativne bolesti.^{3,4}

Kinuklidin je azabicyklički sustav s dušikovim atomom u prstenu koji je dio strukture mnogih bioaktivnih tvari koji se pojavljuju u prirodi, poput *Cinchona* alkaloida, alkaloida indola te sintetičkih lijekova.^{5,6} Neki kemoterapeutici sadrže jezgru kinuklidina kao esencijalni dio svoje strukture, a drugi derivati kinuklidina koji djeluju kao muskarinski agonisti našli su svoju primjenu u liječenju Alzheimerove bolesti. Pojedini 3-supstituirani derivati kinuklidina pokazali su se kao potencijalni antidoti za trovanje organofosforinim tvarima poput pesticida, insekticida i kemijskog oružja.⁷ Svojstvo ovih derivata od posebnog interesa za ovo istraživanje je to da se neki od njih mogu smatrati bicykličkim analogima acetilkolina, što objašnjava potragu za njihovom primjenom u kolinergičkim sustavima.⁴

U ovom istraživanju sintetiziran je *O-tert*-butilni eter kinuklidin-3-ona te je pripravljeno 12 kvaternih derivata ovog spoja. Kvaternizacija je provedena s različito supstituiranim benzilbromidima (metil, nitro, fluor, klor, brom) u *para* ili *meta* položaju te s metiljodidom. Pripravljene spojevi karakterizirani su infracrvenom spektroskopijom, 1D i 2D spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije, spektrometrijom masa te im je određeno talište.

S obzirom na važnu ulogu inhibicije enzima kolinesteraza u liječenju Alzheimerove bolesti, svim pripremljenim spojevima testirana je inhibitorna aktivnost prema enzimu butirilkolinesterazi iz konjskog seruma (EC 3.1.1.8.) pomoću Ellmanove metode za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze.

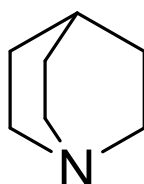
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kinuklidin

2.1.1. Opća svojstva i primjena

Kinuklidin (1-azabicyklo[2.2.2]oktan) je heterociklički sustav čiji je kostur dio strukture mnogih aktivnih komponenata, lijekova i prirodnih alkaloida poput kinkonina i kinkonamina (alkaloidi *Cinchona* vrste), sarpagin-ajmalin (alkaloidi *Rauwolfia* vrste) i makuzina (alkaloidi *Strychnos* vrste). Totalna sinteza kinina (Woodward, Doering, 1944.)⁸ i sinteza kinkonamina (Chen i sur., 1958.)⁹ bila su glavna otkrića početnih istraživanja derivata kinuklidina.

Kinuklidin (slika 1.) je zasićeni biciklički sustav s dušikovim atomom u premoštenju. Za razliku od tercijarnih alifatskih amina i *N*-supstituiranih piperidina, kinuklidin ima rigidnu strukturu. Atomi koji čine kinuklidinski prsten ne mogu mijenjati svoj položaj rotacijom oko osi veza budući da su osi veza uključene u biciklički sustav sa svakim prstenom u obliku izvijene kolijevke.



Slika 1. Struktura kinuklidina

Za razliku od drugih 1-azabicykloalkana, kinuklidin je prepoznatljiv po svojoj visokoj simetriji i po neznčajnoj napetosti veze. Slobodni elektronski par na atomu dušika je sp^3 hibridiziran i slobodan je od steričkih smetnji. Ova svojstva kinuklidina objašnjavaju neka od fizikalnih i kemijskih svojstava i specifičnosti kinuklidina i njegovih derivata. Primjerice, kinuklidin je hlapljiva kristalinična tvar s visokom točkom tališta (158°C) koja brzo i potpuno sublimira na zraku. Ukoliko se naruši simetrija (s uvođenjem alkilnih supstituenata ili pretvaranjem u kondenzirani sustav), talište se smanjuje.

Bazičnost kinuklidina koja ovisi o elektronskoj gustoći na dušikovom atomu bliska je bazičnosti alifatskih amina i *N*-alkilpiperidina.^{10,11} U kondenziranim benzo- i dibenzokinuklidinskim sustavima bazičnost je manja zbog induktivnog efekta benzenskih prstena. Utjecaj rigidnosti strukture na bazičnost derivata kinuklidina demonstrirana je

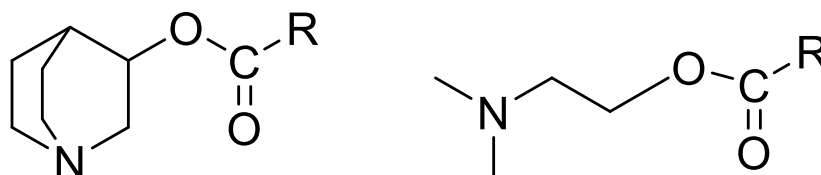
usporedbom pK_a vrijednosti benzo- i dibenzokinuklidina sa strukturno srodnim dimetilaminom i difenilaminom.

Tablica 1. Bazičnost kinuklidina i sličnih tvari

| Tvar | pK_a |
|--------------------------|--------|
| Dimetilamin | 10,77 |
| Dietilamin | 10,93 |
| Trietilamin | 10,87 |
| <i>N</i> -metilpiperidin | 10,08 |
| Kinuklidin | 10,58 |
| Benzokinuklidin | 7,79 |
| Dietilanilin | 6,56 |
| Dibenzokinuklidin | 4,46 |
| Difenilamin | 0,79 |

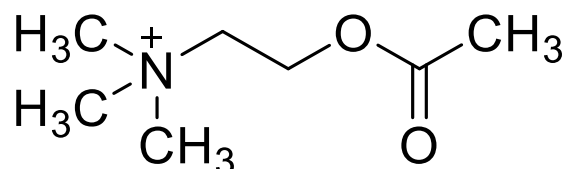
Kinuklidin, kao i ostali tercijarni alifatski amini, lako formira soli s mineralnim i organskim kiselinama te kvaterne derivate s halogenalkananima. Međutim, brzine reakcija alkil-jodida s kinuklidinom značajno su veće nego s tercijarnim alifatskim aminima. Tako primjerice kinuklidin reagira 50 puta brže s metil-jodidom, a 700 puta brže s izopropil-jodidom od trietilamina. Takvo ponašanje može se objasniti gotovo potpunom odsutnošću steričkih smetnji na slobodnom elektronskom paru kinuklidinskog dušika.¹²

Neki derivati kinuklidina strukturno nalikuju na derivate alkilamino alkana. Primjerice, esteri 3-hidroksikinuklidina (slika 2.) mogu se smatrati cikličkim analogima estera 2-dialkilamina (slika 2.). Pokazalo se da mnoge tvari koje imaju strukturu sličnoj esterima 2-dialkilamina (adifenin, benaktizin i drugi) imaju antikolinergička svojstva i druge neurotropne aktivnosti.



Slika 2. Struktura estera 3-hidroksikinuklidina i 2-dialkilaminoetanola

Kvaterni derivati takvih estera mogu imati antikolinergička svojstva, svojstva blokiranja ganglija i neuromuskulatornih blokatora, kao i kolinergičku aktivnost. Acetilholin je jedan od kvaternih derivata ove serije (slika 3.)¹³



Slika 3. Struktura acetilkolina

Kvaterne amonijeve tvari već dugo su prepoznate kao moćni antimikrobni agensi, kada je 1935. Domagk uočio antimikrobnu aktivnost benzildodecildimetil amonijevog klorida.¹⁴ Antimikrobno svojstvo ove tvari brzo je primijenjeno u dezinfekciji ruku i površina pri kirurškim operacijama. Kvaterne amonijeve tvari su amfifilne molekule generalne kemijske strukture $N^+R_1R_2R_3R_4X^-$ (R: vodik, alkilna skupina sa ili bez drugih funkcijskih skupina; X⁻: halidni anion). S obzirom na svoju kemijsku prirodu, ove tvari se često uspoređuju s amfifilnim antimikrobnim peptidima kojima je membrana stanice meta. Vjeruje se da je njihova antimikrobna aktivnost temeljena na elektrostatskoj interakciji između pozitivno nabijenog atoma dušika i negativno nabijenih skupina na površini bakterijske stanice. Jednom kad se uspostavi ova interakcija, alkilni dio kvaterne amonijeve tvari prodire kroz bakterijsku membranu, uzrokujući perforaciju i osmotsku neravnotežu što na kraju dovodi do lize bakterijske stanice.¹⁵

2.1.2. Biološka aktivnost kvaternih amonijevih soli 3-supstituiranog kinuklidina

3-supstituirani kinuklidin je derivat kinuklidina koji je posebno zanimljiv zbog velikog raspona različitih farmakoloških svojstava. Primjerice, ovi spojevi se koriste u liječenju očne hipertenzije (*Aceklidin*) te kao inhibitori ganglija (*Temekhin*).¹⁶⁻¹⁸ Osim što djeluju na kolinergički sustav, neke tvari koje sadrže kinuklidin pokazale su se korisne u liječenju depresije, kao stimulatori centralnog živčanog sustava te za suzbijanje kašlja.¹⁶

Pri sintezi 3-supstituiranog kinuklidina može nastati racemat ili pak jedan enantiomer budući da ima asimetrični ugljikov atom. Racemati mogu stvarati problem zbog toga što enantiomeri mogu imati drukčije biološke efekte, bilo da jedan enantiomer ima manju aktivnost ili da se toksičnost poveća. Iz tog razloga, od izrazite je važnosti razdvojiti takve racemične

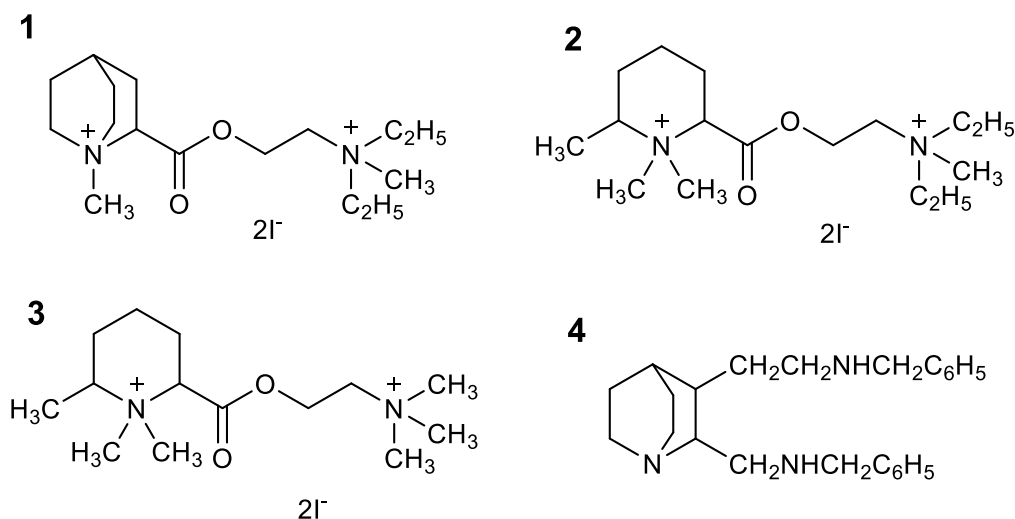
smjese pa su se brojna istraživanja usmjerila na rješavanje tog problema. Iako su se isprva smatrali biokatalizatorima koji bi mogli razdvojiti enantiomere, acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza pokazali su se kao enzimi koje inhibiraju 3-supstituirani kinuklidini.^{15,17}

2.1.3. *Biološka svojstva derivata kinuklidina*

Prvo istraživanje o farmakološkoj aktivnosti nesupstituiranih kinuklidina provedeno je 1941. (Stern)¹⁹ kada je ustanovljeno da kinuklidin hidroklorid uzrokuje primjetnu hipotenzivnu aktivnost i smanjuje tonus glatkog mišića. U daljnjim istraživanjima kinuklidina i drugih derivata 1-azabicikloalkana (Rubtsov i sur.)²⁰ otkriveno je nekoliko metoda za sintezu i pripravljene su mnoge tvari za biološko testiranje. Mnoge od tih tvari ustanovile su se kao učinkoviti lijekovi za medicinske svrhe.

Neki derivati 2-dietilamino-kinuklidin-2-karboksilata imaju svojstva blokiranja ganglija. Kvaterne soli dialkilaminoetil kinuklidin-2- i -3-karboksilata su među najaktivnijim agensima blokiranja ganglija (dietilaminoetil kinuklidin-2-karboksilat je jedan od najmoćnijih agensa).

Istraživanjem korelacije između kemijske strukture i biološke aktivnosti otkrilo se da svojstva blokiranja ganglija ostaju učinkovita kada se iz bicikličkog kinuklidina pređe u monociklički piperidinski sustav. Kvaterne soli dialkilaminoetil kinuklidin-2- i -3-karboksilata su aktivni agensi blokiranja ganglija. U tu skupinu pripadaju i dietilaminoetil kinuklidin-2-karboksilat te dietilaminoetil 1,6-dimetilpipekolinat, prikazani na slici 4. Uvođenje razgranatih dialkilaminoalkilnih skupina umjesto ravnolančanih dialkilaminoetilnih spojeva u strukturu biološki aktivne tvari smanjuje njihovu aktivnost blokiranja ganglija. Za razliku od kvaternih soli kinuklidinkarboksilata, aktivnost sekundarnih amina poput 2-benzilaminometil-3-(β -benzilaminoetil)kinuklidina (slika 4.) ovisi o prisutnosti bicikličkog kinuklidinskog sustava. U ovom slučaju uklanjanje kinuklidinskog prstena uzrokuje prestanak utjecaja ovih tvari na ganglije u živčanom sustavu.



Slika 4. Strukture spojeva: dietilaminoetil kinuklidin-2-karboksilata (**1**), dietilaminoetil-1,6-dimetilpipekolinata (**2**), dimetilaminoetil-1,6-dimetilpipekolinata (**3**) i 2-benzilaminometil-3-(β -benzilaminoetil)kinuklidina (**4**)

Esteri 3-hidroksikinuklidina također imaju utjecaj na centralni sustav i periferne kolinergičke sustave. Visoka biološka aktivnost derivata ovog spoja u usporedbi sa sličnim mono- i bicikličkim aminoalkanima vjerojatno je rezultat odsutnosti steričkih smetnji slobodnog elektronskog para na dušiku. Slobodni elektronski par je tada dostupniji elektrofilnim centrima što je zaslužno za veću psihotropnu aktivnost 3-benziloksikinuklidina u usporedbi s esterima drugih *N*-supstituiranih amino alkohola.¹²

2.2. Bioaktivnost i sinteza etera oksima

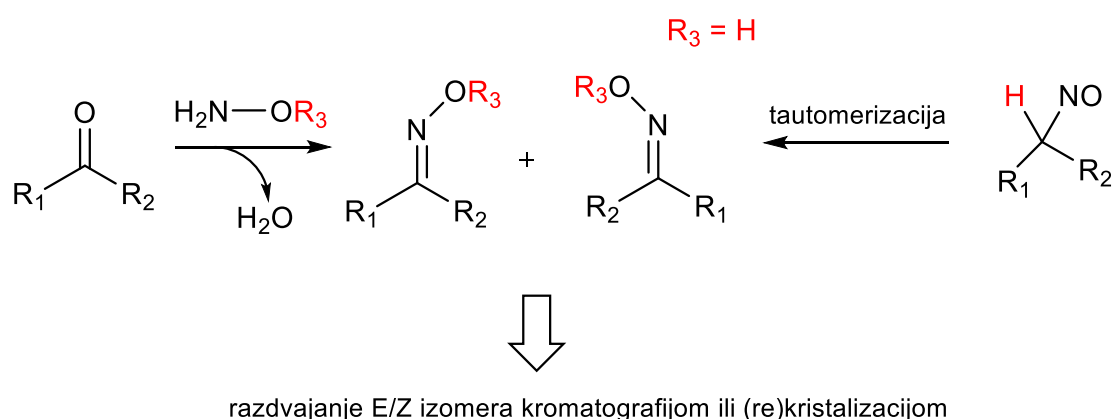
2.2.1. Bioaktivnost etera oksima

Eteri oksima su spojevi s bogatom i raznolikom kemijom koji posjeduju mnoga važna biološka svojstva. Skupina C=N-O privilegirana je skupina u kemiji s obzirom da je prisutna u brojnim lijekovima s antigljivičnim, antibakterijskim, protuupalnim, antitumorskim i drugim farmaceutskim svojstvima.^{21,22} Ovi spojevi često su polazni reagensi u sintezi tvari koje sadržavaju dušik, poput amina, nitrila, laktama i 3- do 8-članih prstenastih dušikovih heterocikla.²³ Česti supstituenti oksima koji su pokazali dobru bioaktivnost su fenilni i halofenilni prstenovi. Različite funkcijske skupine imaju različite elektronske efekte na fenilne

prstenove, a njihov položaj na prstenu također utječe na steričke karakteristike i hidrofobnost dizajniranih molekula.²⁴

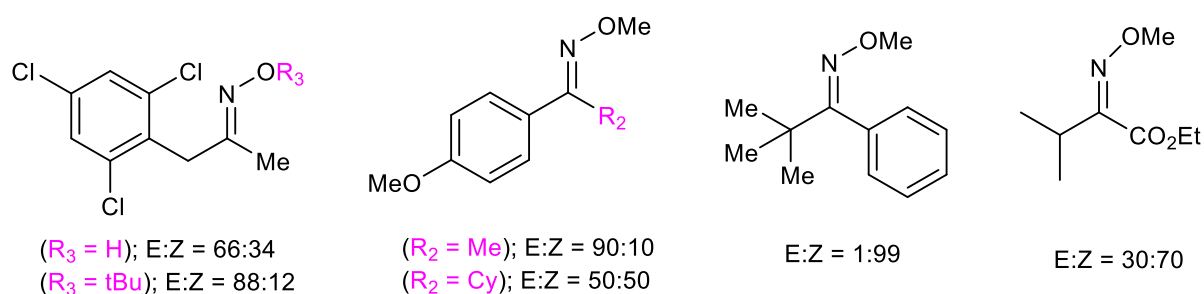
2.2.2. Sinteza etera oksima

Konvencionalna sinteza etera oksima obuhvaća kondenzaciju ketona s hidroksilaminom, *O*-supstituiranim analogom, tautomerizaciju nitrozo spojeva nastalih karbanionskom nitrozacijom ili redukcijom nitro prekursora (slika 5.).



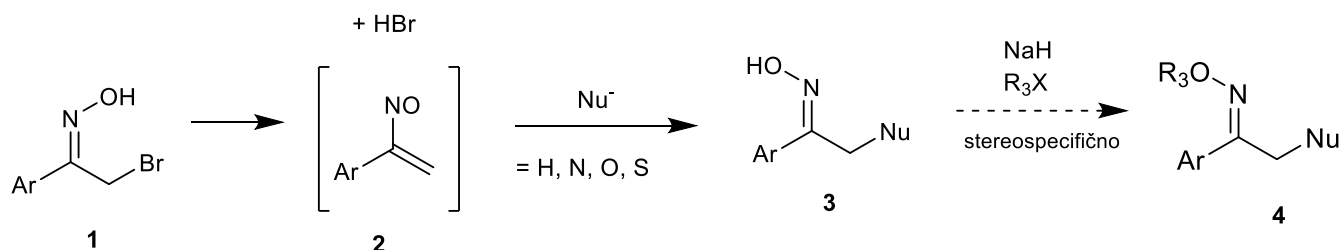
Slika 5. Shema konvencionalne sinteze oksima²⁵

Ovim sintetičkim pristupima obično nastaju E/Z diastereomerne smjese, a nastali omjer diastereoizomera ovisi o supstituentima oksima. Nekoliko primjera ovih smjesa u ovisnosti o supstituentima prikazano je na slici 6. Diastereoizomeri se mogu razdvojiti kolonskom kromatografijom ili (re)kristalizacijom. Zagrijavanje smjesa također se koristi kako bi se povećao sadržaj termodinamički stabilnijeg E izomera.²⁶ S druge strane, fotoeksitacija pod svjetlosnim zračenjem obično favorizira Z izomer.²⁷



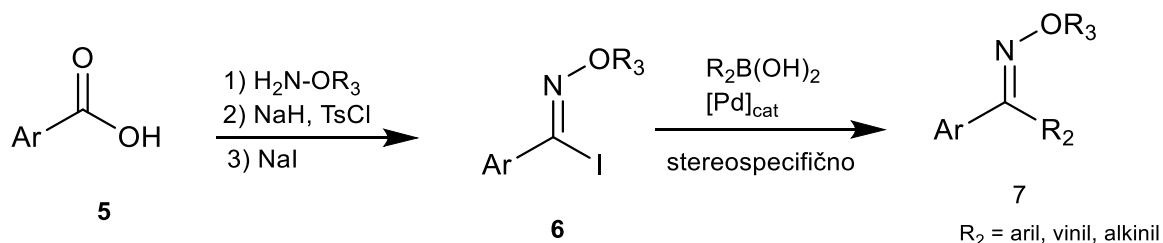
Slika 6. Prikaz ovisnosti omjera izomera o supstituentima²⁵

Metode za stereoselektivnu sintezu ketoksima slabo su opisane u literaturi. Neke od metoda opisane su u nastavku. Kaiser²⁸ je 1974. izvijestio o sintezi aril alkil *Z*-ketoksima (**4**) iz α -bromoacetofenona (**1**) (prikazano na slici 7). Ovaj spoj polako degradira i nastaje tvar (**2**) koja potom u reakciji s hidridom ili različitim nukleofilnim heteroatomima (N, O, S) daje odgovarajuće oksime s odličnom diastereoselektivnošću. Također je uočeno da O-alkilacijom spoja **3** mogu nastati derivati etera **4** bez detektirane izomerizacije.



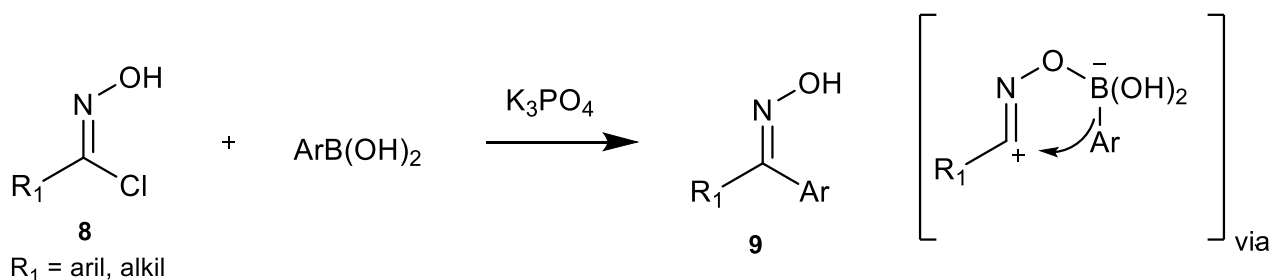
Slika 7. Shema stereoselektivne sinteze ketoksima (Kaiser)²⁵

Dolliver²⁹ i suradnici 2013. otkrili su komplementarni pristup sinteze stereodefiniranih ketoksima. S benzojevom kiselinom kao početnim reaktantom sintetiziran je aril-jodooksim kao *Z*-izomer (**6**, slika 8.). Potom se Suzukijevim unakrsnim sprežanjem omogućilo umetanje arila, vinila i alkinila kao supstituenata na stereospecifičan način te je kao produkt dobiven spoj **7** kao jedini geometrijski izomer.



Slika 8. Shema stereoselektivne sinteze ketoksima (Dolliver)²⁵

Nedavno su Song i suradnici (2019.)²⁵ opisali metodu kojom su *E/Z* smjese klorooksima izravno funkcionalizirane s aril boronskom kiselinom (slika 9.). Bazno potaknut 1,4-boronatni pomak dao je ketoksime (**16**) s izvrsnom diastereoselektivnosti. Sve tri opisane strategije ograničene su na najmanje jedan arilni supstituent.²⁵

Slika 9. Shema stereoselektivne sinteze ketoksima (Song)²⁵

2.3. Alzheimerova bolest i acetilkolinesteraza (AChE)

Alzheimerova bolest najčešći je uzrok demencije u starijoj populaciji koja vodi do sporog progresivnog nepovratnog narušavanja mentalne funkcije.³⁰ Mnogi faktori doprinose njezinoj patogenezi, uključujući nakupljanje amiloidnih plakova, neurofibrilarnih čvorova, gubitak neurona i sinapsa, oksidativni stres i smanjenje razine acetilkolina (ACh) (hipokampus i korteks).^{31–33}

Kolinergička hipoteza pretpostavlja da je smanjenje razine acetilkolina, neurotransmitera koji je ključan za memoriju i učenje, potencijalni uzrok Alzheimerove bolesti.³⁴ Kolin acetiltransferaza katalizira stvaranje acetilkolina transferom acetilne skupine s acetil-koenzima A do kolina, a acetilkolin se hidrolizira u kolin i octenu kiselinu pomoću kolinesteraza.³⁵ U kasnijim stadijima bolesti uočava se povećanje butirilkolinesteraze (BChE), što bi moglo služiti kao kompenzatorni mehanizam kako bi se nadoknadila smanjena AChE aktivnost.

Inhibitori acetilkolinesteraze prva su linija liječenja i najčešće su korišteni za usporavanje napredovanja simptoma u najranijim fazama Alzheimerove bolesti. Iako inhibitori acetilkolinesteraze nisu lijekovi koji mogu izliječiti ovu bolest, oni mogu usporiti proces mentalne deterioracije i smanjiti neuropsihijatrijske simptome.³⁰ Trenutno dostupni lijekovi usporavaju razvoj bolesti smanjenjem hidrolize acetilkolina.

Enzim acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) hidrolizira acetilkolin, pri čemu nastaju kolin i acetat. Reakcijom hidrolize dovršava se neurotransmisija. Naknadnom hidrolizom acetilirane AChE regenerira se enzim te se otpušta octena kiselina. Ovaj proces se odvija brzinom bliskom brzini difuzije ($10^3 - 10^4 \text{ s}^{-1}$), što je puno brže od bilo koje druge serinske hidrolaze. AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi. Budući da je AChE visoko specijaliziran enzim s fiziološke točke gledišta i ima značajnu ulogu u organizmu, velik je

prostor za istraživanje lijekova za bolesti koje su povezane s centralnim ili perifernim kolinergičkim deficitom, poput Alzheimerove bolesti, miastenije gravis, glaukoma i drugih.³⁶

2.4. Butirilkolinesteraza (BChE)

Osim AChE, butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8) je još jedan vrlo važan enzim odgovoran za hidrolizu acetilkolina. BChE pripada skupini esteraza, koji su dio serinskih hidrolaza.³⁷ Esteraze hidroliziraju tvari koje sadrže esterske, amidne i tioesterske veze.

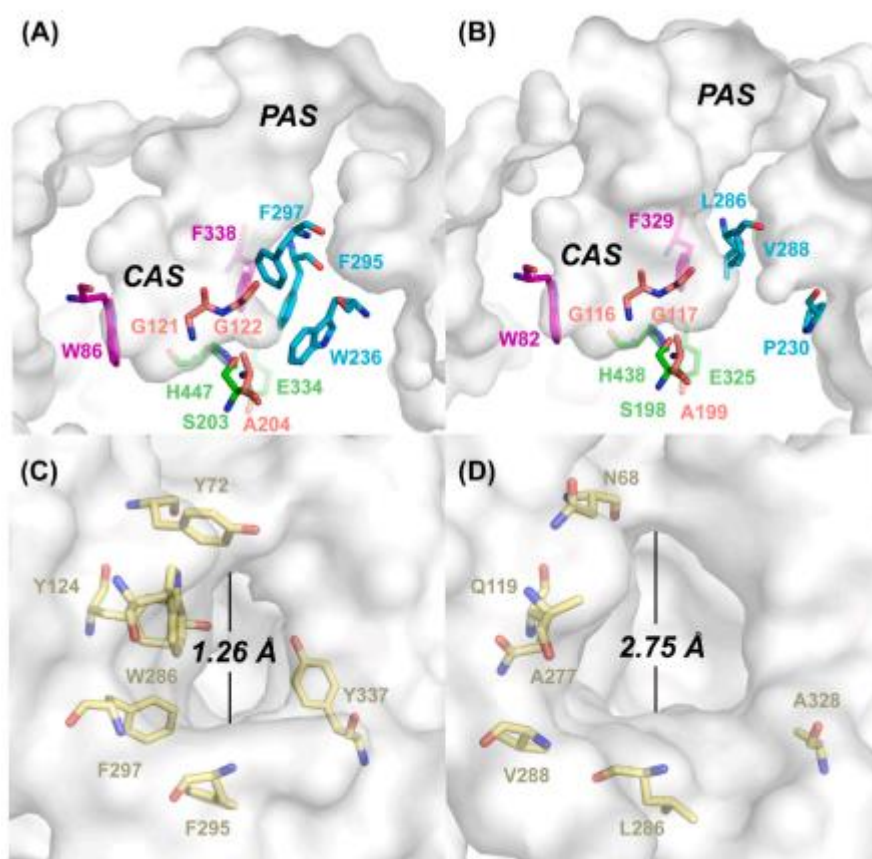
BChE i AChE imaju sličnu trodimenzijsku strukturu (90 % sličnosti)³⁸ te oko 54 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu, ali zamjena nekih aminokiselina u aktivnim mjestima rezultira drukčijom katalitičkom aktivnošću, specifičnosti za supstratom i selektivnosti.³⁹ Pretpostavlja se da je BChE potekla iz gena pretka AChE.

Uloge BChE su manje definirane od uloga AChE budući da specifični fiziološki supstrat za BChE još nije pronađen. Poznato je da hidrolizira sukcinilkolin i bambuterol, koji se koriste kao lijekovi za opuštanje mišića u anesteziologiji. Razine BChE su niske u sistemskim stanjima poput bolesti jetre, bubrega, pothranjenosti, zloćudnim bolestima i opeklinama.³⁷ Sudjeluje u prvoj fazi reakcije detoksikacije protiv prirodnih i egzogenih toksina. Isto tako, BChE može pomoći kod ovisnosti o drogama jer hidrolizira kokain u inaktivne tvari. Po novijim istraživanjima, otkriveno je da BChE ima ulogu u metabolizmu lipida.³⁵ U mozgu je BChE prisutna u glija stanicama blizu hipokampusa i amigdale.

Gen za BChE postoji u različitim oblicima života, uključujući beskralježnjake.⁴⁰ Koncentracije BChE premašuju one od AChE u većini tkiva, osim u mozgu i mišićima. Gen za BChE nalazi se na kromosomu 3 (3q26) te postoji u četiri molekularna oblika u plazmi. Tetramerni oblik obuhvaća gotovo 90 % ukupne aktivnosti kolinesteraze u plazmi.⁴¹ Volumen aktivnog mjesta ždrijela BChE veći je nego kod AChE. AChE ima 40 % više aromatskih aminokiselina, slika 10. Katalitička aktivnost BChE ovisi o stabilizaciji vodikovih veza. Pokazalo se da inhibitori dolaze do katalitičke šupljine zahvaljujući fleksibilnom ulazu u ždrijelo.⁴²

BChE se može naći u plućima, plazmi, mozgu i srcu. Najveće razine enzima mogu se naći u jetri, a potom u plazmi i mozgu. Aktivnost BChE uglavnom je pronađena u „tkivima prvog kontakta“, kao što su pluća, jetra, koža i krv. Ima ulogu u aktivaciji prolijekova i metaboliziranju lijekova u inaktivne forme.³⁷

S razvojem Alzheimerove bolesti, BChE djeluje kao dominantna kolinesteraza koja hidrolizira kolin, sa širom specifičnošću za supstrate, ali manjom katalitičkom učinkovitosti na acetilkolin u odnosu na AChE. Inhibicija aktivnosti AChE može dovesti do kolinergičke krize (pojava nuspojava poput mučnine, salivacije, paralize dišnog sustava, smrt kao krajnji ishod). Budući da ne izaziva ozbiljne kolinergičke nuspojave, inhibiranje BChE smatra se sigurnijim izborom od AChE. Osim toga, BChE koregulira kolinergičku transmisiju hidrolizirajući acetilkolin i potencijalno ometa tok Alzheimerove bolesti.³⁷ Iz tog razloga, potraga za visoko selektivnim i sigurnim inhibitorima ovog enzima sve više se istražuje u istraživanju lijekova za Alzheimerovu bolest.⁴³



Slika 10. Strukturna usporedba AChE i BChE. (A) Aktivni džep hAChE. Katalitička trijada (S203, H447, E334) prikazana zelenom bojom, aminokiseline u oksianionskoj šupljini (G121, G122, A204) crvenom, aminokiseline u acilnom džepu (W236, F295, F297) plavom i aminokiseline (W86, F338) kolinskog mjesta ljubičastom. (B) Aktivni džep hBChE. Katalitička trijada (S198, H438, E325) prikazana zelenom, aminokiseline u oksianionskoj šupljini (G116, G117, A199) crvenom, aminokiseline u acilnom džepu (P230, L286, V288) plavom i aminokiseline (W82, F329) kolinskog mjesta ljubičastom. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora.³⁵

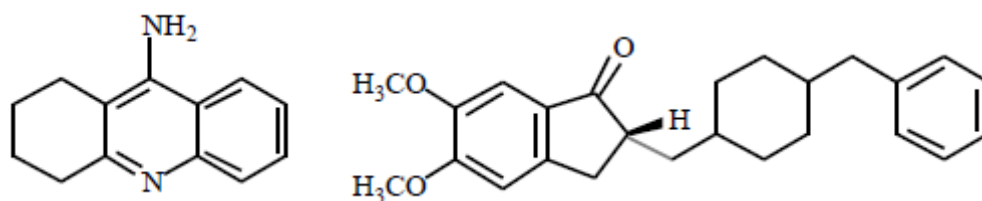
2.5. Inhibitori kolinesteraza

Inhibitori kolinesteraza mogu se klasificirati prema njihovoj farmakološkoj učinkovitosti u dvije skupine. U prvu skupinu spadaju neselektivni inhibitori kolinesteraza koji inhibiraju AChE (specifično hidrolizira acetilkolin) i BChE (nespecifično hidrolizira bilo koji ester kolina). Inhibitori kolinesteraze koji su više ili manje selektivni inhibiraju specifičnu AChE u manjim koncentracijama nego nespecifičnu BChE. Obje skupine mogu se dalje podijeliti na reverzibilne, pseudoireverzibilne i ireverzibilne inhibitore.

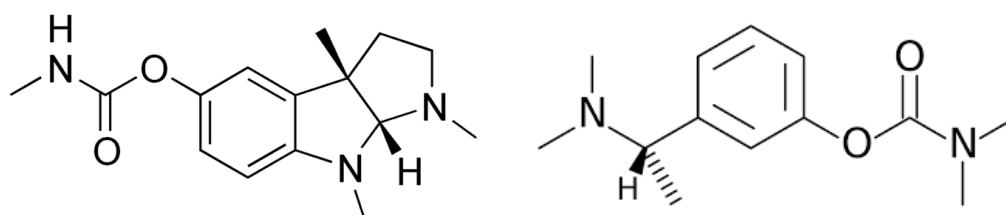
Reverzibilni inhibitori mogu biti kompetitivno zamijenjeni s aktivnog mjesta enzima s fiziološkim ligandima ili s drugim esterima kolina. Primjeri takvih inhibitora su neselektivni inhibitor takrina i selektivni inhibitor donepezil (prikazani na slici 11.).

Pseudoireverzibilni inhibitori čvršće su vezani za aktivni centar od estera kolina koji je regularno prisutan u aktivnom mjestu. Mnoge od ovih tvari su esteri kompleksnijih organskih kiselina poput derivata karbaminske kiseline, u kojima je hidroksilna skupina karbaminske kiseline zamijenjena s amino skupinom. U pseudoireverzibilne inhibitore spadaju neselektivni inhibitor fizostigmin i selektivni inhibitor rivastigmin (prikazani na slici 12.) koji pripadaju karbamatima, esterima karbaminske kiseline.

Ukoliko u aktivnom mjestu enzima sudjeluju esteri fosforne kiseline, inhibicija će biti ireverzibilna budući da se fosforilirano aktivno mjesto enzima ne može fiziološki defosforilirati. Aktivnost enzima može se obnoviti jedino zamjenom inhibiranog enzima novom biosintezom.⁴⁴



Slika 11. Strukture reverzibilnih inhibitora takrina i donepezila



Slika 12. Strukture pseudoireverzibilnih inhibitora fizostigmina i rivastigmina

2.5.1. Uporaba inhibitora acetilkolinesteraze kod Alzheimerove bolesti

Prva uporaba inhibitora AChE za liječenje Alzheimerove bolesti započinje 1979., kada su Peters i Levin proučavali kliničku učinkovitost fizostigmina.⁴⁵ Fizostigmin i neki drugi agensi imali su više potencijalnih rizika od koristi. Inhibicija AChE bila je vrlo ograničena, a selektivnost i prodiranje kroz krvno-moždanu barijeru ograničena. Međutim, daljnjim istraživanjima pronašli su se učinkovitiji inhibitori AChE, sa značajno poboljšanim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim profilom.

Inhibitori AChE koji su odobreni kao lijekovi za Alzheimerovu bolest u Europi su tetrahydroaminoakridin, derivat piperidina donepezil, karbamat rivastigmin i galantamin.⁴⁴

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Korišteni reagensi i otapala bili su analitičke čistoće: benzil-bromid (98%, *Sigma Aldrich*, Njemačka), metil-jodid (99%, *Sigma Aldrich*, Njemačka), *O*-(*tert*-butil)hidroksilamin hidroklorid (98 %, *BLD Pharmatech GmbH*, Njemačka), 3-brombenzil-bromid (99 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 3-fluorbenzil-bromid (99 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), kinuklidin-3-on hidroklorid (97 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 3-klorbenzil-bromid (97 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 3-metilbenzil-bromid (96 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 3-nitrobenzil-bromid (98%, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 4-brombenzil-bromid (98 %, *Merck*, Njemačka), 4-fluorbenzil-bromid (97 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 4-klorbenzil-bromid (97 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 4-metilbenzil-bromid (97 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka), 4-nitrobenzil-bromid (99 %, *Sigma Aldrich*, Njemačka).

Tijek reakcija i čistoća dobivenih produkta praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na aluminijskim pločicama silikagela (TLC Silica gel 60 F₂₅₄). Korišteni sustav otapala ovisio je o pojedinoj reakciji, a obuhvaćao je 5 %-tnu otopinu metanola u triklormetanu, sustav diklormetana i metanola u omjeru 9:1 te sustav triklormetana i metanola u omjeru 9:1. Spojevi su detektirani UV lampom i reverzibilnom adicijom joda.

Sintetizirani spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom (IR) i određivanjem tališta te im je struktura potvrđena spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Za snimanje 1D i 2D spektara NMR korišten je NMR spektrometar Bruker Avance II HD Ascend pri 400 MHz (¹H NMR) i 100 MHz (¹³C NMR), a kao otapalo deuterirani metanol. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS) prema kojem su izraženi kemijski pomaci (δ) u ppm, a konstante sprege (J) u Hertzima (Hz).

IR spektri snimljeni su pomoću FT-IR Perkin-Elmer spectrum Two spektrometra spektroskopijom ATR (eng. *Attenuated Total Reflection*) u području 4000-400 cm⁻¹.

Spektrometrijom masa pomoću sustava nanoUHPLC-MS/MSThermoScientific QEactive Plus potvrđena je struktura dobivenih spojeva.

Tališta sintetiziranih spojeva određena su pomoću uređaja Buchi Melting Point B-540 u otvorenim kapilarama.

3.2. Priprava *O*-*tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on-oksima (1)

U okruglu tikvicu (25 mL) stavi se kinuklidin-3-on hidroklorid (0,203 g, 1,25 mmol) i *O*-*tert*-butilhidroksilamin hidroklorid (0,174 g, 1,14 mmol) te se doda suhi etanol (10 mL). Reakcijska smjesa se zagrijava u uljnoj kupelji pri 80°C na magnetskoj miješalici pri 500 rpm. Nakon 26 sati zagrijavanja otapalo se upari na rotacijskom uparivaču uz snižen tlak. U tikvicu se doda 1 mL vode, a zatim se postepeno dodaje zasićena vodena otopina natrijeva karbonata dok se ne postigne pH~10. Potom se provede ekstrakcija s kloroformom (3 puta po 10 mL) te se organski sloj suši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Osušeni organski sloj se profiltrira preko vate, a otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiveni su bijeli kristali produkta **1** (0,224 g, 90 %), HRMS/+ESI: C₁₁H₂₁N₂O⁺ (197,1648 izračunato, 197,1649 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2944 (C-H), 2868 (C-H), 1191 (C-N), 1358 (C-N), 938 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 1,24 – 1,28 (m, 9 H, (CH₃)₃) 1,74 – 1,83 (m, 2 H, H5a, H7b) 1,83 – 1,94 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,57 (quin, *J* = 3,1 Hz, 1 H, H4) 2,77 – 2,88 (m, 2 H, H6a, H8b) 2,90 – 2,98 (m, 2 H, H6b, H8a) 3,54 (t, *J* = 1,5 Hz, 2 H, H2); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 27,1 (C5, C7) 27,9 ((CH₃)₃) 29,8 (C4) 49,7 (C6, C8) 52,9 (C2) 78,7 (C) 162,5 (C=N)

3.3. Sinteza kvaternih derivata *O*-*tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on oksima

3.3.1. Sinteza *N*-benzil-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (2)

U okruglu tikvicu dodan je spoj **1** (100 mg, 0,51 mmol) i benzil-bromid u 10 %-tnom suvišku (66,5 μL , 0,56 mmol) te su reaktanti otopljeni u suhom acetonu (700 μL). Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici na 560 rpm pri sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena TLC-om (diklormetan:metanol = 9:1). Talog se profiltrira preko sinter lijevka te se ispere s malo hladnog acetona, a potom sa suhim eterom. Dobiveni su bijeli kristali produkta **2** (0,116 g, 0,51 mmol, 62 %), *t*_f 203,7°C, HRMS/+ESI: C₁₈H₂₇N₂O⁺ (287,2118 izračunato, 287,2116 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2977-2959 (C-H), 1459 (-C₆H₅), 1364 (C-N), 1191 (C-N), 950 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,02 – 2,14 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,18 – 2,26 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,91 (quin, *J* = 3,1 Hz, 1 H, H4) 3,52 – 3,61 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,62 – 3,68 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,35 (s, 2 H, H2) 4,60 (s, 2 H, CH₂) 7,55 (s, 5 H, BzlH); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 24,6 (C5, C7) 27,7 ((CH₃)₃) 29,1 (C4) 56,1 (C6, C8) 58,9 (C2) 69,0 (CH₂) 80,6 (C) 128,1 (C1') 130,5 (C3', C5') 132,0 (C4') 134,2 (C2', C6') 151,1 (C=N)

3.3.2. Sinteza *N*-(*m*-brombenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**3**)

Spoj **3** pripremljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,114 g, 0,58 mmol) i *m*-brombenzil-bromida (0,160 g, 0,64 mmol) otopljenih u suhom acetonu (1,5 mL). Dobiven je spoj **3** (0,124 g, 0,58 mmol, 48 %), *t*_f 223,0 °C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆BrN₂O⁺ (365,1223 izračunato, 365,1223 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2966 (C-H), 1464 (-C₆H₅), 1571 (C=N), 1363 (C-N), 1191 (C-N), 951 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,03 – 2,13 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,18 – 2,27 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,92 (quin, *J* = 3,2 Hz, 1 H, H4) 3,53 – 3,69 (m, 4 H, H6, H8) 4,36 (s, 2 H, H2) 4,59 (s, 2 H, CH₂) 7,48 (t, *J* = 7,8 Hz, 1 H, H6') 7,55 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H, H5') 7,75 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H, H2') 7,77 – 7,81 (m, 1 H, H4'); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 24,6 (C5, C7) 27,7 (CH₃)₃) 29,0 (C4) 56,2 (C6, C8) 59,0 (C2) 68,0 (CH₂) 80,6 (C) 124,2 (C3') 130,4 (C1') 132,2 (C4') 133,0 (C6') 135,1 (C5') 137,0 (C2') 151,0 (C=N)

3.3.3. Sinteza *N*-(*p*-brombenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**4**)

Spoj **4** pripremljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,113 g, 0,58 mmol) i *p*-brombenzil-bromida (0,159 g, 0,64 mmol) otopljenih u 1,5 mL suhog acetona. Dobiven je spoj **4** (0,166 g, 65 %), *t*_f 233,7°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆BrN₂O⁺ (365,1223 izračunato, 365,1225 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2979 (C-H), 1595 (C=N), 1460 (-C₆H₅), 1191 (C-N), 1032 (C-N), 958 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,01 – 2,14 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,18 – 2,26 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,91 (quin, *J* = 3,1 Hz, 1 H, H4) 3,51 – 3,69 (m, 4 H, H6, H8) 4,35 (s, 2 H, H2) 4,57 (s, 2 H, CH₂) 7,46 – 7,52 (m, 2 H, H2', H6') 7,69 – 7,75 (m, 2 H, H3', H5'); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 24,6 (C5, C7) 27,7 ((CH₃)₃) 29,0 (C4) 56,1 (C6, C8) 59,0 (C2) 68,1 (CH₂) 80,6 (C) 126,5 (C4') 127,2 (C1') 133,7 (C2', C6') 136,0 (C3', C5') 151,0 (C=N)

3.3.4. Sinteza *N*-(*m*-metilbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**5**)

Spoj **5** pripremljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,100 g, 0,51 mmol) i *m*-metilbenzil-bromida (75,7 μ L, 0,56 mmol). Dobiven je spoj **5** (0,059 g, 0,51 mmol, 31 %), *t*_f 203,7°C, HRMS/⁺ESI: C₁₉H₂₉N₂O⁺ (301,2274 izračunato, 301,2274 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹: 2972 (C-H), 1610 (C=N), 1458 (-C₆H₅), 1366 (C-N), 1191 (C-N), 953 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,02 – 2,13 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,16 – 2,28 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,41 (s, 3 H, CH₃) 2,91 (quin, *J* = 3,2 Hz, 1 H, H4) 3,50 – 3,59 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,59 – 3,70 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,34 (s, 2 H, H2) 4,55 (s, 2 H, CH₂) 7,31 – 7,46 (m, 4 H, ArH'); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 21,3 (C5, C7) 24,6 ((CH₃)₃) 27,7 (C4) 29,1 (CH₃) 56,1 (C6, C8) 58,9 (C2) 69,1 (CH₂) 80,6 (C) 127,9 (C1') 130,3 (C6') 131,2 (C4') 132,6 (C5') 134,7 (C2') 140,7 (C3') 151,2 (C=N)

3.3.5. Sinteza *N*-(*p*-metilbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**6**)

Spoj **6** pripremljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,150 g, 0,77 mmol) i *p*-metilbenzil-bromida (0,156 g, 0,84 mmol) otopljenim u 2 mL suhog acetona. Dobiven je spoj **6** (0,237 g, 0,62 mmol, 81 %), *t*_f 221,1°C, HRMS/⁺ESI: C₁₉H₂₉N₂O⁺ (301,2274 izračunato, 301,2275 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2971 (C-H), 1616 (C=N), 1443 (C₆H₅), 1361 (C-N), 1190 (C-N), 954 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,02 – 2,14 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,16 – 2,27 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,40 (s, 3 H, CH₃) 2,90 (quin, *J* = 3,1 Hz, 1 H, H4) 3,50 – 3,58

(m, 2 H, H6a, H8b) 3,60 – 3,68 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,32 (s, 2 H, H2) 4,55 (s, 2 H, CH₂) 7,36 (m, $J = 8,1$ Hz, 2 H, H3', H5') 7,43 (m, $J = 8,1$ Hz, 2 H, H2', H6'); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 21,3 (C5, C7) 24,6 ((CH₃)₃) 27,7 (C4) 29,1 (CH₃) 56,0 (C6, C8) 58,8 (C2) 68,9 (CH₂) 80,5 (C) 125,0 (C1') 131,1 (C2', C6') 134,1 (C3', C5') 142,6 (C4') 151,2 (C=N)

3.3.6. Sinteza *N*-(*m*-nitrobenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**7**)

Spoj **7** pripremljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,164 g, 0,84 mmol) i *m*-nitrobenzil-bromida (0,199 g, 0,92 mmol) otopljenih u 2 mL suhog acetona. Dobiven je spoj **7** (0,303 g, 0,73 mmol, 88 %), t_f 221,2°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆N₃O₃⁺ (332,1969 izračunato, 332,1969 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2970 (C-H), 1531 (NO₂), 1351 (C-N), 1194 (C-N), 952 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 1,37 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,13 – 2,22 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,30 – 2,37 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,99 – 3,05 (m, 1 H, H4) 3,68 – 3,75 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,81 3,77 – 3,84 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,53 (s, 2 H, H2) 4,87 (s, 2 H, CH₂) 7,87 – 7,94 (m, 1 H, H6') 8,10 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H5') 8,52 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, H4') 8,58 (s, 1 H, H2'); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ ppm: 24,6 (C5, C7) 27,7 ((CH₃)₃) 29,0 (C4) 56,3 (C6, C8) 59,1 (C2) 67,5 (CH₂) 80,6 (C) 126,7 (C4') 128,9 (C2') 130,0 (C1') 131,9 (C5') 140,3 (C6') 150,0 (C3') 150,9 (C=N)

3.3.7. Sinteza *N*-(*p*-nitrobenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**8**)

Spoj **8** pripremljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,108 g, 0,55 mmol) i *p*-nitrobenzil-bromida (0,131 g, 0,61 mmol) otopljenih u 1,5 mL suhog acetona. Dobiven je spoj **8** (0,064 g, 0,16 mmol, 29 %), t_f 211,1°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆N₃O₃⁺ (332,1969 izračunato, 332,1969 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2970 (C-H), 1608 (C=N), 1532-1514 (NO₂), 1458 (-C₆H₅), 1358 (C-N), 1191 (C-N), 954 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ /ppm: 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,09 (br. s., 2 H, H5a, H7b) 2,24 (br. s., 2 H, H5b, H7a) 2,93 (br. s., 1 H, H4) 3,63 (br. s., 2 H, H6a, H8b) 3,66 – 3,78 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,43 (br. s., 2 H, H2) 4,76 (s, 2 H, CH₂) 7,85 (m, $J = 8,3$ Hz, 2 H, H2', H6') 8,38 (m,

$J = 8,1$ Hz, 2 H, H3', H5'); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 24,6 (C5, C7) 27,7 (CH₃)₃ 29,0 (C4) 56,4 (C6, C8) 59,2 (C2) 67,4 (CH₂) 80, 7 (C) 125,2 (C3', C5') 134,8 (C4') 135,7 (C2', C6') 150,8 (C=N)

3.3.8. Sinteza *N*-(*m*-klorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**9**)

Spoj **9** pripravljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,143 g, 0,73 mmol) i *m*-klorbenzil-bromida (0,105 mL, 0,80 mmol) otopljenih u 1,5 mL suhog acetona. Dobiven je produkt **9** (0,293 g, 0,73 mmol, 92 %), t_f 221,2°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆ClN₂O⁺ (321,1728 izračunato, 321,1730 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2964 (C-H), 1574 (C=N), 1463 (-C₆H₅), 1363 (C-N), 1191 (C-N), 951 (N-O)

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 1,26 – 1,30 (m, 9 H, (CH₃)₃) 2,02 – 2,13 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,18 – 2,29 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,92 (quin, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H4) 3,53 – 3,63 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,63 – 3,72 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,38 (s, 2 H, H2) 4,62 (s, 2 H, CH₂) 7,49 – 7,63 (m, 3 H, HAr') 7,64 – 7,67 (m, 1 H, H2'); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 24,6 (C5, C7) 27,7 (CH₃)₃ 29,0 (C4) 56,2 (C6, C8) 59,1 (C2) 68,0 (CH₂) 80,6 (C) 130,2 (C1') 132,0 (C6') 132,1 (C4') 132,6 (C2') 134,1 (C5') 136,2 (C3') 151,0 (C=N)

3.3.9. Sinteza *N*-(*p*-klorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**10**)

Spoj **10** pripravljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,142 g, 0,72 mmol) i *p*-klorbenzil-bromida (0,163 g, 0,79 mmol) otopljenih u 1,5 mL suhog acetona. Dobiven je produkt **10** (0,242 g, 0,60 mmol, 84 %), t_f 234,1°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆ClN₂O⁺ (321,1728 izračunato, 321,1729 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2978 (C-H), 1600 (C=N), 1459 (-C₆H₅), 1366 (C-N), 1195 (C-N), 1034 (C-N), 957 (N-O)

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,02 – 2,12 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,18 – 2,28 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,91 (quin, $J = 3,1$ Hz, 1 H, H4) 3,51 – 3,61 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,61 – 3,71 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,36 (s, 2 H, H2) 4,61 (s, 2 H, CH₂) 7,56 (s, 4 H, ArH'); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD- d_4) δ /ppm: 24,6 (C5, C7) 27,7 (CH₃)₃ 29,1 (C4) 56,1 (C6, C8) 58,9 (C2) 68,0 (CH₂) 80,6 (C) 126,8 (C1') 130,6 (C3', C5') 135,8 (C2', C6') 138,3 (C4') 151,0 (C=N)

3.3.10. Sinteza *N*-(*m*-fluorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**11**)

Spoj **11** pripravljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,142 g, 0,73 mmol) i *m*-fluorbenzil-bromida (0,098 mL, 0,80 mmol) otopljenih u 1,5 mL suhog acetona. Dobiven je produkt **11** (0,213 g, 0,55 mmol, 76 %), t_f 209,4°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆FN₂O⁺ (305,2024 izračunato, 305,2023 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2965-2886 (C-H), 1616 (C=N), 1453 (-C₆H₅), 1362 (C-N), 1262 (C-N), 1190 (C-N), 952 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,03 – 2,13 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,19 – 2,29 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,92 (quin, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H4) 3,53 – 3,62 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,62 – 3,73 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,38 (s, 2 H, H2) 4,63 (s, 2 H, CH₂) 7,29 – 7,42 (m, 3 H, ArH') 7,58 (m, 1 H, H5'); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 24,6 (C5, C7) 27,7 ((CH₃)₃) 29,0 (C4) 56,2 (C6, C8) 59,1 (C2) 68,1 (CH₂) 80,6 (C) 118,9 (d, $J = 21,5$ Hz, C4') 120,96 (d, $J = 22,2$ Hz, C2') 130,2 (d, $J = 2,7$ Hz, C6') 130,4 (d, $J = 7,3$ Hz, C1') 132,4 (d, $J = 8,7$ Hz, C5') 151,0 (C=N) 164,2 (d, $J = 246,8$ Hz, C3')

3.3.11. Sinteza *N*-(*p*-fluorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**12**)

Spoj **12** pripravljen je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,140 g, 0,71 mmol) i *p*-fluorbenzil-bromida (0,148 g) otopljenih u 1,5 mL suhog acetona. Dobiven je produkt **12** (0,229 g, 0,59 mmol, 84 %), t_f 234,2°C, HRMS/⁺ESI: C₁₈H₂₆FN₂O⁺ (305,2024 izračunato, 305,2023 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2976-2958 (C-H), 1602 (C=N), 1462 (-C₆H₅), 1364 (C-N), 1222 (C-N), 1190 (C-N), 1049 (C-N), 949 (N-O)

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 1,28 (s, 9 H, (CH₃)₃) 2,02 – 2,14 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,18 – 2,29 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,91 (quin, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H4) 3,53 – 3,59 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,60 – 3,69 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,35 (s, 2 H, H2) 4,61 (s, 2 H, CH₂) 7,25 – 7,32 (m, 2 H, H3', H5') 7,57 – 7,64 (m, 2 H, H2', H6'); **¹³C NMR** (101 MHz, MeOD-*d*₄) δ/ppm : 24,6 (C5, C7) 27,7 ((CH₃)₃) 29,1 (C4) 56,0 (C6, C8) 58,8 (C2) 68,0 (CH₂) 80,6 (C) 117,4 (d, $J = 22,5$ Hz, C3', C5') 124,3 (d, $J = 3,5$ Hz, C1') 136,5 (d, $J = 8,8$ Hz, C2', C6') 151,0 (C=N) 165,6 (d, $J = 248,9$ Hz, C4')

3.3.12. Sinteza *N*-metil-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (**13**)

Spoj **13** pripremljen je reakcijom metil-jodida (61,3 μ L, 0,66 mmol) i spoja **1** (0,117 g, 0,60 mmol) otopljenog u 1,5 mL suhog acetona. Okrugla tikvica omota se aluminijskom folijom kako bi se zaštitila od svjetlosti. Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici 48 sati pri sobnoj temperaturi. Talog je filtriran preko sinter lijevka i ispran samo sa suhim eterom. Dobiven je produkt **13** (0,173 g, 86 %), t_b 203,7°C, HRMS/+ESI: $C_{12}H_{23}N_2O^+$ (211,1805 izračunato, 211,1804 dobiveno).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2970 (C-H), 1459 ($-C_6H_5$), 1362 (C-N), 1189 (C-N), 1032 (C-N), 949 (N-O)
 ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ/ppm : 1,29 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$) 2,04 – 2,16 (m, 2 H, H5a, H7b) 2,22 – 2,32 (m, 2 H, H5b, H7a) 2,94 (quin, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H4) 3,16 (s, 3 H, CH_3) 3,51 – 3,62 (m, 2 H, H6a, H8b) 3,64 – 3,74 (m, 2 H, H6b, H8a) 4,39 (t, $J = 1,5$ Hz, 2 H, H2); **^{13}C NMR** (101 MHz, MeOD- d_4) δ/ppm : 24,7 (C5, C7) 27,7 ($(\text{CH}_3)_3$) 28,2 (C4) 52,5 (CH_3) 58,6 (C6, C8) 61,1 (C2) 80,5 (C), 151,3 (C=N)

3.4. Inhibitorna aktivnost sintetiziranih spojeva

Za ispitivanje inhibitorne aktivnosti korišten je enzim butirilkoliesteraza iz konjskog seruma (BChE, EC 3.1.1.8.), koji je komercijalno dostupan (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Njemačka) te nije dodatno pročišćen.

Reagensi korišteni u ovom eksperimentu su: acetiltiokolin-jodid (ATCh, 99 %, *Sigma-Aldrich*, Njemačka), dinatrijev fosfat (99 %, *Honeywell Fluka*, Njemačka), 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB, 99 %, *Sigma-Aldrich*, Njemačka), mononatrijev fosfat (97 %, *Sigma-Aldrich*, Njemačka).

Eksperimenti su provedeni pri 25°C u fosfatnom puferu (pH 7,4), uz acetiltiokolin-jodid kao supstrat. Enzimsku aktivnost mjerila se pomoću Ellmanove metode uz DTNB. Spektroskopska mjerenja izvedena su na uređaju Molecular Devices SpectraMax iD3Multi-Mode Microplate Reader pri $\lambda = 414$ nm. U tablici 2. navedeni su svi reagensi koji su korišteni za mjerenje inhibitorne aktivnosti.

Tablica 2. Korišteni reagensi za mjerenje inhibitorne aktivnosti i potrebne količine

| reagens | otopina | koncentracija | V jažice (μL) |
|---------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| DTNB | 26,15 mg u 10 mL pufera | $0,33 \text{ mmol dm}^{-3}$ | 15 |
| BChE | 1,00 mg u 10 mL pufera | $0,10 \text{ mg cm}^{-3}$ | 50 |
| ATCh | 39,55 mg u 10 mL vode | $1,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ | 50 |
| pufer | fosfatni pufer (pH = 7,4) | | 165 |
| spojevi | 50,00 mM | različite koncentracije | 20 |

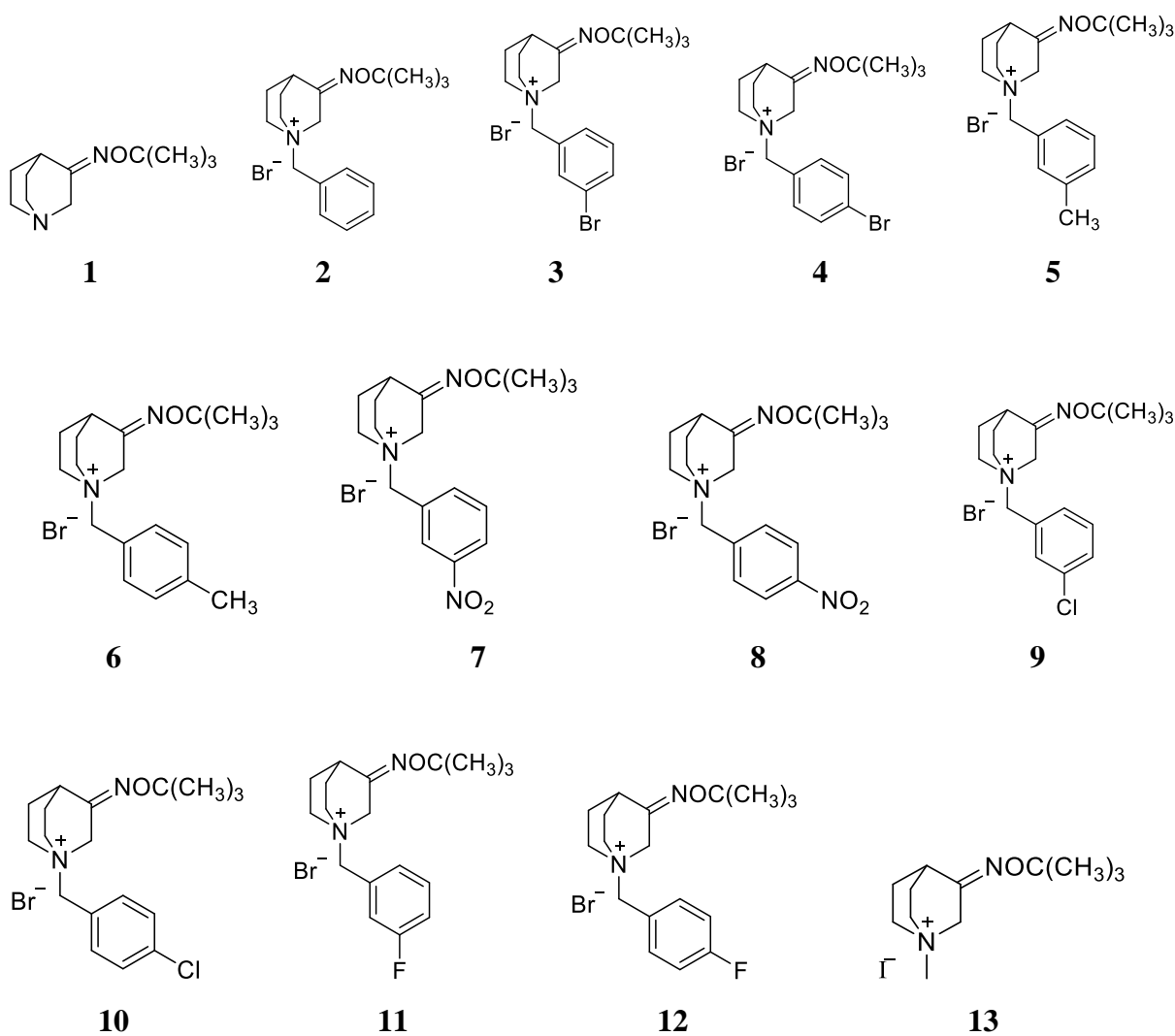
Aktivnost enzima počela se mjeriti dodatkom supstrata, a kontrolna reakcija je bila bez dodanog inhibitora. Tijek enzimske reakcije praćen je kroz 5 minuta dodatkom supstrata.

Iz eksperimentalnih podataka za svaku koncentraciju inhibitora izračunat je postotak enzimske aktivnosti kao omjer konstante brzine reakcije s inhibitorom i konstante brzine reakcije bez inhibitora. Graf ovisnosti postotka izmjerene enzimske aktivnosti o $\log_{10}[\text{I}]$ korišten je za određivanje vrijednosti IC_{50} .

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

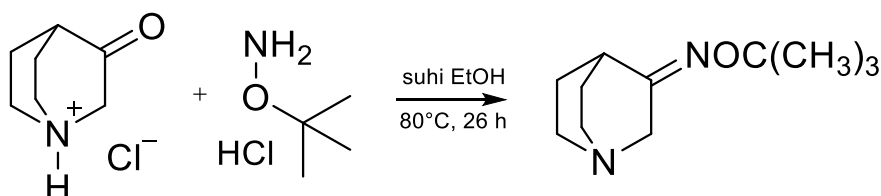
U sklopu ovog diplomskog rada sintetiziran je *O*-*tert*-butilni eter kinuklidin-3-on oksima (**1**). Iz oksima **1** pripravljena je serija od 12 kvaternih derivata (**2-13**). Na slici 12. prikazane su strukture svih pripremljenih spojeva. Svim spojevima određen je inhibitorski potencijal prema butirilkolinesterazi iz konjskog seruma (EC 3.1.1.8).



Slika 13. Struktura spojeva 1-13

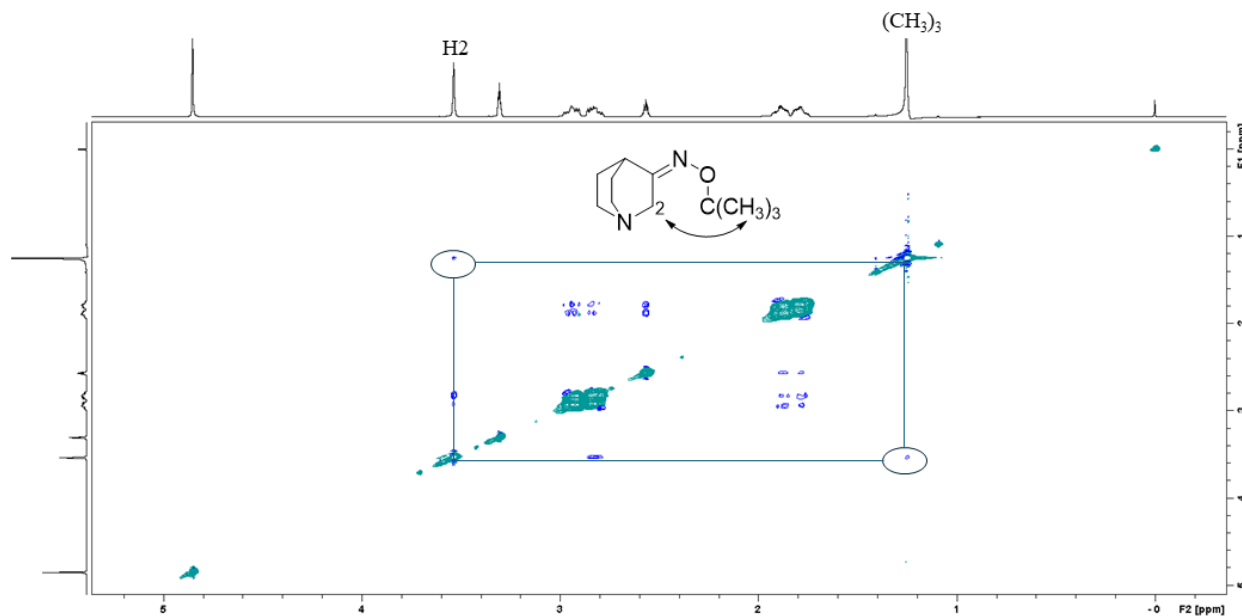
4.2. Priprava *O*-*tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on oksima

Reakcijom hidroklorida kinuklidin-3-on-hidroklorida i *O*-*tert*-butilhidroksilamina u suhom etanolu nastaje *O*-*tert*-butilni eter kinuklidin-3-on oksima (**1**, slika 14). Zaluživanjem nastalog produkta (dodatkom zasićene vodene otopine natrijeva karbonata) dolazi do deprotoniranja kinuklidinskog dušika. Ekstrakcijom s kloroformom, a potom sušenjem na bezvodnom natrijevom sulfatu dobiva se bijeli prah produkta **1** s iskorištenjem od 90 %.



Slika 14. Reakcija priprave *O*-*tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on-oksima (spoj **1**)

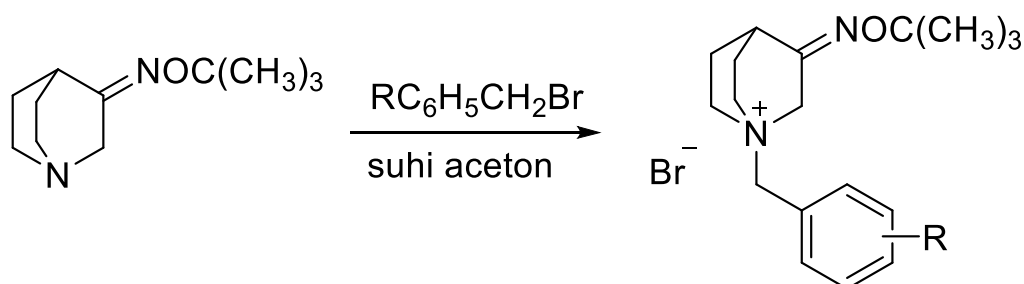
S obzirom da je u reakciji moguć nastanak *syn* ili *anti* izomer oksima, snimljen je NOESY spektar spoja **1** kako bi se odredila konfiguracija pripremljenog oksima. Iz NOESY spektra spoja **1** uočavaju se interakcije između *tert*-butilne skupine oksima i protona na položaju 2, što upućuje na nastanak *anti* izomera spoja **1**, slika 15.



Slika 15. NOESY spektar spoja **1**

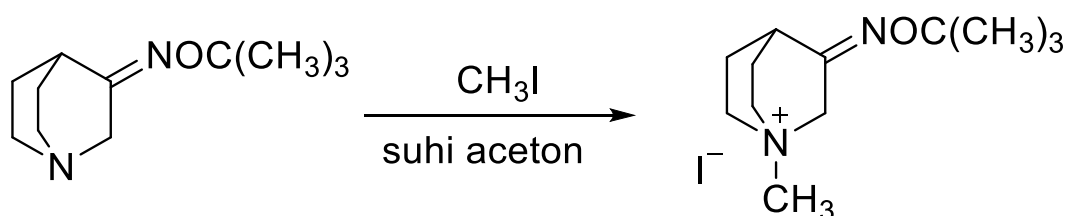
4.3. Sinteza kvaternih derivata *O-tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on oksima

Reakcijom *O-tert*-butilnog etera kinuklidin-3-on oksima (**1**) s različito supstituiranim benzil-bromidima (slika 16.) te s metil-jodidom (slika 17.) u suhom acetonu pri sobnoj temperaturi pripremljeni su kvaterni derivati **2** – **13** spoja **1**. Iskorištenja kvaternih derivata prikazana su na Slici 16.



| spoj | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------|----------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| R | H | <i>m</i> -Br | <i>p</i> -Br | <i>m</i> -CH ₃ | <i>p</i> -CH ₃ | <i>m</i> -NO ₂ | <i>p</i> -NO ₂ | <i>m</i> -Cl | <i>p</i> -Cl | <i>m</i> -F | <i>p</i> -F |
| η (%) | 62 | 48 | 65 | 31 | 81 | 88 | 29 | 92 | 84 | 76 | 84 |

Slika 16. Shema sinteze kvaternih derivata spoja **1** s različito supstituiranim benzil-bromidima (spojevi **2-12**) s pripadajućim iskorištenjima



13

Slika 17. Shema sinteze spoja **13**

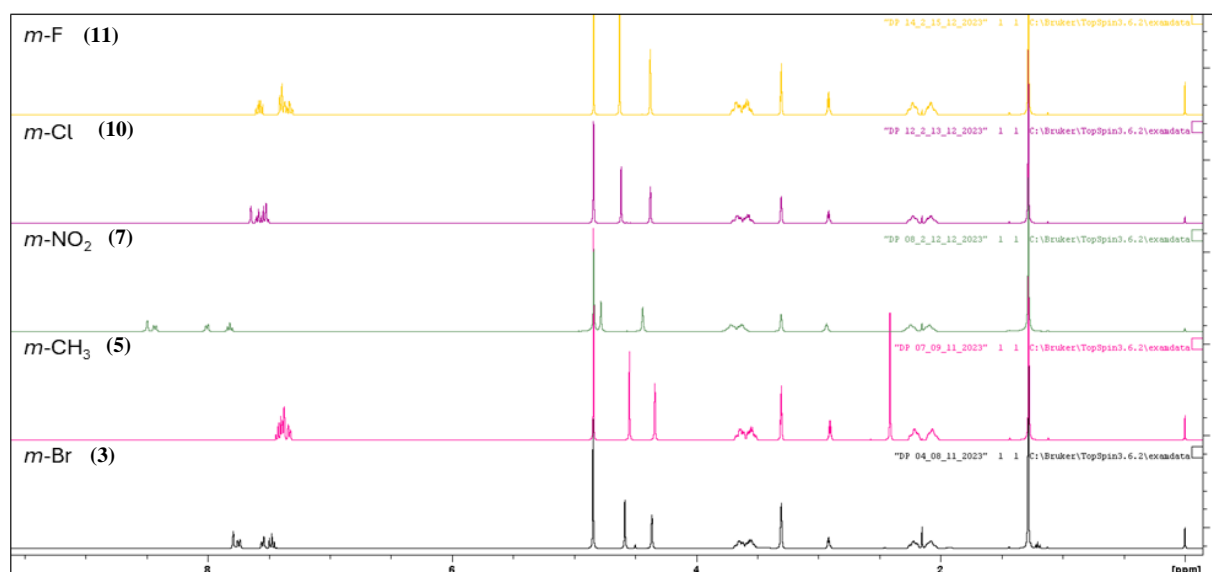
4.4. Spektroskopska karakterizacija spojeva

4.4.1. Spektroskopija NMR

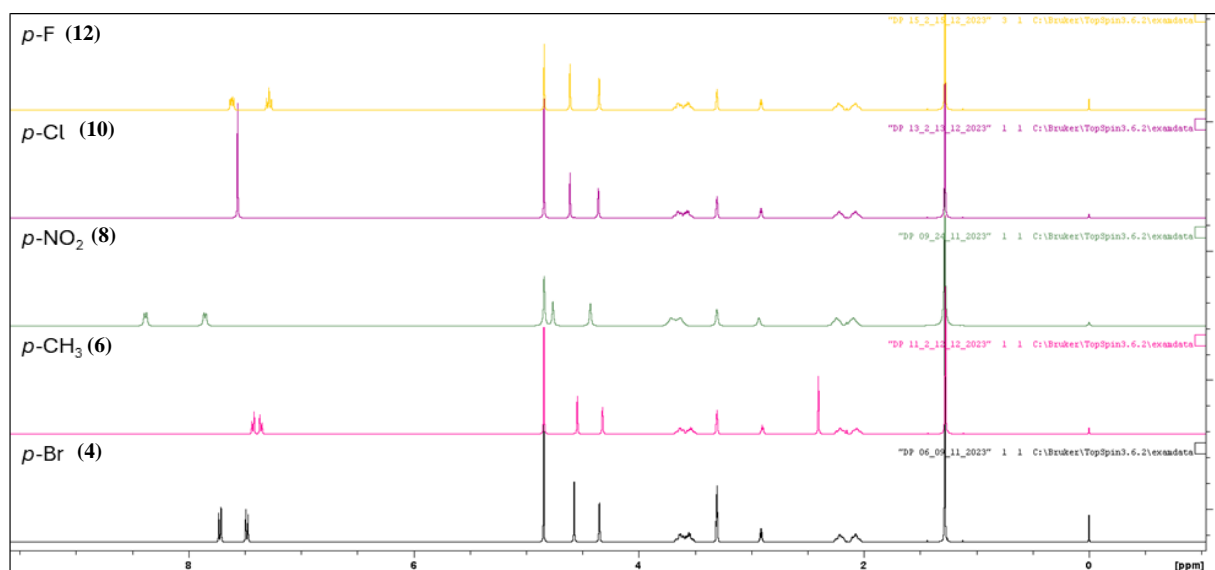
Spektroskopija NMR (engl. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) je analitička metoda koja se koristi za istraživanje strukture molekula. NMR se koristi za proučavanje jezgara koje imaju neparan atomski ili maseni broj, a ¹H NMR i ¹³C NMR se najčešće koriste u organskoj

kemiji jer su vodik i ugljik glavne komponente organskih tvari. Za poboljšanje i pojednostavljenje spektara dobivenih ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom koriste se različite tehnike poput ^{13}C NMR izvan rezonancije (engl. *off-resonance*) i tehnika DEPT (engl. *Distortionless enhancement by polarization transfer*).⁴⁶ Kombinacijom jednodimenzijskih (1D) i dvodimenzijskih (2D) tehnika može se odrediti struktura manjih molekula. U ^1H NMR spektroskopiji se promatraju signali neekvivalentnih protona u molekuli, a broj protona proporcionalan je omjeru površina ispod pojedinih signala. 2D tehnike koje su korištene u ovom istraživanju bile su COSY i NOESY. COSY (engl. *correlated spectroscopy*) je homonuklearna dvodimenzijska tehnika koja se koristi za opis interakcija spinova protona koji su udaljeni dvije ili tri kemijske veze. NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect*) je dvodimenzijska tehnika koja detektira spin-spin interakcije koje se odvijaju kroz prostor te tako omogućuje procjenu međusobne udaljenosti spinova koji su u interakciji te potvrdu konfiguracije spojeva.⁴⁷

Struktura svih pripremljenih spojeva potvrđena je s ^1H i ^{13}C 1D i 2D tehnikama NMR. Kod svih pripremljenih spojeva, signali protona kinuklidinskog prstena pojavljuju se kao multiplieti s kemijskim pomakom između 2,0-3,7 ppm dok se signali protona H4 nalaze pri kemijskom pomaku od 2,9 ppm i sprežu se u kvintet s konstantom sprege od 3,1 Hz. Signali protona *tert*-butilne skupine pojavljuju se kao singlet pri kemijskom pomaku od 1,2 ppm. ^1H NMR spektri pripremljenih kvaternih derivata razlikuju se samo u kemijskom pomaku signala protona supstituiranog benzenskog prstena, slika 18. i slika 19. Izuzetak su spojevi **7** i **8** koji na benzenskom prstenu sadrže nitro skupinu te se signali tih aromatskih protona nalaze pri višem kemijskom pomaku nego kod ostalih pripremljenih kvaternih derivata.



Slika 18. ^1H NMR spektri spojeva **11**, **10**, **7**, **5** i **3** s *meta* supstituentom na benzenskom prstenu

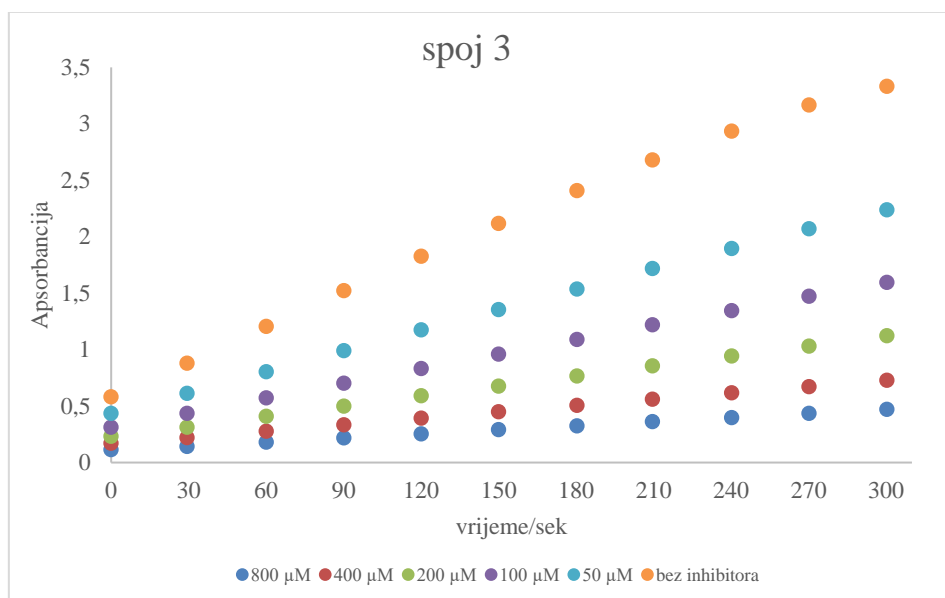


Slika 19. ^1H NMR spektri spojeva **12**, **10**, **8**, **6** i **4** s *para* supstituentom na benzenskom prstenu

4.5. Inhibitorna aktivnost pripremljenih spojeva

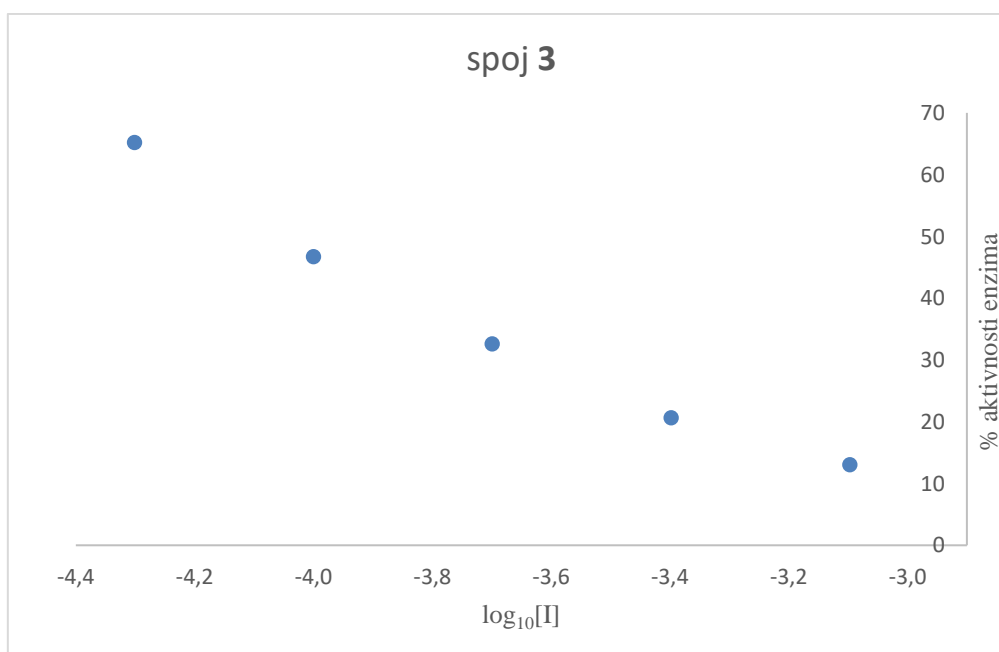
U ovom radu određena je moć inhibicije pripremljenih spojeva **1-13** prema enzimu butirilkolinesterazi uporabom Ellmanove metode.⁴⁸

Brzina reakcije za svaku koncentraciju korištenu u testu izračunata je kao postotak neinhibirane reakcije kao što je prikazano na slici 20. za spoj **3**.



Slika 20. Reprezentativni prikaz vremenski ovisne inhibicije BChE inhibirane spojem 3

Nagib pravca predstavlja opaženu konstantu inhibicije prvog reda. Omjer konstante brzine reakcije s inhibitorom i konstante brzine reakcije bez inhibitora daje postotak izmjerene enzimske aktivnosti. Iz grafa ovisnosti postotka izmjerene enzimske aktivnosti i $\log_{10}[\text{I}]$ određena je IC_{50} vrijednost (slika 21.).



Slika 21. Postotak izmjerene enzimske aktivnosti u ovisnosti o $\log_{10}[\text{I}]$ za spoj 3

Svim spojevima određene su IC_{50} vrijednosti, tablica 3. Nesupstituirani oksim **1** pokazao je inhibitornu aktivnost prema BChE s IC_{50} od $274,3 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Kvaternizacija kinuklidinskog dušika spoja **1** benzilnom skupinom ne utječe značajno na inhibitornu aktivnost prema BChE u usporedbi sa nesupstituiranim oksimom. Uvođenje supstituenta na benzenski prsten različito utječe na afinitet prema BChE. Spoj **5**, koji sadrži metilnu skupinu u *meta* položaju na benzenskom prstenu pokazao je najveći afinitet prema BChE s IC_{50} od $49,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Spojevi **7** i **8**, koji sadrže nitro skupinu na benzenskom prstenu pokazali su slabiji afinitet prema BChE nego nesupstituirani oksim kao i spojevi **11** i **12**, sa atomom fluora na benzenskom prstenu. Svi pripremljeni spojevi koji sadrže supstituente na benzenskom prstenu u *meta* položaju pokazali su jači afinitet prema BChE nego njihovi analozi sa supstituentima u *para* položaju. Najmanji afinitet prema BChE pokazao je spoj **13**, u kojemu je kinuklidinski atom dušika kvaterniziran s metilnom skupinom.

Tablica 3. IC_{50} vrijednosti reakcije inhibicije BChE za spojeve **1-13**.

| spoj | $IC_{50} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ |
|-----------|-----------------------------------|
| 1 | $274,3 \pm 22,4$ |
| 2 | $227,1 \pm 7,0$ |
| 3 | $86,7 \pm 9,4$ |
| 4 | $137,5 \pm 14,7$ |
| 5 | $49,2 \pm 2,6$ |
| 6 | $115,7 \pm 10,9$ |
| 7 | $454,9 \pm 31,5$ |
| 8 | $808,8 \pm 84,7$ |
| 9 | $133,3 \pm 4,6$ |
| 10 | $222,6 \pm 17,3$ |
| 11 | $379,6 \pm 25,4$ |
| 12 | $388,3 \pm 13,2$ |
| 13 | $1900 \pm 1,2$ |

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu sintetiziran je *O-tert*-butilni eter kinuklidin-3-ona (**1**) i njegovi kvaterni derivati: *N*-benzil-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**2**), *N*-(*m*-brombenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**3**), *N*-(*p*-brombenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**4**), *N*-(*m*-metilbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**5**), *N*-(*p*-metilbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**6**), *N*-(*m*-nitrobenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**7**), *N*-(*p*-nitrobenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**8**), *N*-(*m*-klorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**9**), *N*-(*p*-klorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**10**), *N*-(*m*-fluorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**11**), *N*-(*p*-fluorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**12**) i *N*-metil-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (**13**).

Reakcijom kinuklidin-3-ona i *O-tert*-butilhidrokislamin-hidroklorida sintetiziran je spoj **1**. Kvaternizacijom spoja **1** s različito supstituiranim benzil-bromidima u *meta* i *para* položaju te metil-jodidom pripremljeni su odgovarajući kvaterni derivati (**2-13**). Svi spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom, 1D i 2D spektroskopijom NMR, spektrometrijom masa te određivanjem tališta.

Pripremljenim spojevima određena je inhibitorna aktivnost prema butirilkolinesterazi iz konjskog seruma (BChE, EC 3.1.1.8.). Raspon IC₅₀ vrijednosti kretao se u rasponu od 49,2 μmol dm⁻³ do 1,90 mmol dm⁻³. Najbolju inhibitornu aktivnost pokazali su spojevi **3** i **5**, koji sadrže atom broma odnosno metilnu skupinu u *meta* položaju na benzenskom prstenu, s IC₅₀ vrijednostima od 86,7 μmol dm⁻³ i 49,2 μmol dm⁻³.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACh – acetilkolin

AChE – acetilkolinesteraza

ATR – prigušena totalna refleksija (engl. *Attenuated Total Reflectance*)

BChE – butirilkolinesteraza

HRMS – spektrometrija masa visoke razlučivosti (engl. *High resolution mass spectrometry*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear magnetic resonance*)

IR – infracrvena spektroskopija

ppm – dijelovi na milijun (engl. *parts per million*)

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-layer chromatography*)

TMS – tetrametilsilan

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. A.L. Calderon-Garcidueñas, C. Duyckaerts, *Handb. Clin. Neurol.* **145** (2018) 325–337.
2. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (19.7.2024.)
3. P.T. Francis, *CNS Spectr.* **10** (2005) 6–9.
4. S. Žunec, D. Vadlja, A. Ramić, A. Zandona, N. Maraković, I. Brekalo, I. Primožič, M. Katalinić, *Int. J. Mol. Sci.* **25** (2024) 155.
5. R. Baker, L.J. Street, A.J. Reeve, J. Saunders, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991) 760–762.
6. D. Ferri, T. Bürgi, A. Baiker, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (2002) 437–441.
7. R. Odžak, M. Šprung, B. Soldo, M. Skočibušić, M. Gudelj, I. Primožič, *Open Chem.* **15** (2017) 320–331.
8. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **67** (1945) 860–874.
9. Chen Chang By, R. P. Evstigneeva, and N. A. Preobrazhenskii, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **123** (1958) 707.
10. J. Burgers, M.A. Hoefnagel, P.E. Verkade, H. Visser, B.M. Wepster, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **77** (1958) 491–530.
11. B.M. Wepster, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **71** (1952) 1159–1170.
12. L.N. Yakhontov, *Adv. Heterocycl. Chem.* **11** (1970) 473–523.
13. M.D. Mashkovsky, L.N. Yakhontov, *Prog. Drug. Res.* **13** (1969) 293–339.
14. G. Domagk, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **61** (1935) 829–832.
15. R. Odžak, M. Šprung, *Period. Biol.* **121–122** (2020) 15–21.
16. F. Cunningham, J. Elliott, P. Lees, u M.C. Michel (ur.) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 199, Springer-Verlag, Heidelberg, 2010.
17. R. Odžak, S. Tomić, *Molecules* **11** (2006) 726–730.
18. R. Odžak, S. Tomić, *Bioorg. Chem.* **34** (2006) 90–98.
19. V. Prelog, R. Seiwerth, S. Heimbach-Juhász, P. Stern, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **74** (1941) 647.
20. E.E. Mikhlina, M. V. Rubtsov, *Zh. Obshch. Khim.* **33** (1963) 3582.
21. A.D. Pillai, P.D. Rathod, F.P. Xavier, K.K. Vasu, *Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 4667–4671.

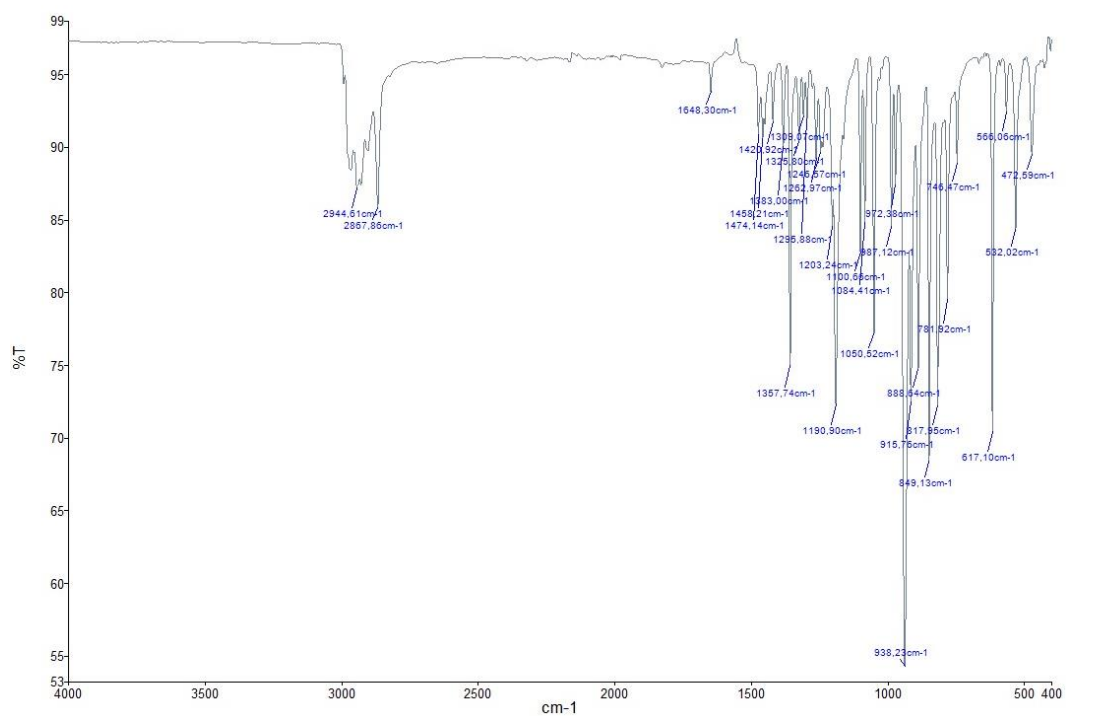
22. J. Lee, E. Jung, J. Park, K. Jung, S. Lee, S. Hong, J. Park, E. Park, J. Kim, S. Park, D. Park, *Planta Med.* **71** (2005) 338–343.
23. Z. Mirjafary, M. Abdoli, H. Saeidian, A. Kakanejadifard, S.M.F. Farnia, *RSC Adv.* **6** (2016) 17740–17758.
24. T. Zhang, R. Xie, T. Zhang, X. Mei, J. Yang, J. Ning, *J. Pestic. Sci.* **38** (2013) 88–90.
25. J. Mas-Roselló, N. Cramer, *Chem.Eur. J.* **28** (2022) e202103683.
26. D.Y. Curtin, E.J. Grubbs, C.G. Mccarty, *J. Am. Chem. Soc.* **530** (1966) 2775–2786.
27. S.W. Slayden, J.F. Liebman, u Z. Rappoport (ur.) *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*, Wiley, New Jersey, , 2010.
28. J.H. Smith, E.T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **39** (1974) 728–730.
29. D.D. Dolliver, B.T. Bhattarai, A. Pandey, M.L. Lanier, A.S. Bordelon, S. Adhikari, J.A. Dinser, P.F. Flowers, V.S. Wills, C.L. Schneider, K.H. Shaughnessy, J.N. Moore, S.M. Raders, T.S. Snowden, A.S. McKim, F.R. Fronczek, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 3676–3687.
30. S. Arjmandi-Rad, J.D. Vestergaard Nieland, K.G. Goozee, S. Vaseghi, *Neurol. Sci.* **45** (2024) 417–430.
31. N. Oliyaei, M. Moosavi-Nasab, N. Tanideh, A. Iraj, *Brain. Res. Bull.* **193** (2023) 11–21.
32. H. Karimi Askarani, A. Iraj, A. Rastegari, S.N. Abbas Bukhari, O. Firuzi, T. Akbarzadeh, M. Saeedi, *BMC Chem.* **14** (2020) 1–13.
33. M. Saeedi, A. Maleki, A. Iraj, R. Hariri, T. Akbarzadeh, N. Edraki, O. Firuzi, S.S. Mirfazli, *J. Mol. Struct.* **1229** (2021) 129828.
34. A. Asadipour, Y. Pourshojaei, M. Mansouri, E. Mahdavizadeh, C. Irajie, J. Mottaghishah, E. Faghih-Mirzaei, M. Mahdavi, A. Iraj, *BMC Chem.* **18** (2024) 70.
35. T. Sun, T. Zhen, C. Hamis Harakandi, L. Wang, *Eur. J. Med. Chem.* **275** (2024) 116569.
36. F.J. Luque, D. Muñoz-Torrero, *Acc. Chem. Res.* **57** (2023) 450–467.
37. G. Sridhar, L. Gumpeny, *World J. Exp. Med.* **14** (2024) 87202.
38. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
39. A. Matošević, A. Radman Kastelic, A. Mikelić, A. Zandona, M. Katalinić, I. Primožič, A. Bosak, T. Hrenar, *Pharmaceutics* **13** (2021) 420.
40. L. Pezzementi, F. Nachon, A. Chatonnet, *PLoS One* **6** (2011) e17396.

41. P. Masson, E. Carletti, F. Nachon, *Protein Pept. Lett.* **16** (2009) 1215–1224.
42. D. De Boer, N. Nguyen, J. Mao, J. Moore, E.J. Sorin, *Biomolecules* **11** (2021) 580.
43. C. Yu, X. Liu, B. Ma, J. Xu, Y. Chen, C. Dai, H. Peng, D. Zha, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **39** (2024) 2313682.
44. B. Ibach, E. Haen, *Curr. Pharm. Des.* **10** (2005) 231–251.
45. B.H. Peters, H.S. Levin, *Ann. Neurol.* **6** (1979) 219–221.
46. L.G. Wade, *Organic Chemistry*, 2nd ed., Pearson Prentice Hall, Boston, 2010.
47. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013.
48. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–95.

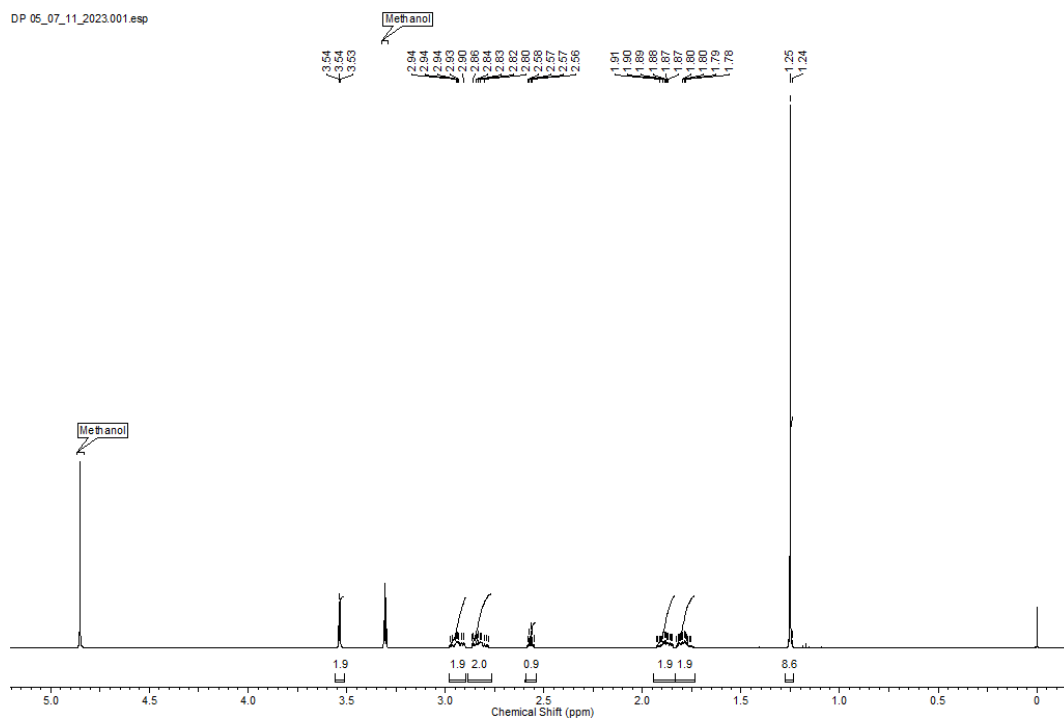
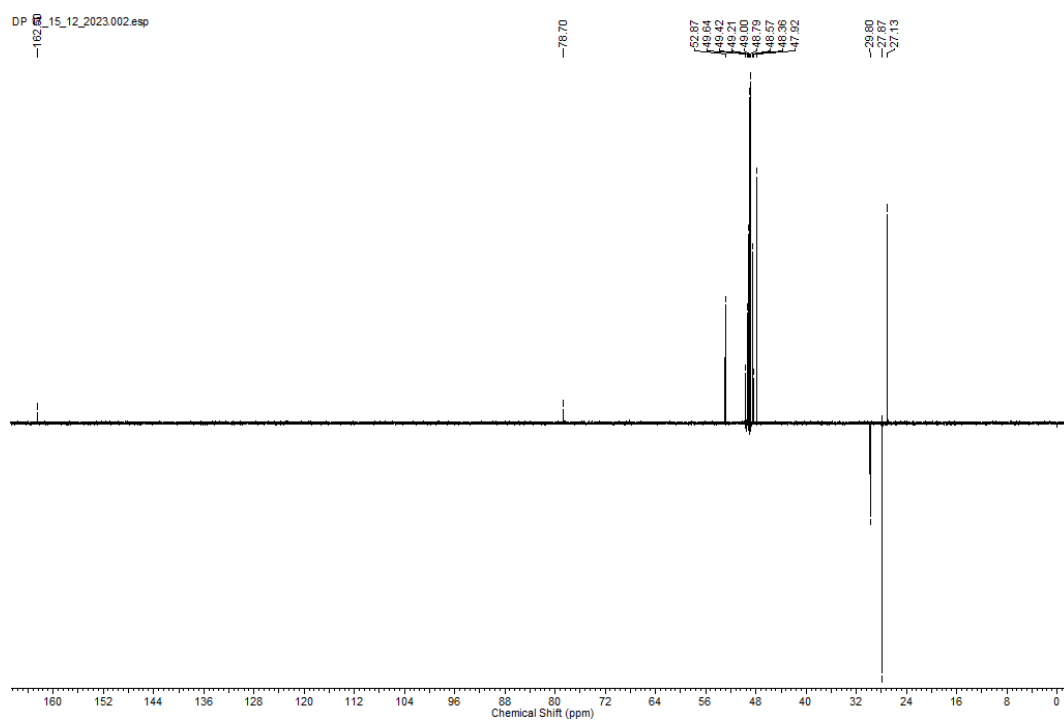
§ 8. DODATAK

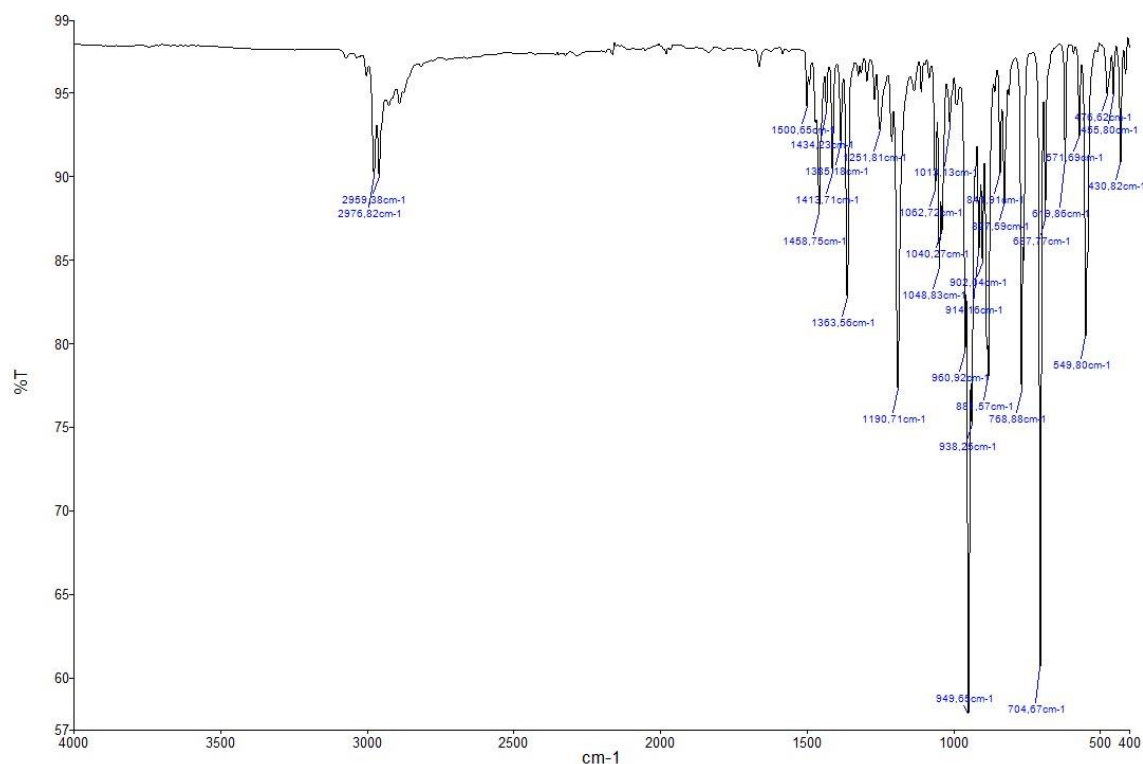
8.1. IR i NMR spektri sintetiziranih spojeva

8.1.1. *O*-tert-butilni eter kinuklidin-3-on oksima (spoj 1)

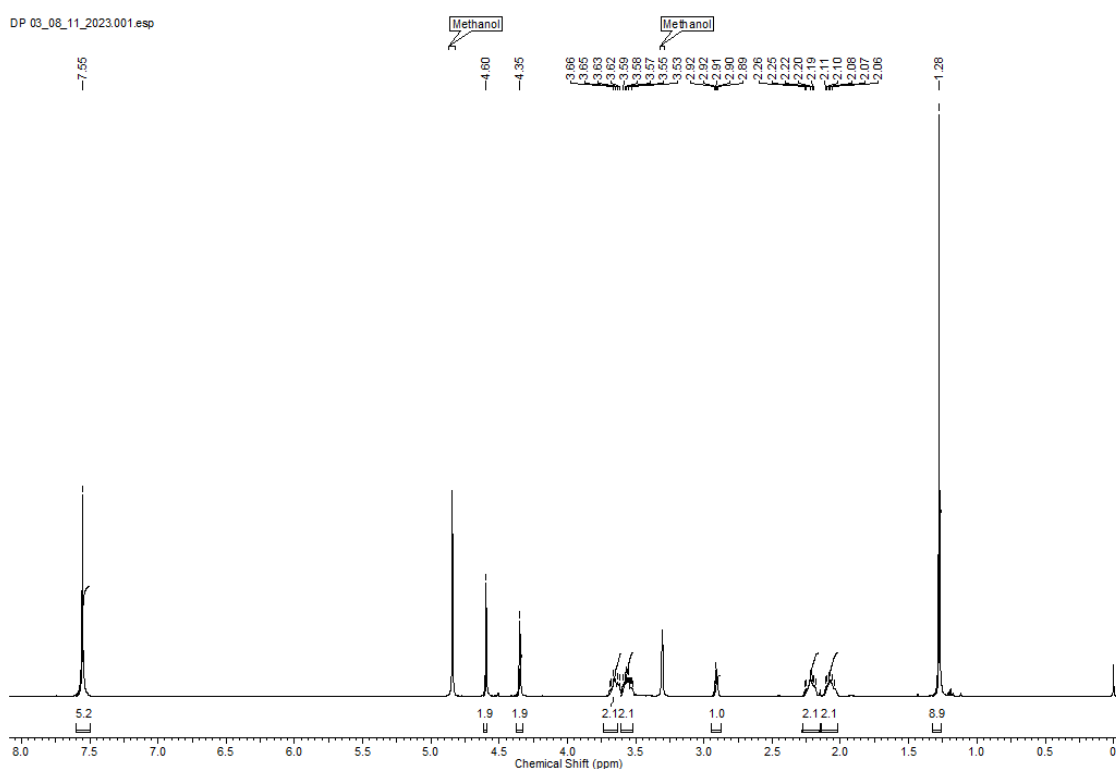


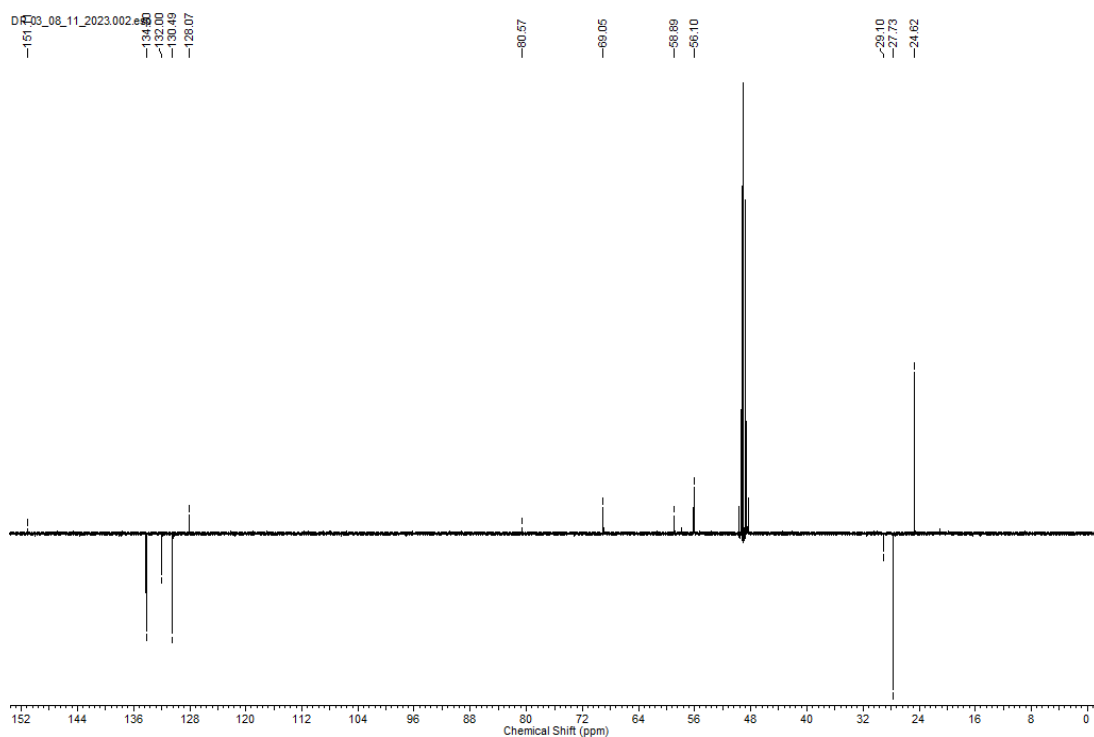
Slika D1. IR spektar spoja 1

Slika D2. ^1H NMR spektar spoja **1** snimljen u MeOHSlika D3. DEPT-Q spektar spoja **1** snimljen u MeOH

8.1.2. *N*-benzil-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 2)

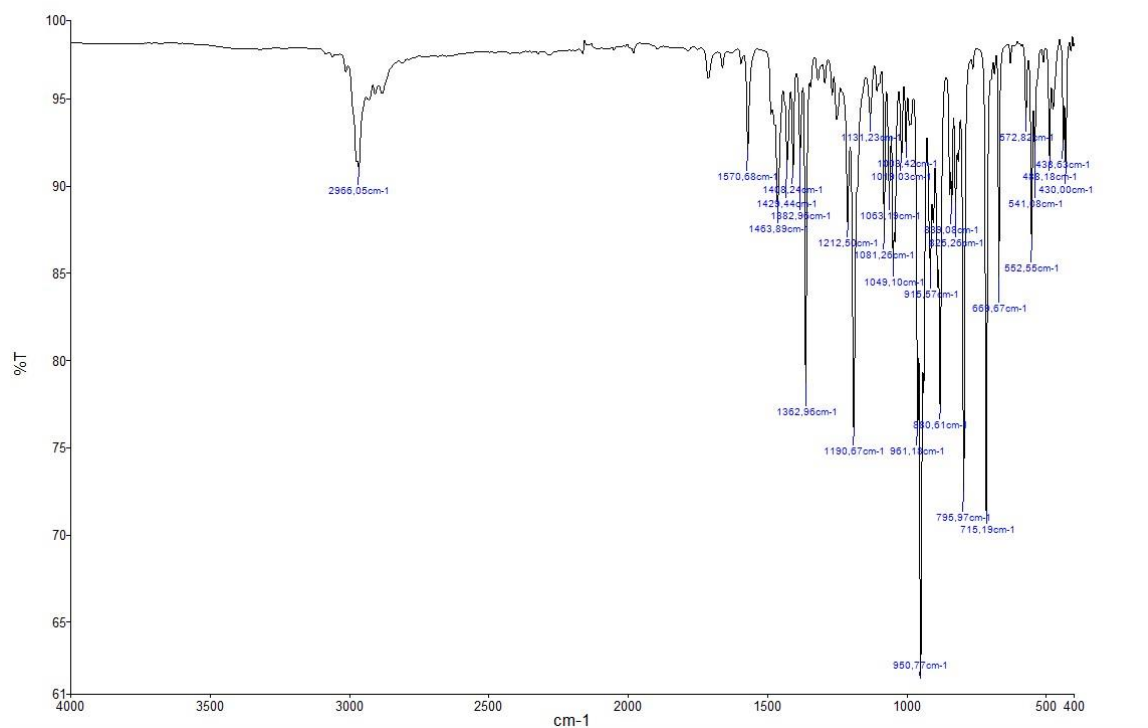
Slika D4. IR spektar spoja 2

Slika D5. ¹H NMR spektar spoja 2 snimljen u MeOH

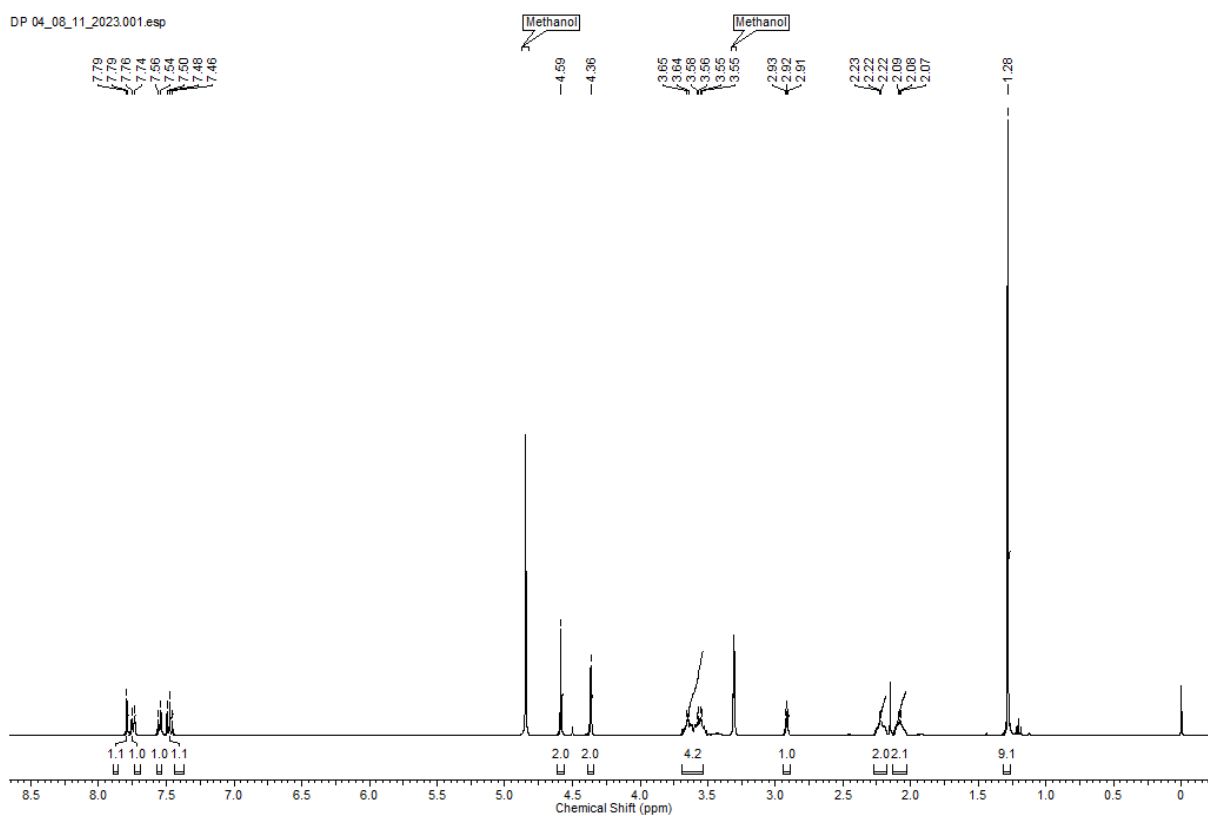
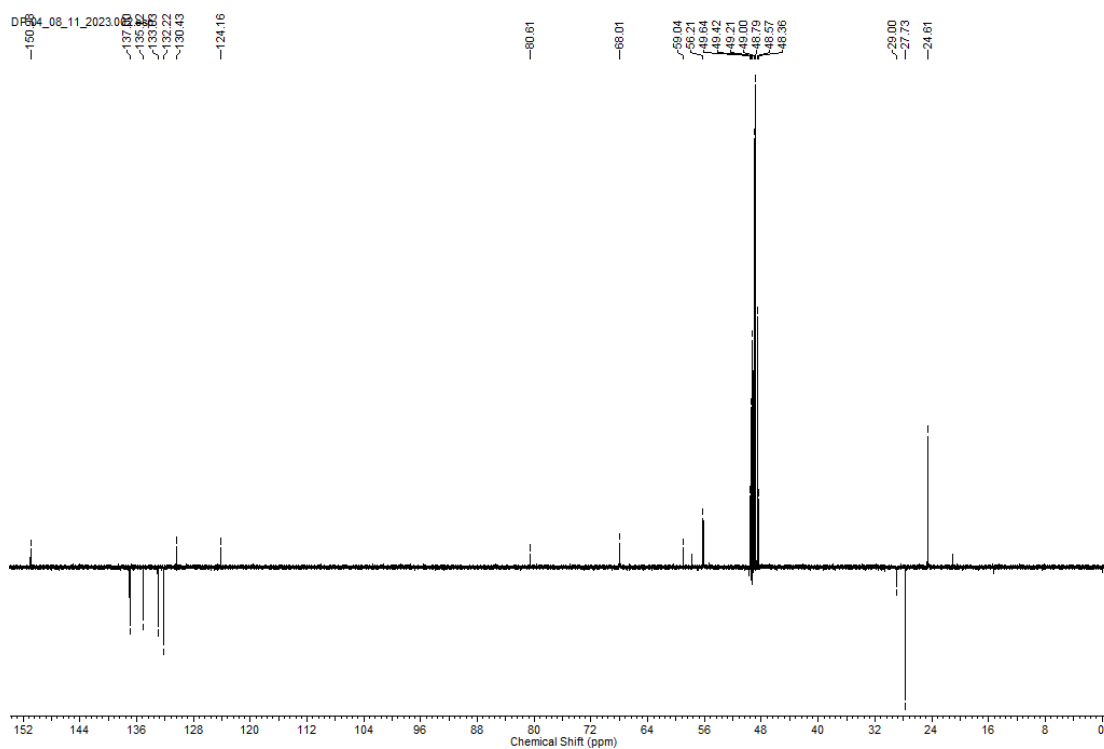


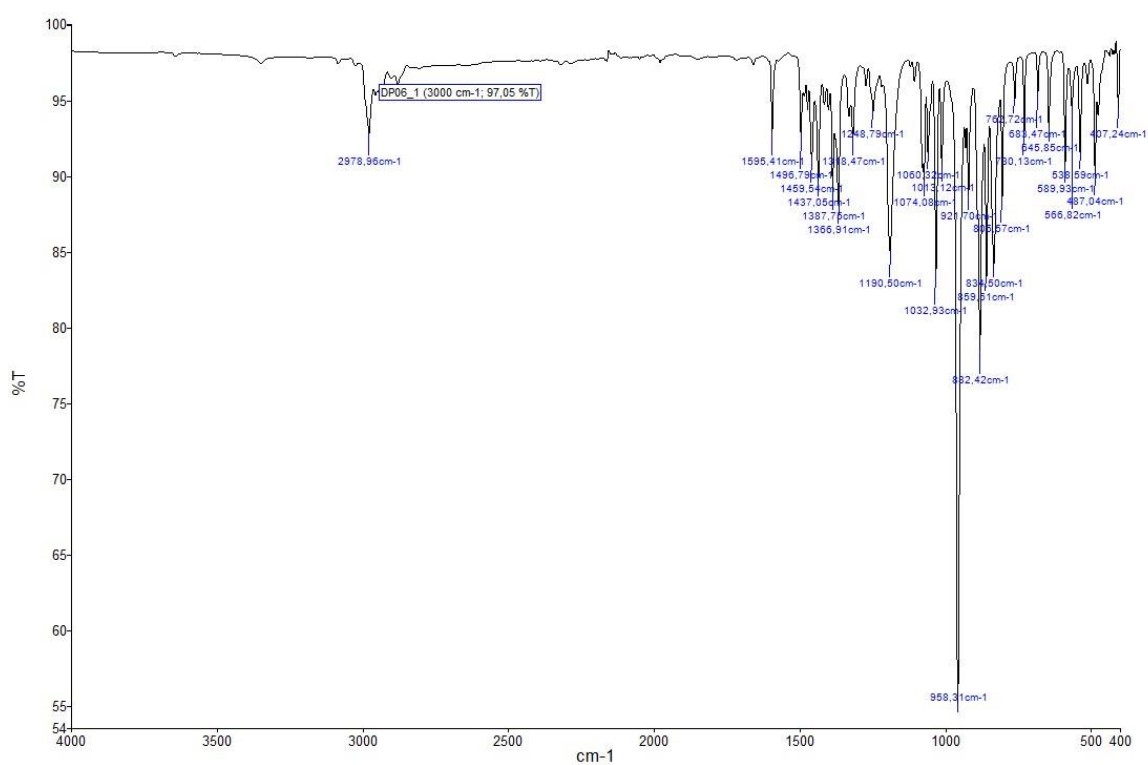
Slika D6. DEPT-Q spektar spoja 2 snimljen u MeOH

8.1.3. *N*-(*m*-brombenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 3)

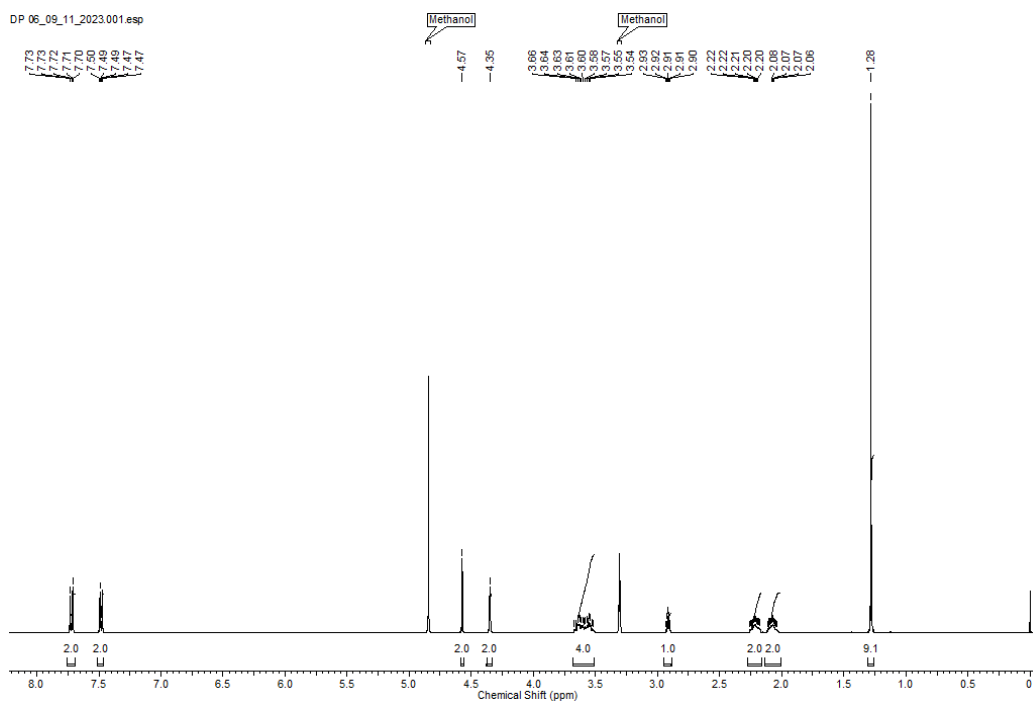


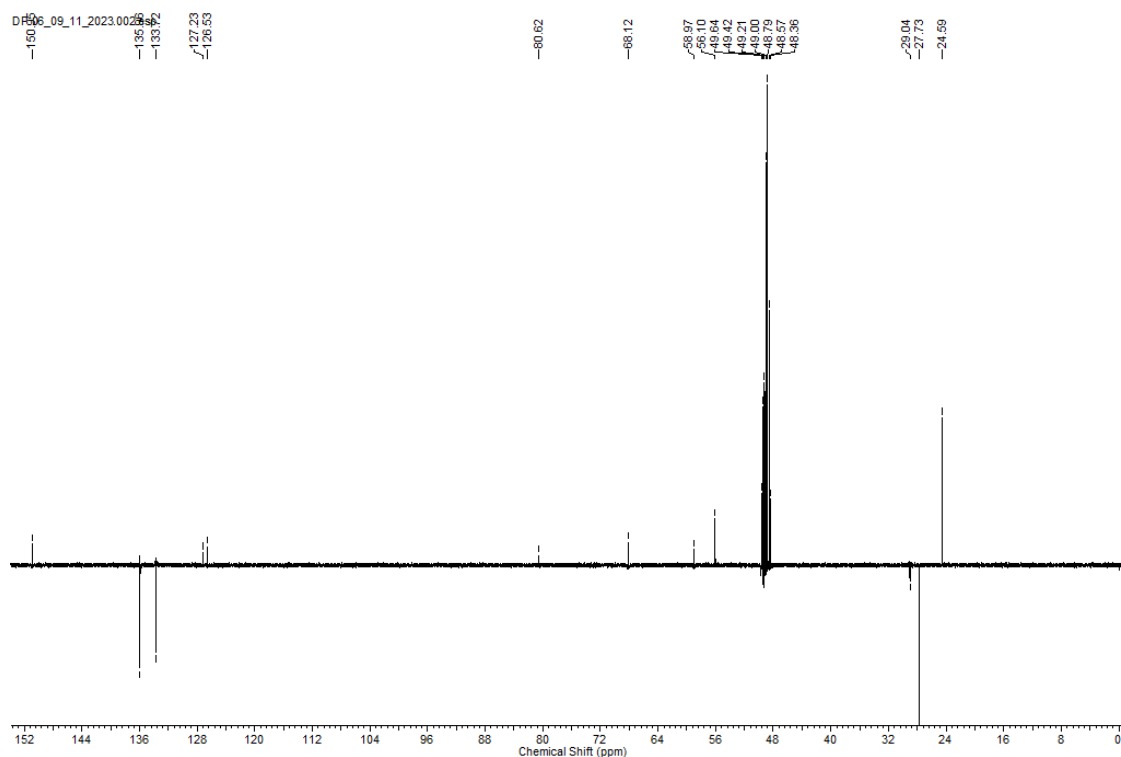
Slika D7. IR spektar spoja 3

Slika D8. ^1H NMR spektar spoja **3** snimljen u MeOHSlika D9. DEPT-Q spektar spoja **3** snimljen u MeOH

8.1.4. *N*-(*p*-brombenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 4)

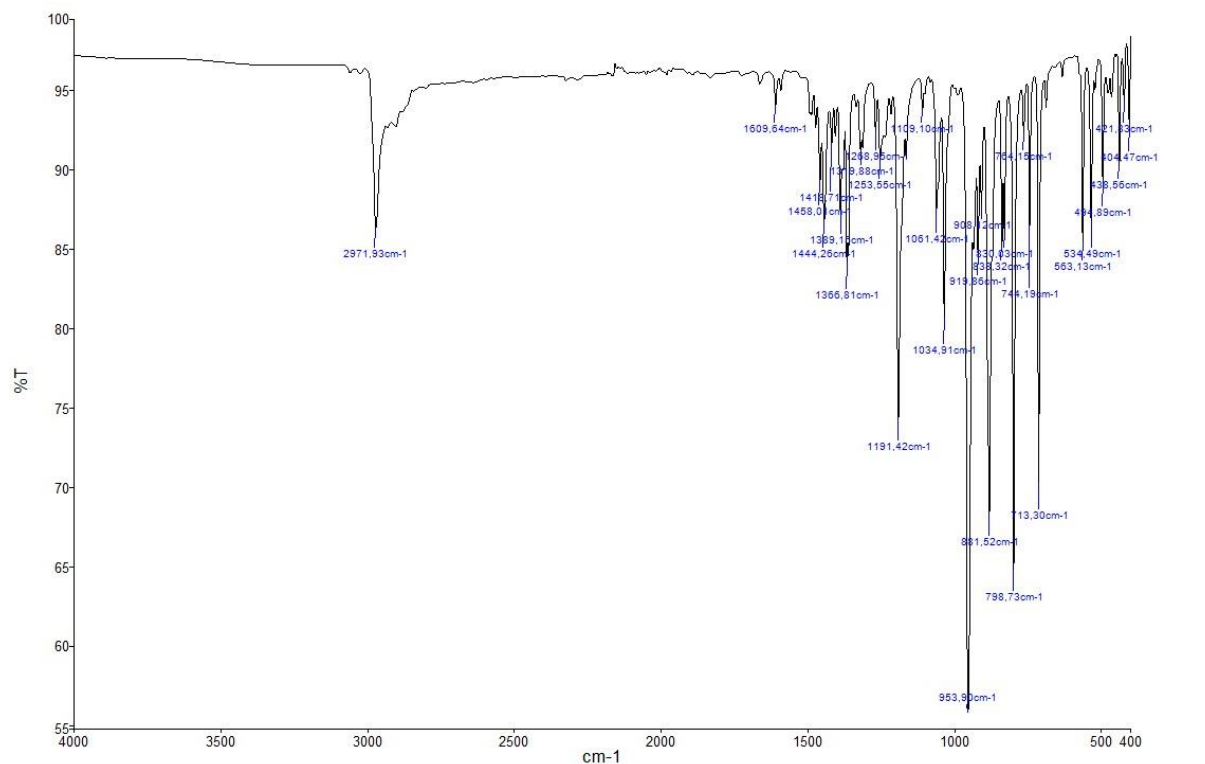
Slika D10. IR spektar spoja 4

Slika D11. ¹H NMR spektar spoja 4 snimljen u MeOH

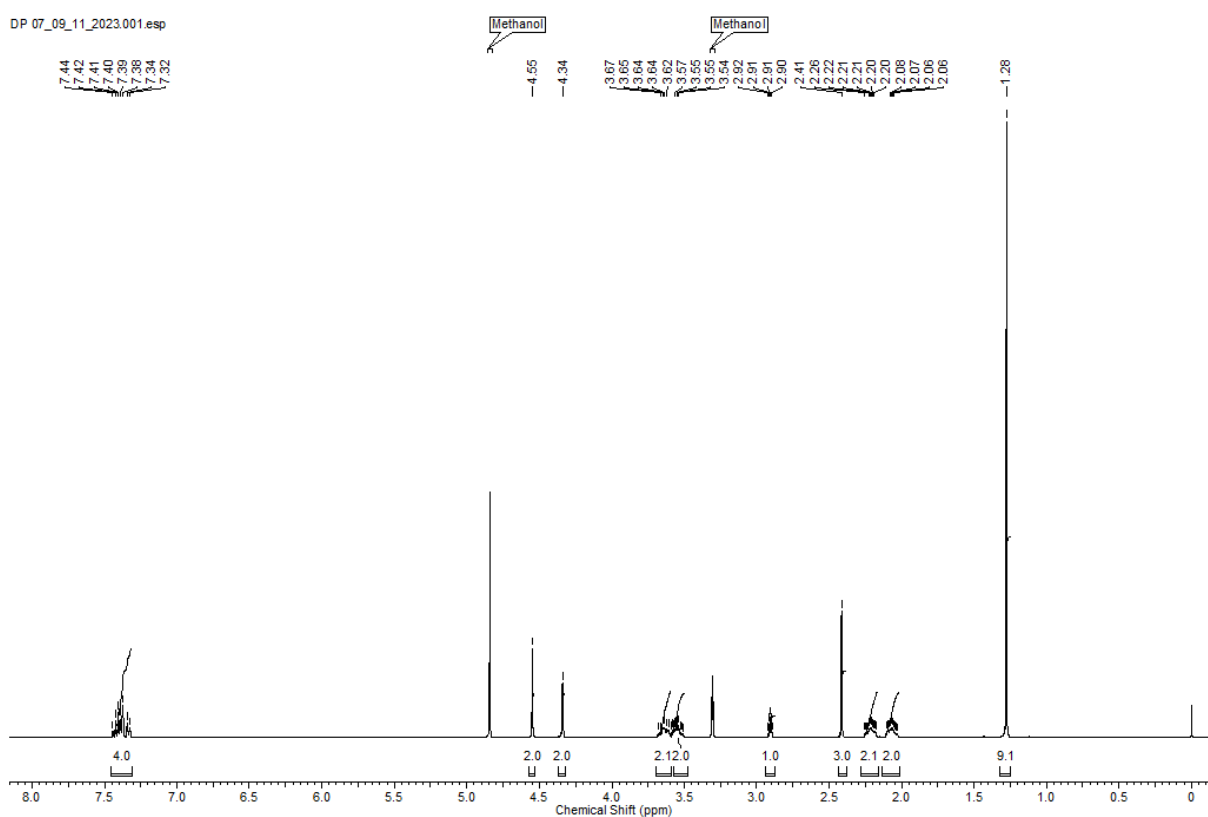
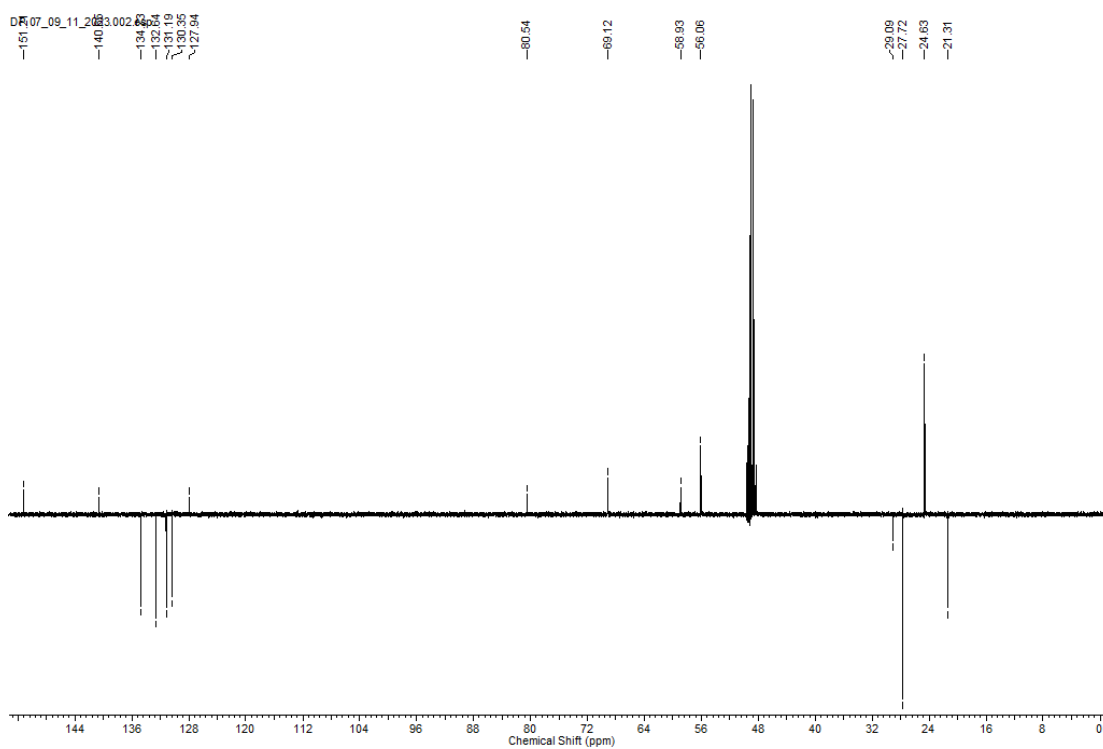


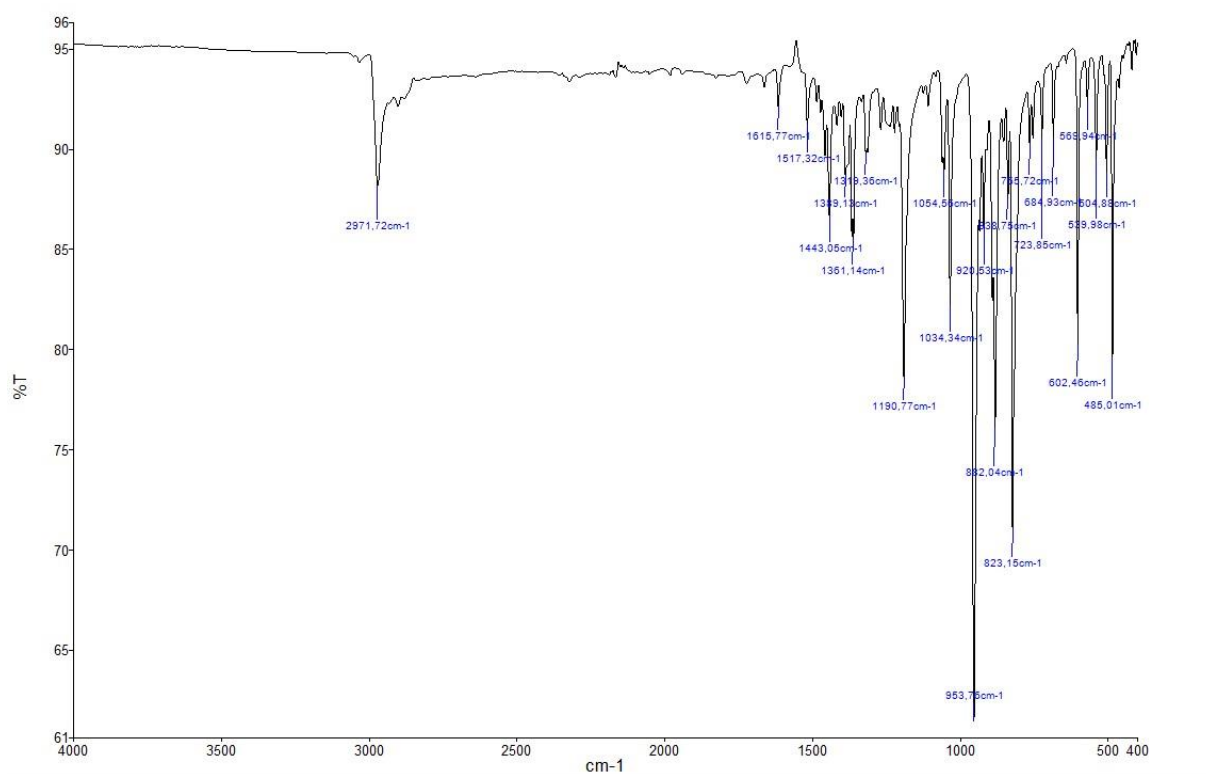
Slika D12. DEPT-Q spektar spoja 4 snimljen u MeOH

8.1.5. *N*-(*m*-metilbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 5)

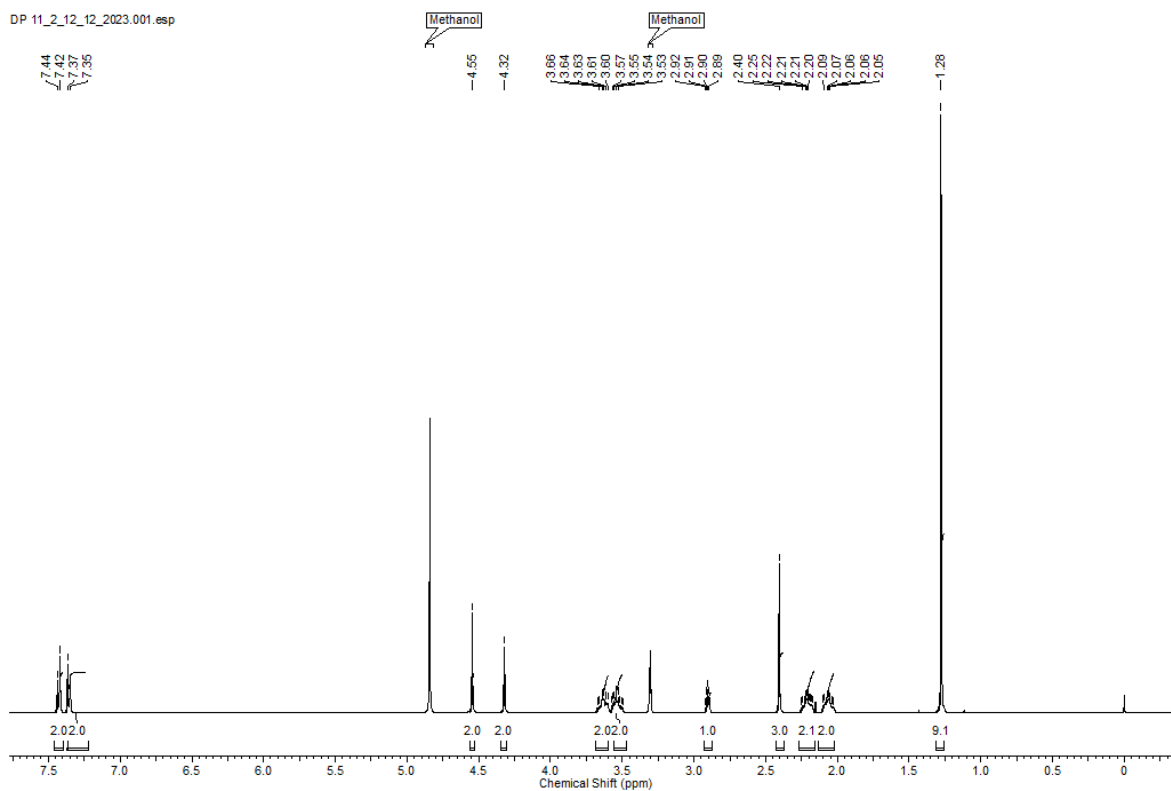
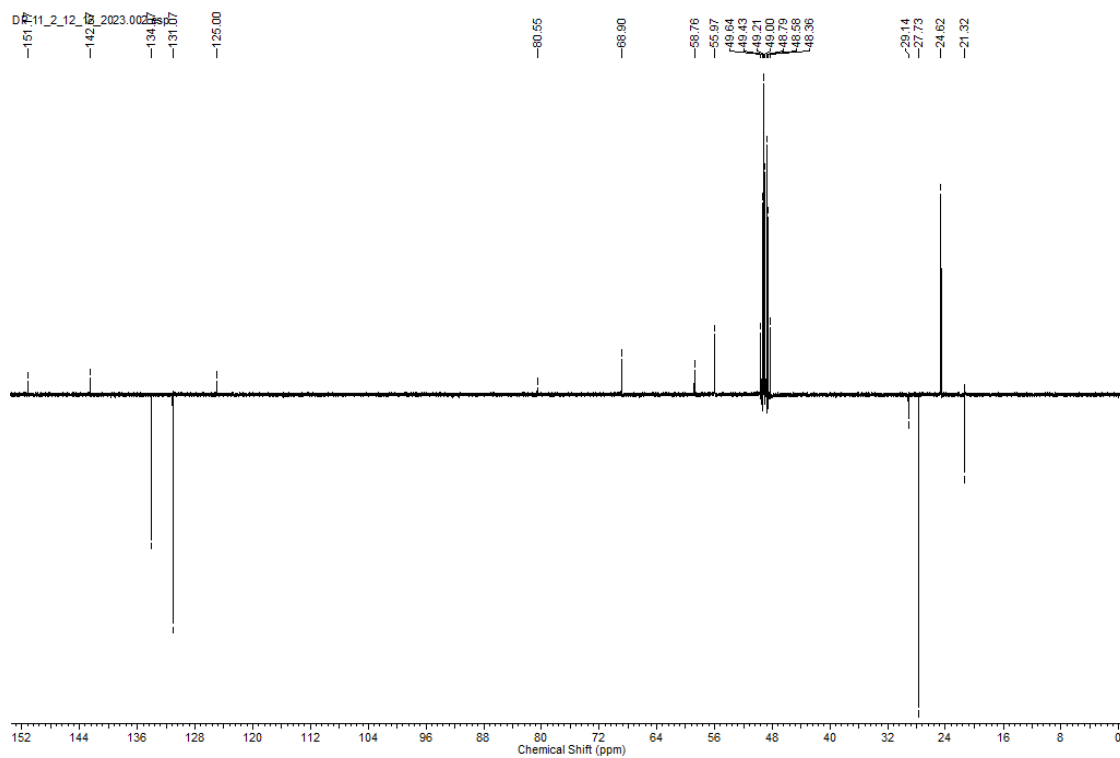


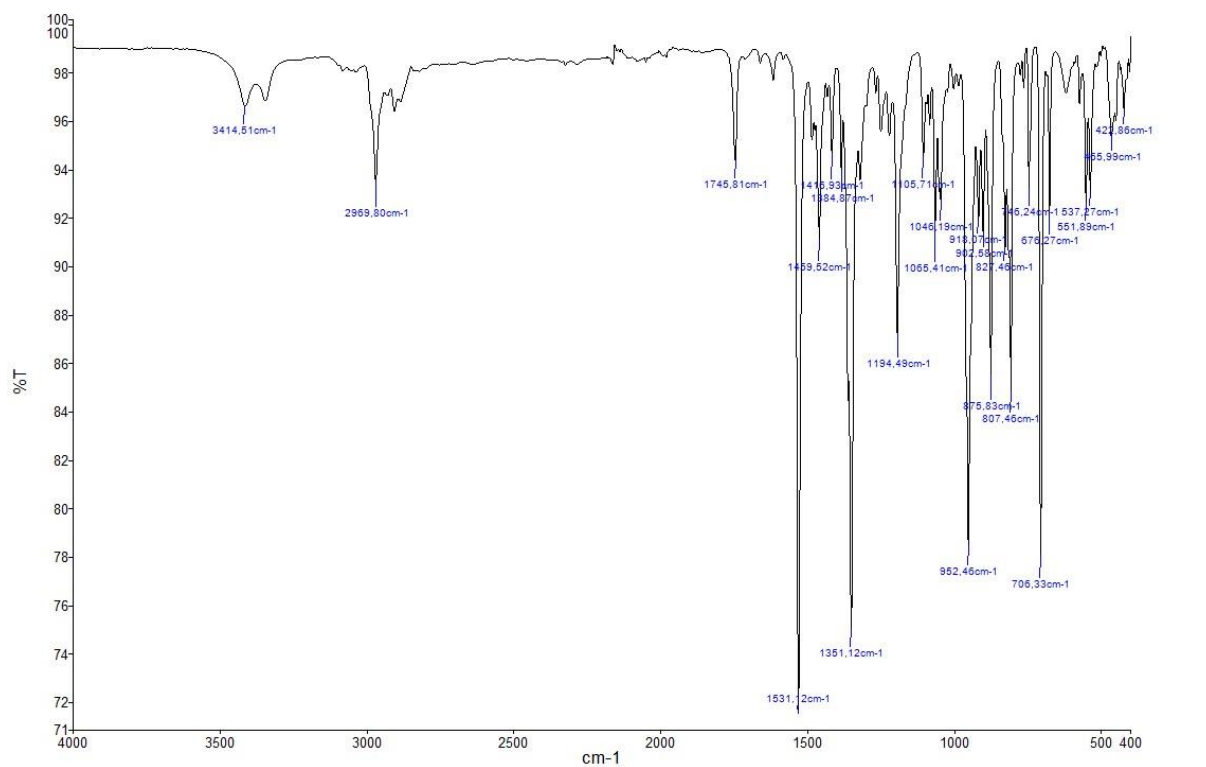
Slika D13. IR spektar spoja 5

Slika D14. ^1H NMR spektar spoja **5** snimljen u MeOHSlika D15. DEPT-Q spektar spoja **5** snimljen u MeOH

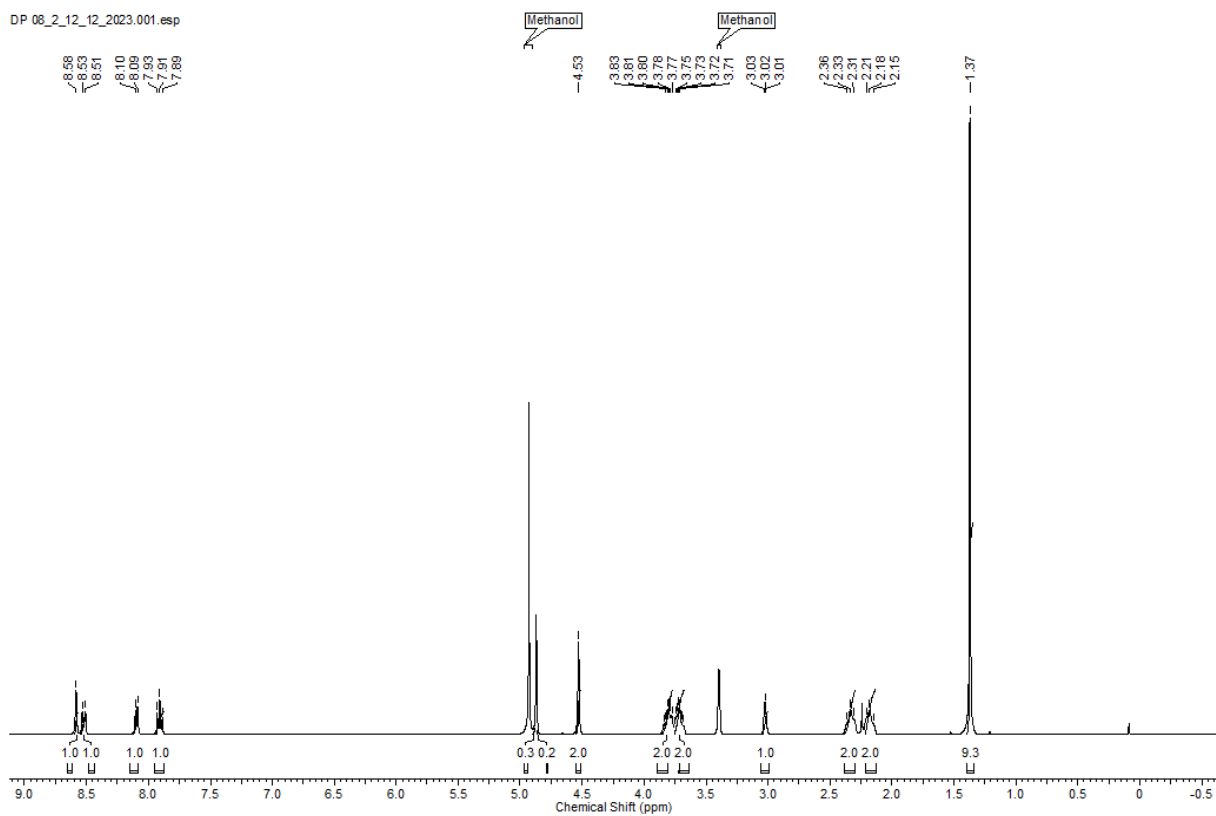
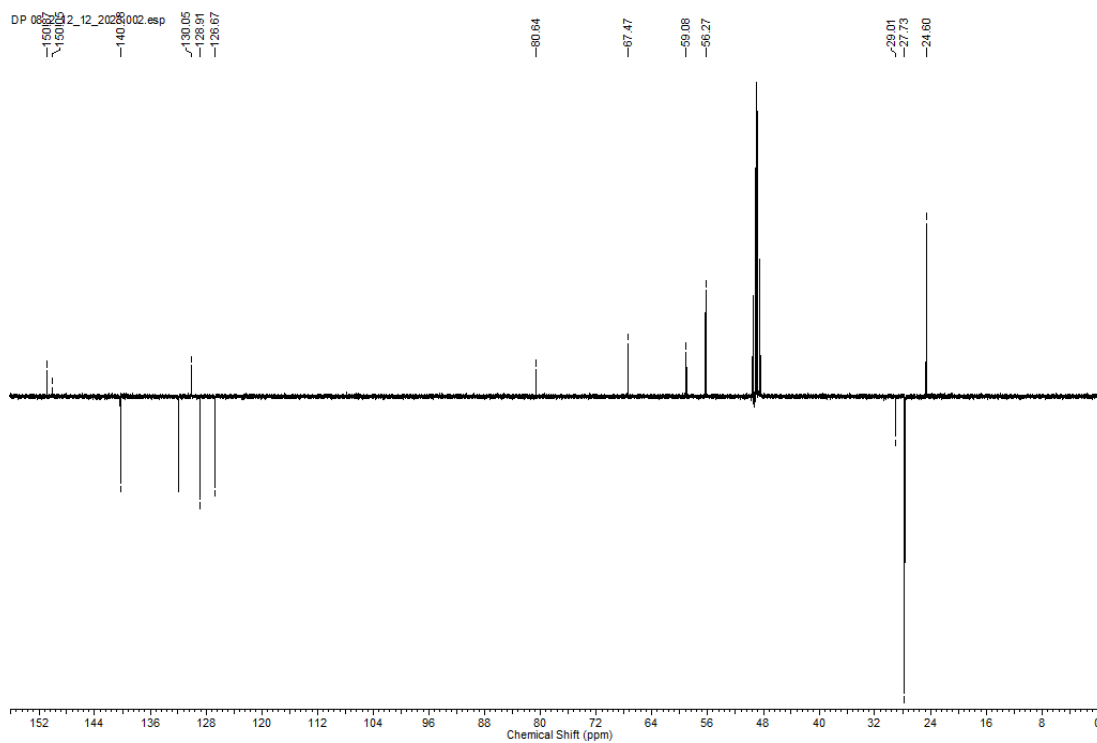
8.1.6. *N*-(*p*-metilbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 6)

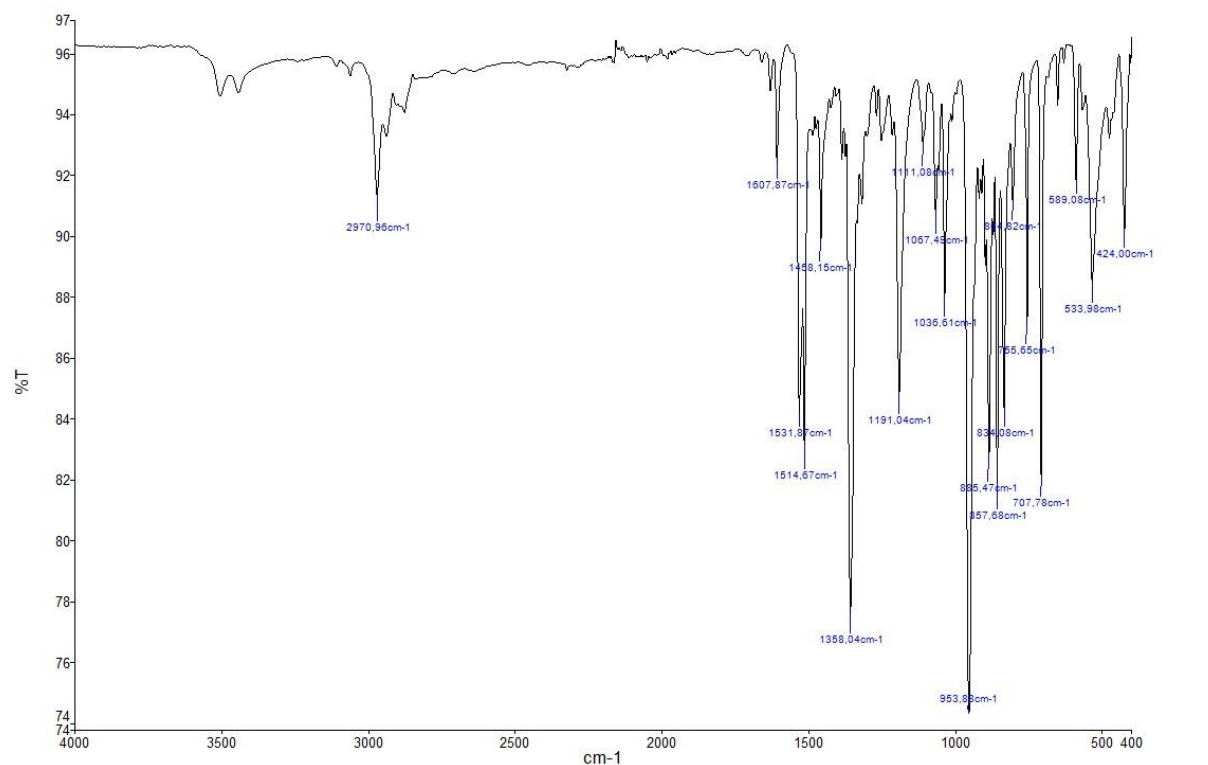
Slika D16. IR spektar spoja 6

Slika D17. ^1H NMR spektar spoja **6** snimljen u MeOHSlika D18. DEPT-Q spektar spoja **6** snimljen u MeOH

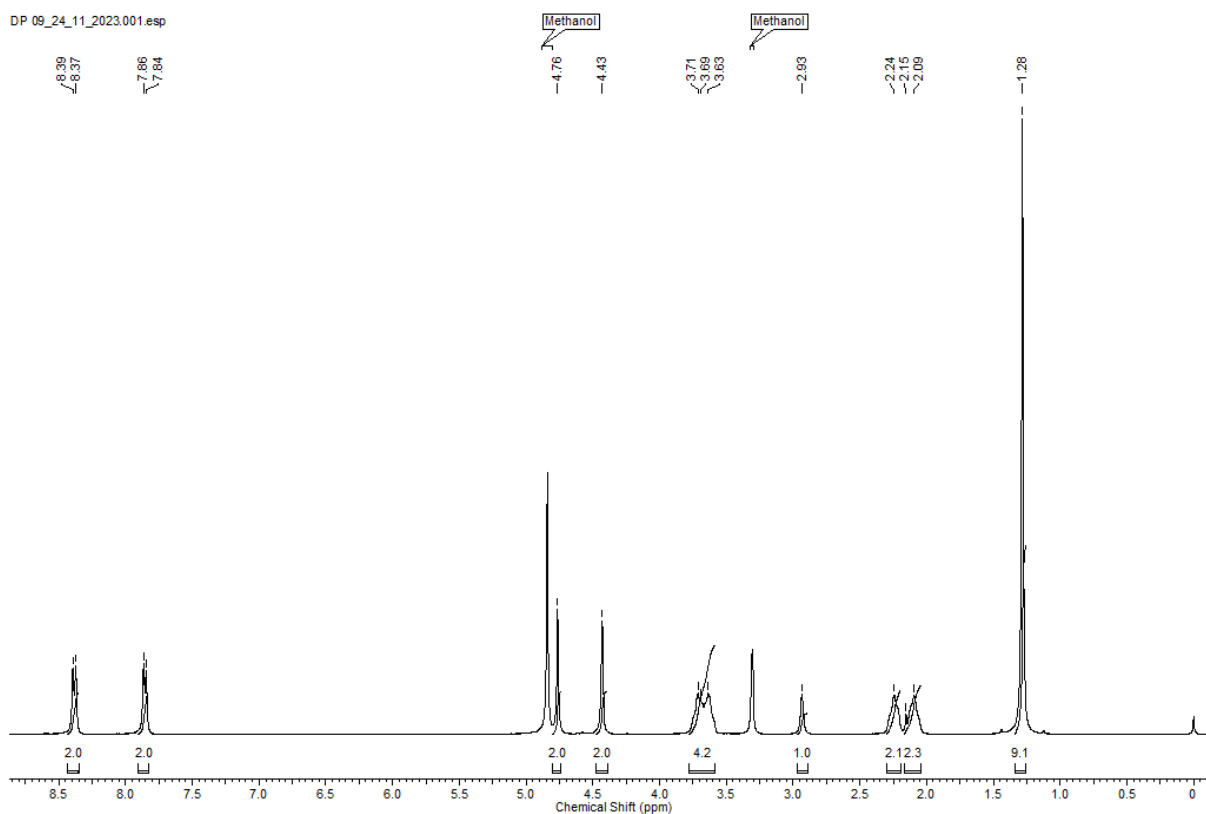
8.1.7. *N*-(*m*-nitrobenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 7)

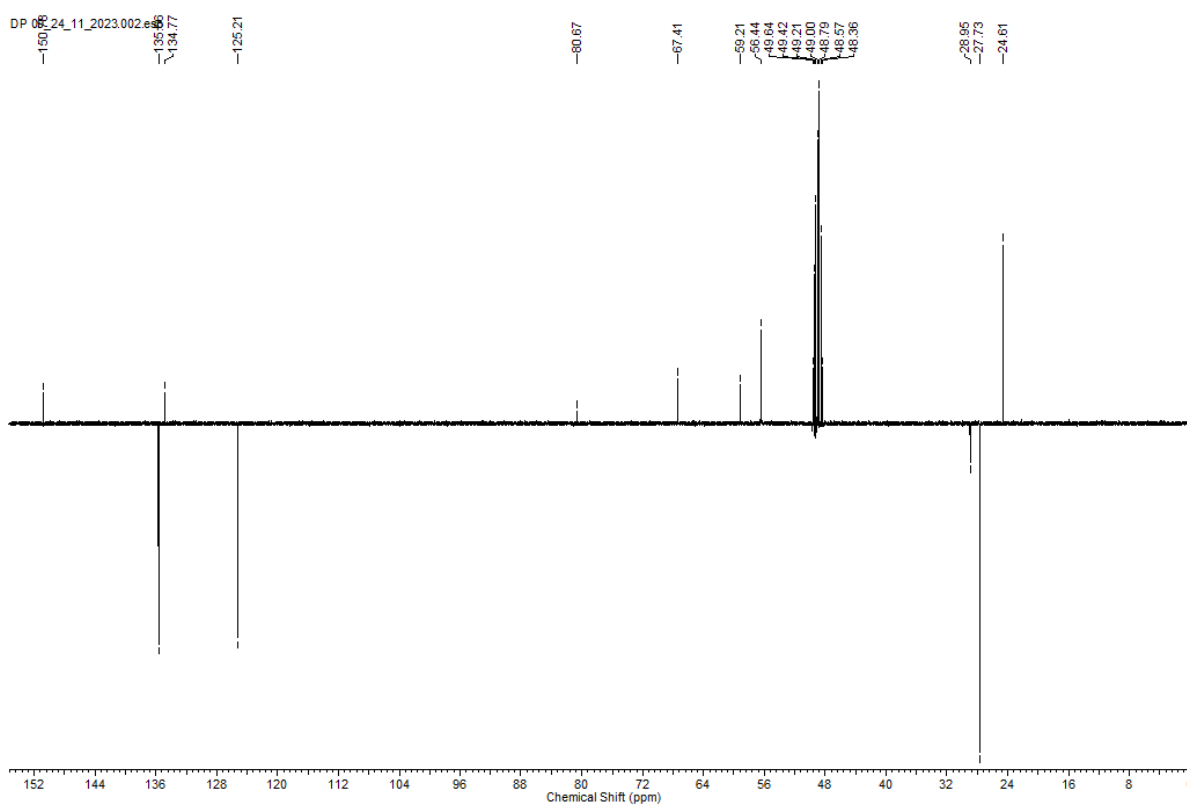
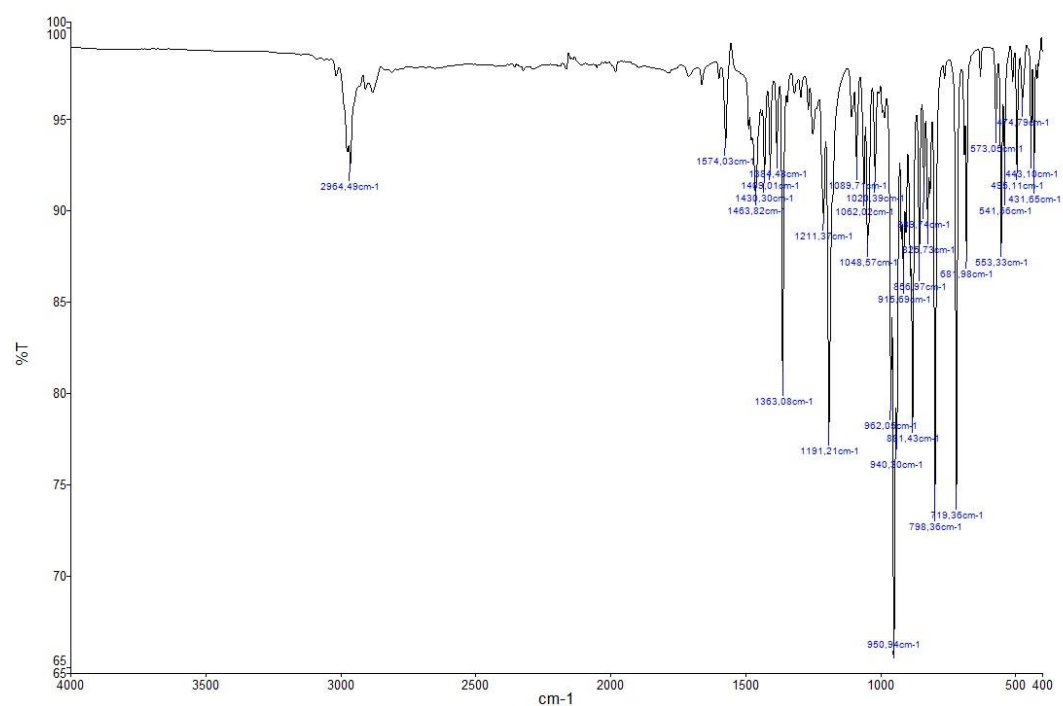
Slika D19. IR spektar spoja 7

Slika D20. ^1H NMR spektar spoja **7** snimljen u MeOHSlika D21. DEPT-Q spektar spoja **7** snimljen u MeOH

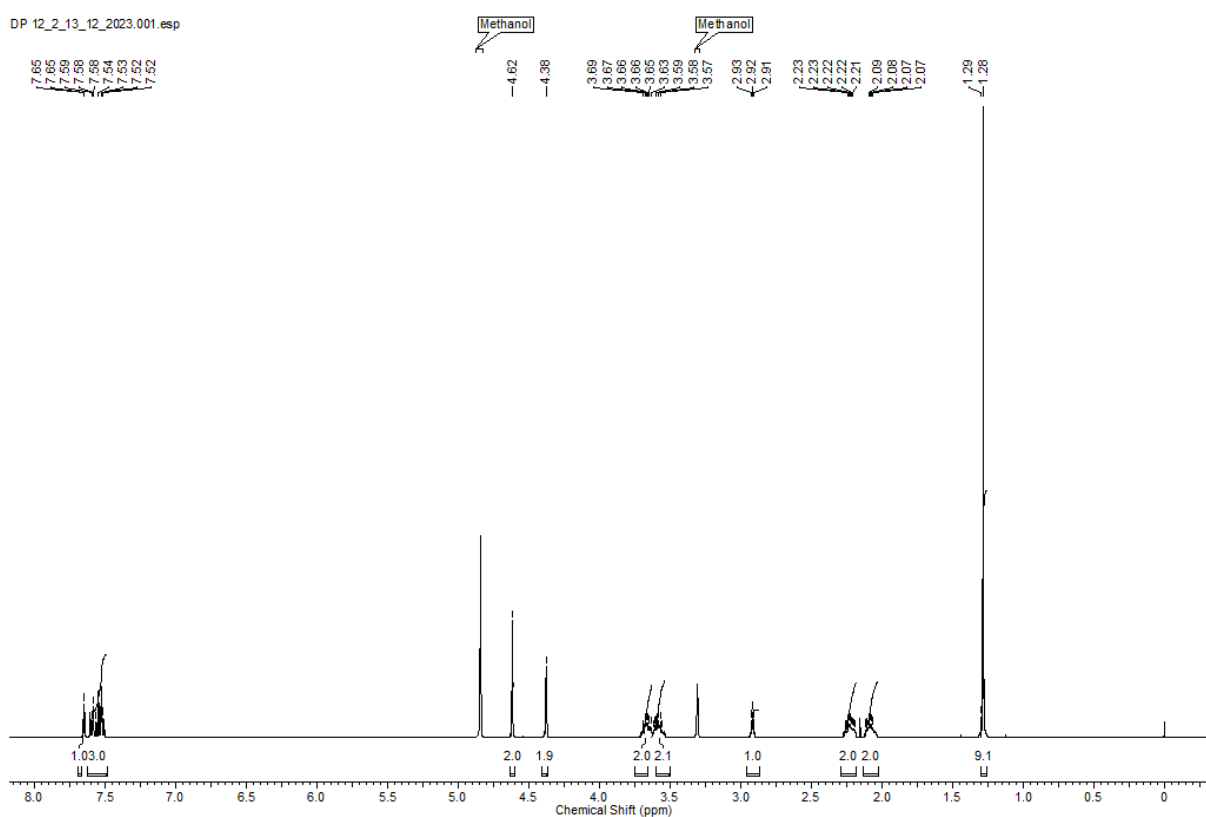
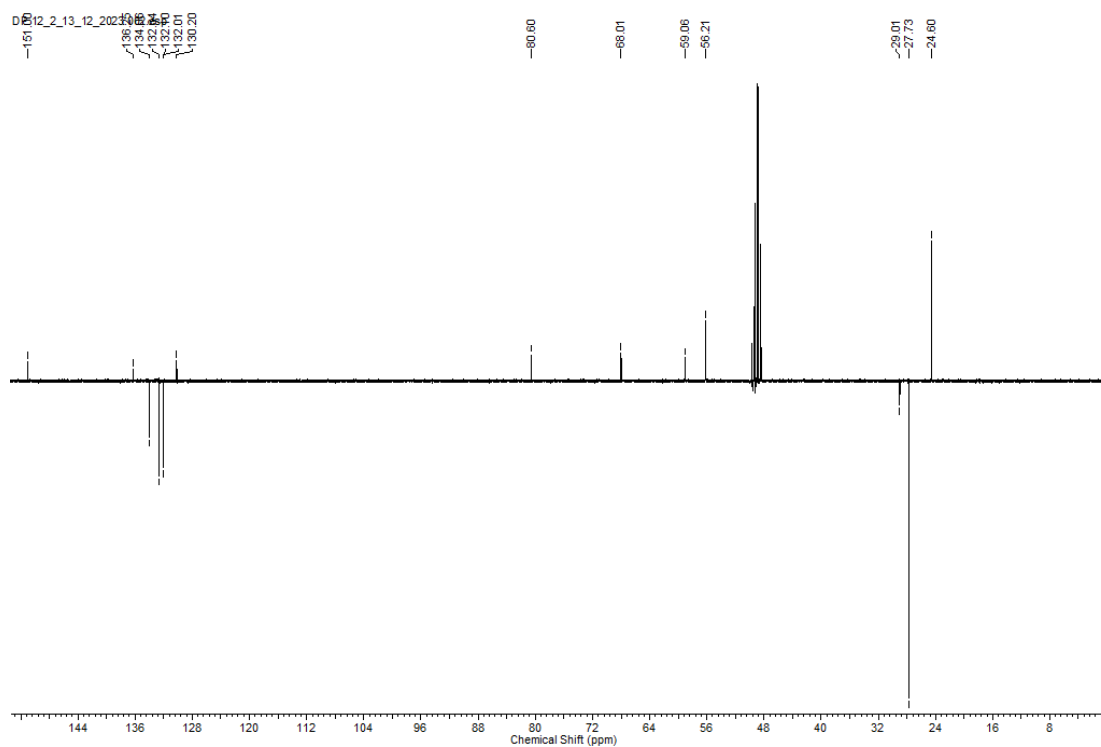
8.1.8. *N*-(*p*-nitrobenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 8)

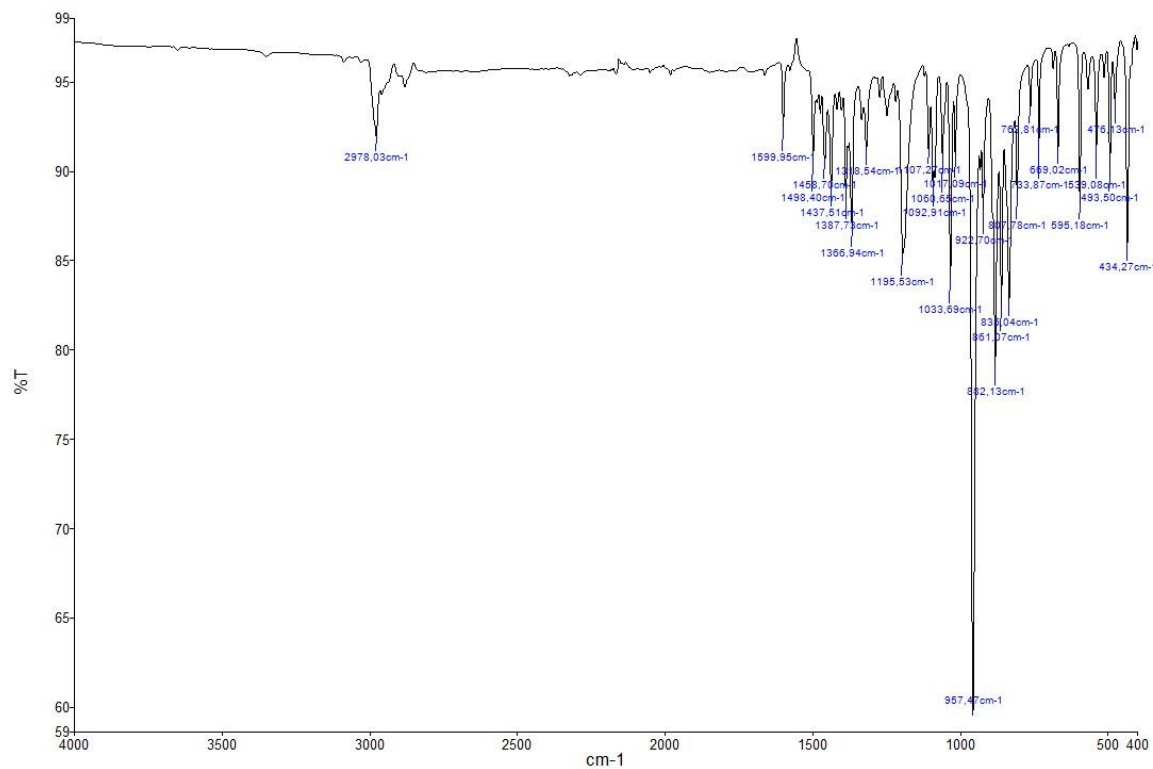
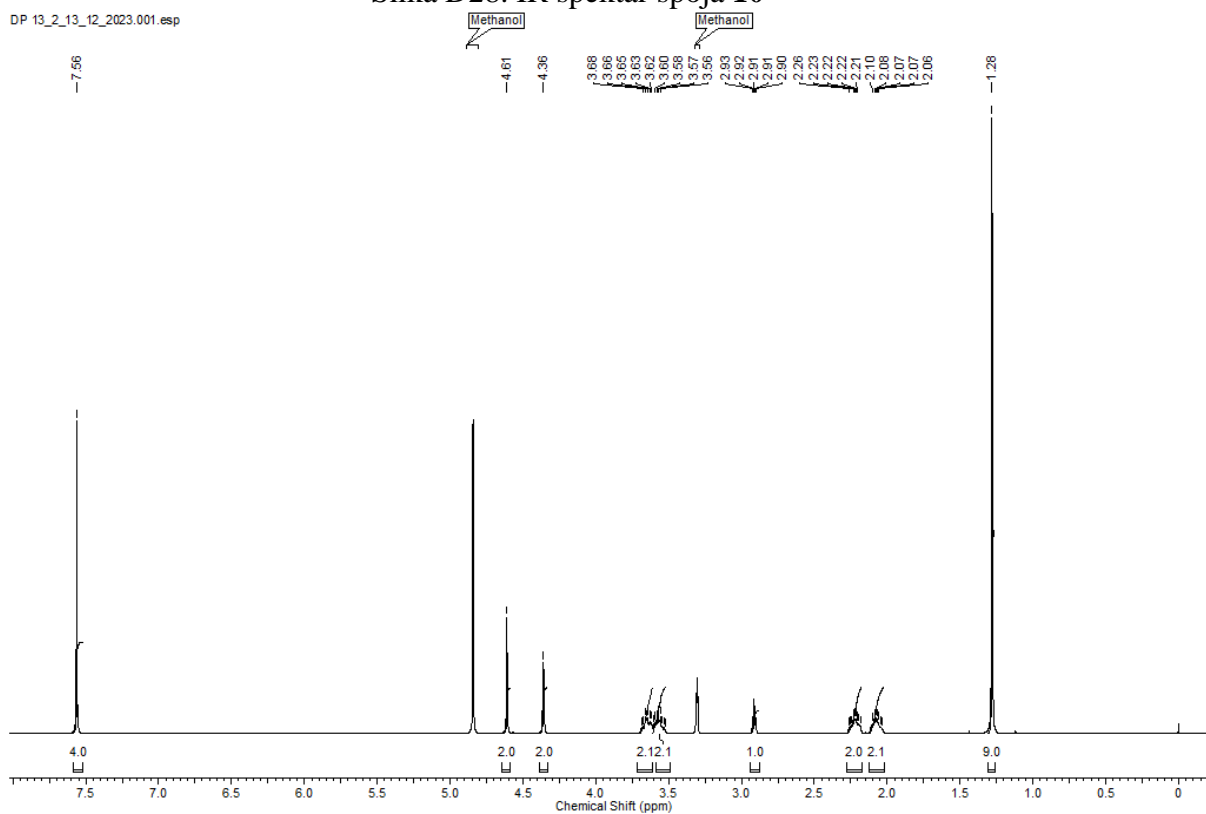
Slika D22. IR spektar spoja 8

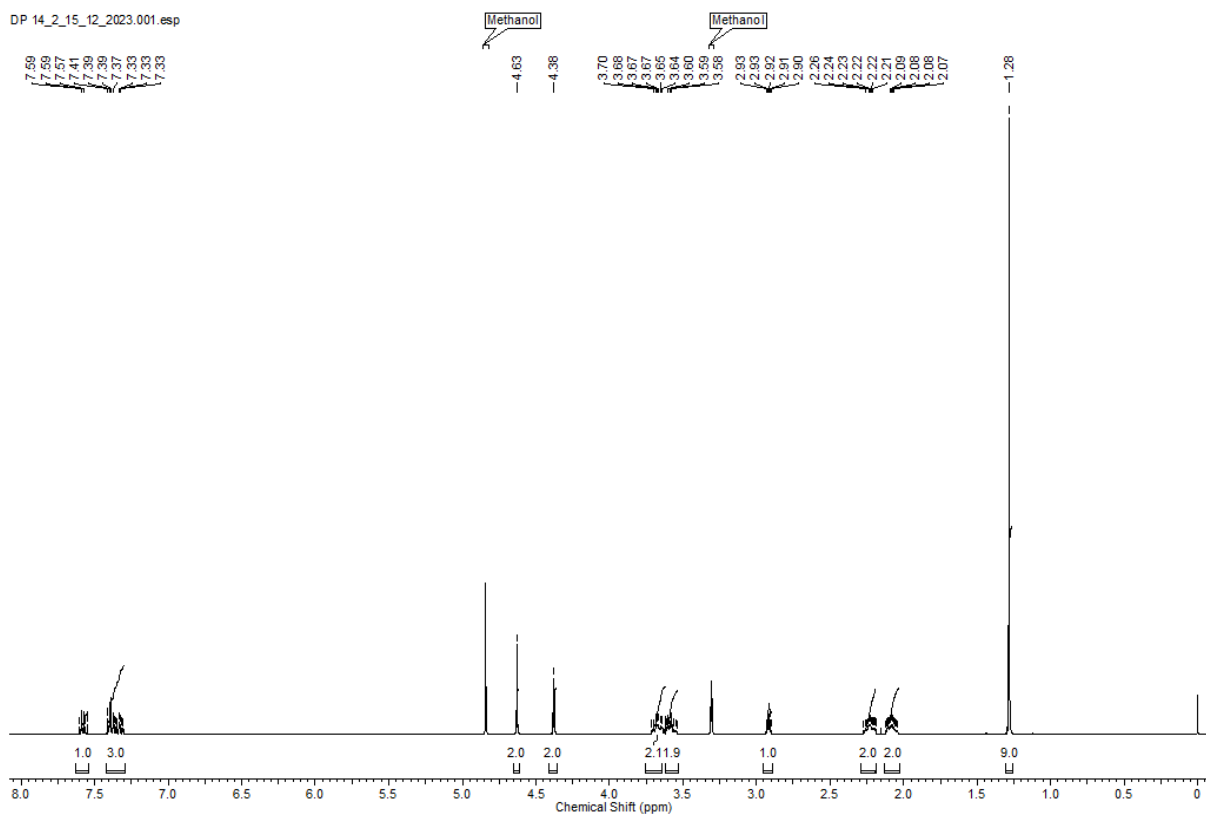


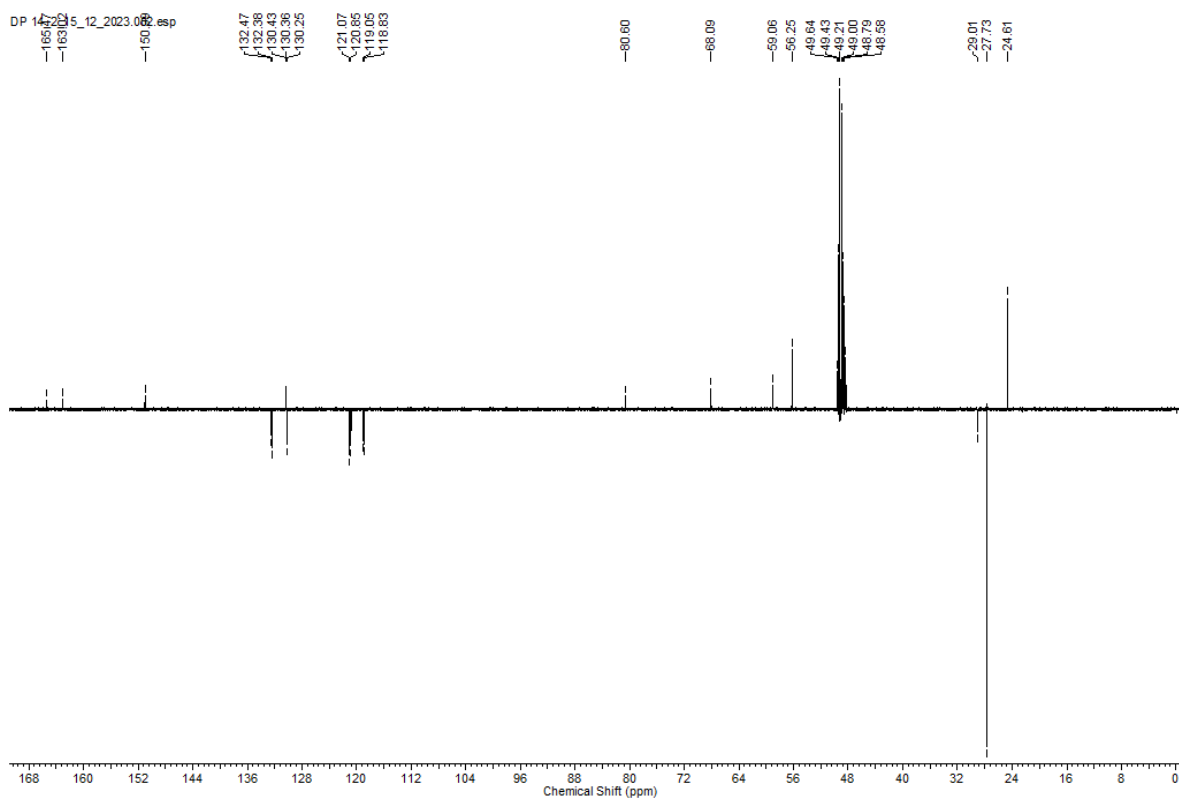
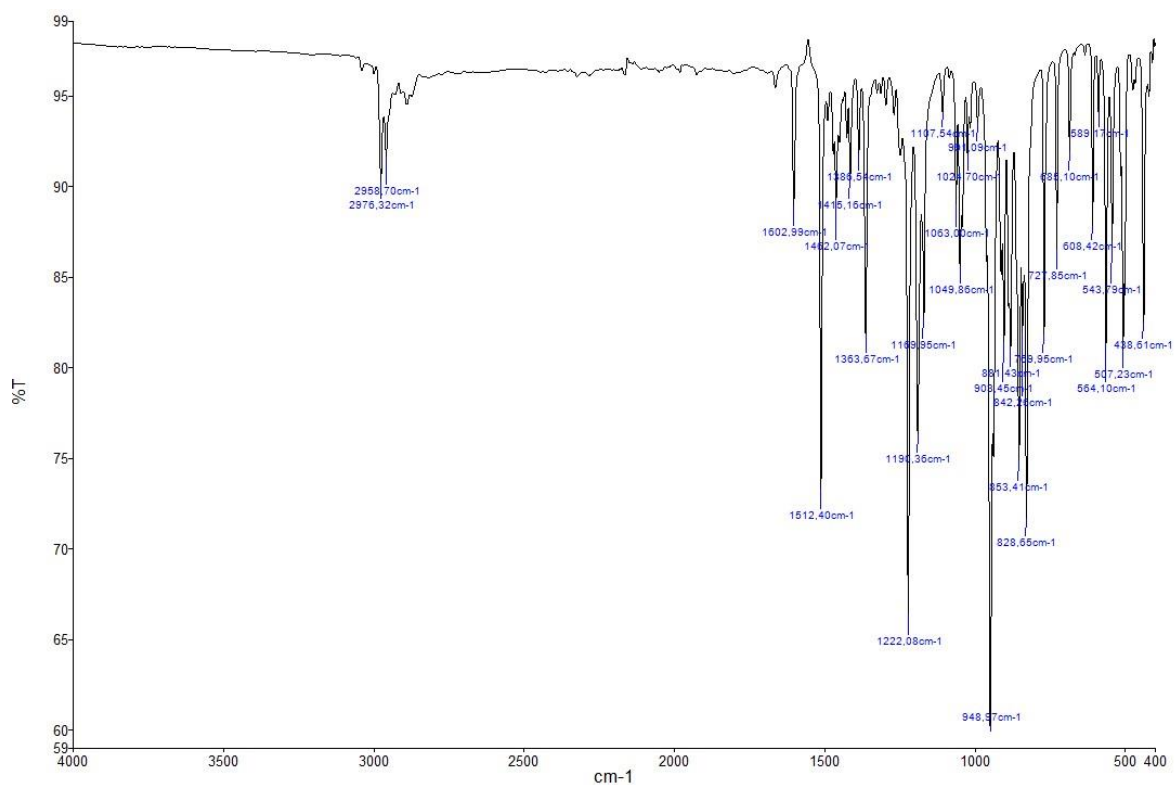
Slika D23. ^1H NMR spektar spoja **8** snimljen u MeOHSlika D24. DEPT-Q spektar spoja **8** snimljen u MeOH8.1.9. *N*-(*m*-klorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj **9**)

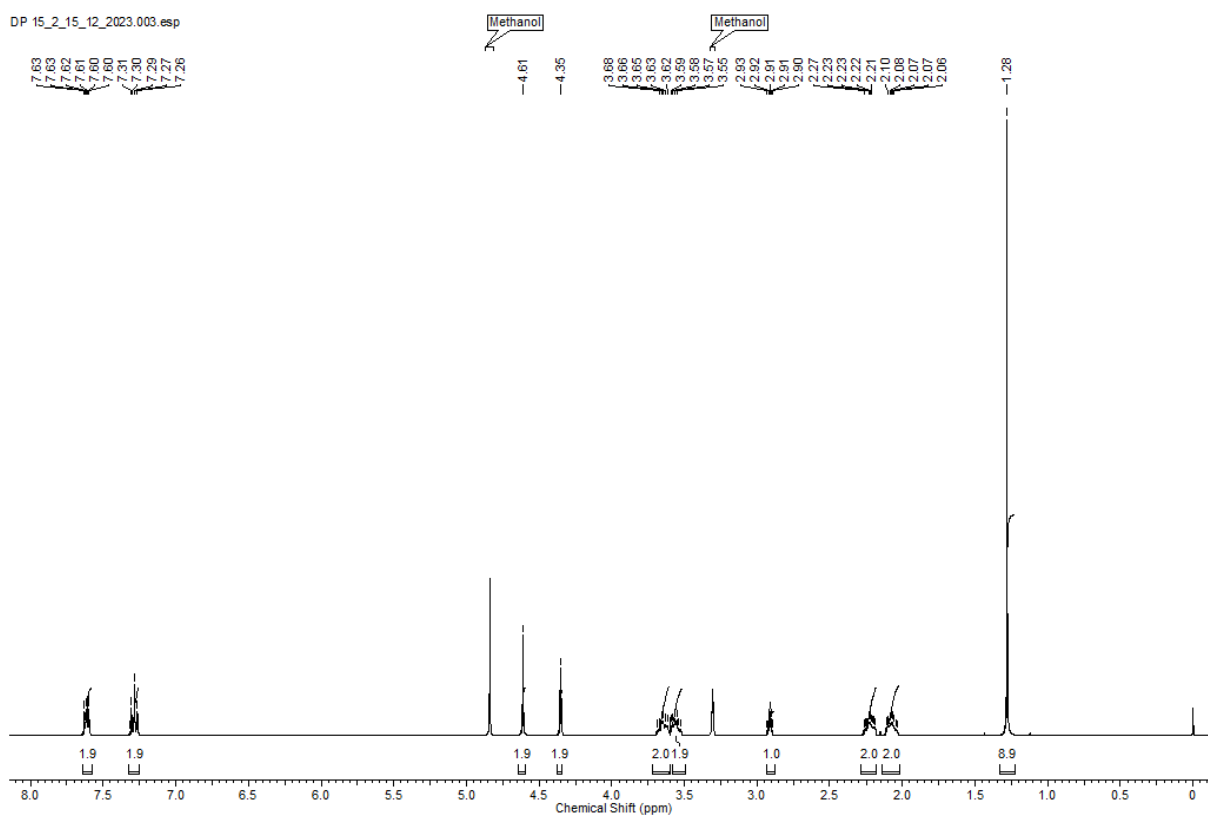
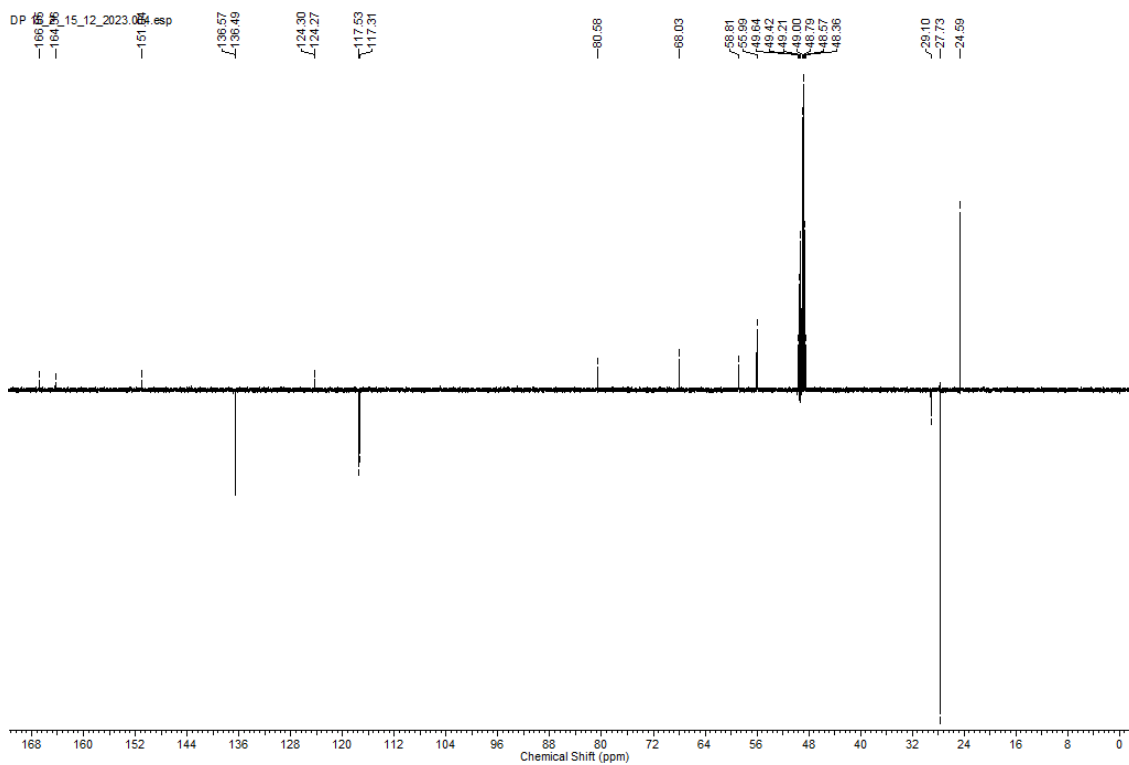
Slika D25. IR spektar spoja 9

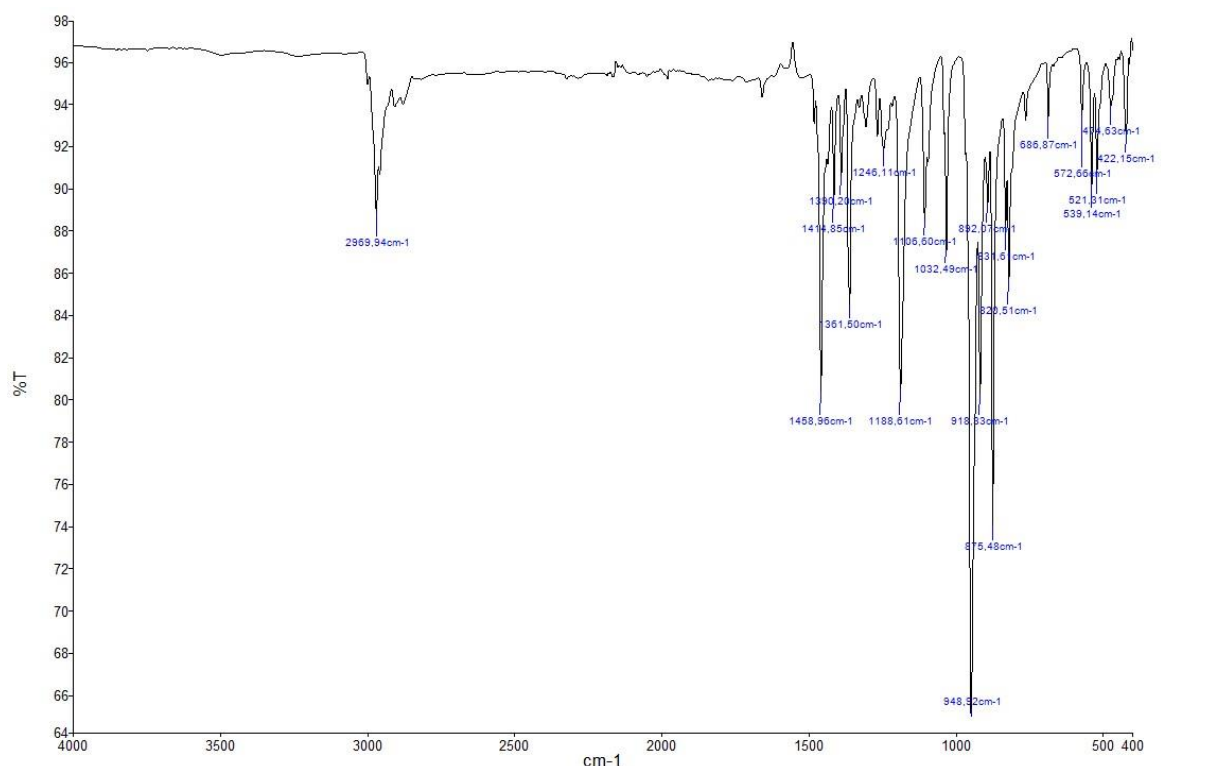
Slika D26. ^{13}C NMR spektar spoja 9 snimljen u MeOH

Slika D27. DEPT-Q spektar spoja **9** snimljen u MeOH8.1.10. *N*-(*p*-klorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj **10**)Slika D28. IR spektar spoja **10**

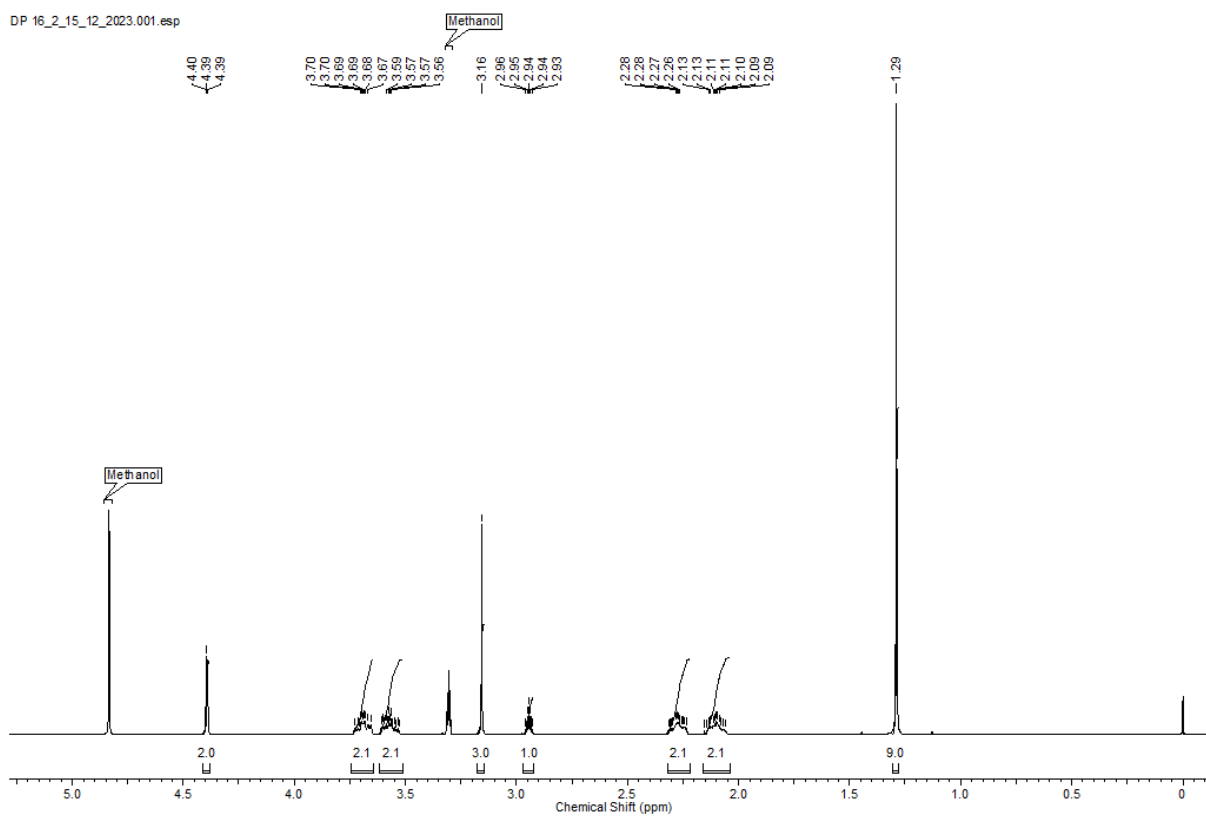
Slika D31. IR spektar spoja **11**Slika D32. ^1H NMR spektar spoja **11** snimljen u MeOH

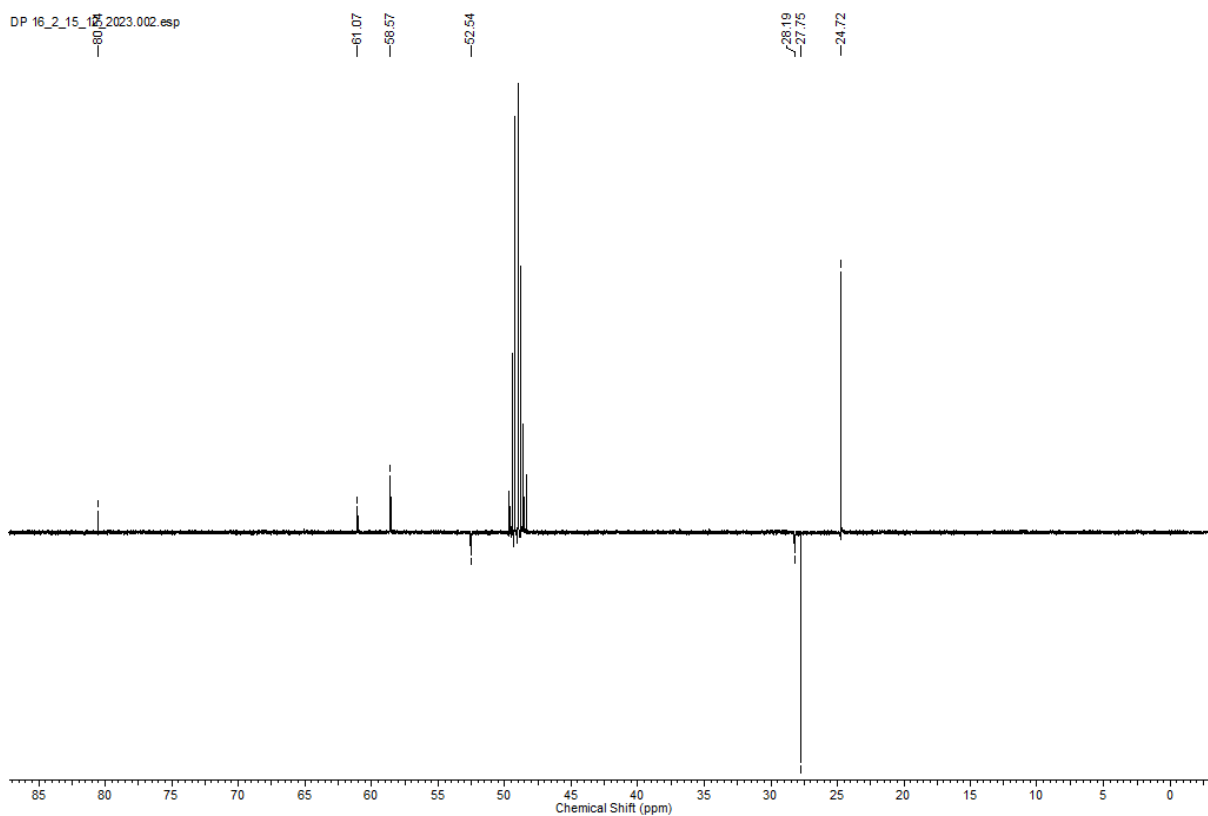
Slika D33. DEPT-Q spektar spoja **11** snimljen u MeOH8.1.12. *N*-(*p*-fluorbenzil)-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj **12**)Slika D34. IR spektar spoja **12**

Slika D35. ^1H NMR spektar spoja **12** snimljen u MeOHSlika D36. DEPT-Q spektar spoja **12** snimljen u MeOH

8.1.13. *N*-metil-3-((*tert*-butiloksi)imino)kinuklidinijev bromid (spoj 13)

Slika D37. IR spektar spoja 13



Slika D38. ^1H NMR spektar spoja **13** snimljen u MeOHSlika D39. DEPT-Q spektar spoja **13** snimljen u MeOH

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Dora Perić

Datum rođenja: 28. kolovoza 1999.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Obrazovanje

2006. – 2014. Osnovna škola Josipa Kozarca, Vinkovci

2014. – 2018. V. gimnazija, Zagreb

2018. – 2022. Prijediplomski sveučilišni studij Kemija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2022. – 2024. Diplomski sveučilišni studij Kemija – istraživački smjer, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2024. Međunarodna studentska razmjena: CEEPUS, stručna praksa, University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poljska

Nagrade i priznanja

2021. Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagreba za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici za sudjelovanje u projektu *Online Znanstvene čarolije*

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. 12. otvoreni dan kemije, Dan i noć na PMF-u