

Razvoj metode za pripravu amida pomoću enzima i kondenzacijskog reagensa

Zlatić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:697212>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Katarina Zlatić

Razvoj metode za pripravu amida pomoću enzima i kondenzacijskog reagensa

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratorij za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Majerić Elenkov i neposrednim vodioštvom dr. sc. Anamarije Knežević. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Maji Majerić Elenkov na pruženoj prilici i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se Institutu Ruđer Bošković koji mi je omogućio izradu diplomskog rada u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, te svim djelatnicima Laboratorija za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu na pruženoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Anamariji Knežević na uloženom trudu i vremenu, podršci, te prenesenom znanju i vještinama.

Također se zahvaljujem izv. prof. doc. dr. sc. Vesni Petrović Pekorović na pomoći i savjetima prilikom pisanja diplomskog rada.

Hvala mojim prijateljima i kolegama na pomoći, razumijevanju i podršci tijekom mog studiranja.

Veliko hvala mojim roditeljima i obitelji koji su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh, te bili bezuvjetna podrška tijekom čitavog mog školovanja.

Katarina

SADRŽAJ

SADRŽAJ	VII
SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. UVOD.....	1
1.2. CILJ I SVRHA RADA	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. AMIDI.....	3
2.2. SINTEZA AMIDA	5
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI I METODE.....	16
3.2. PRIPRAVA POLAZNIH SPOJEVA	18
3.3. METODA BAZNE KATALIZE	20
3.4. METODA ENZIMSKE KATALIZE	28
3.5. CalB-BOP METODA	36
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. PRIPRAVA POLAZNIH SPOJEVA	46
4.2. METODA BAZNE KATALIZE	47
4.3. METODA ENZIMSKE KATALIZE	53
4.4. CalB-BOP METODA	60
4.5. USPOREDBA METODA	69
§ 5. ZAKLJUČAK	71
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	72
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	74
§ 8. DODATAK	I
DODATAK 1: NMR spektri estera E1,E2 i E4	i
DODATAK 2: NMR spektri snimljeni u reakcijama bazne katalize	iv
DODATAK 3: NMR spektri snimljeni u reakcijama enzimske katalize	x
DODATAK 4: NMR spektri snimljeni u reakcijama CalB-BOP metode.....	xvii
DODATAK 5: Snimljeni IR spektri	xxi
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIII



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Razvoj metode za pripravu amida pomoću enzima i kondenzacijskog reagensa

Katarina Zlatić

Mnoštvo prirodnih organskih spojeva, kao i sintetiziranih biološki aktivnih spojeva, u svojoj strukturi sadrži amidnu vezu. Unatoč velikom broju metoda koje se koriste u pripravi amidne veze, i dalje postoji potreba za razvojem novih metoda.

U sklopu ovog diplomskog rada istraživana je jedna od metoda pripreme amidne veze reakcijom estera i amina koja obuhvaća primjenu enzima i kondenzacijskog reagensa kao katalizatora.

Reakcije amina i estera prvo su provedene u klasičnim bazno kataliziranim uvjetima, a zatim u prisutnosti enzima *Candida antarctica* lipaza B (CalB) kao katalizatora u bezvodnom organskom otapalu. Iste enzimski katalizirane reakcije provedene su i uz dodatak benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijevog heksafluorofosfata (BOP) kao kondenzacijskog reagensa. Uvjeti reakcija provedenih CalB-BOP metodom optimirani su u cilju dobivanja što boljih iskorištenja.

Usporedbom dobivenih rezultata na ispitanim esterima i aminima utvrđene su prednosti i nedostaci CalB-BOP metode, te je utvrđen potencijal ove metode u odnosu na reakcije provedene u klasičnim bazno kataliziranim uvjetima i enzimski katalizirane reakcije.

(75+23 stranica, 52 slika, 13 tablica, 22 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: amidna veza, benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat, *Candida antarctica* lipaza B, enzimski kataliza, kondenzacijski reagens, nukleofilna supstitucija na karbonilnom ugljiku.

Mentor: dr. sc. Maja Majerić Elenkov, viši znanstveni suradnik
Neposredni voditelj: dr. sc. Anamarija Knežević, viši asistent
Nastavnik: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Ocjenitelji:

1. Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
 2. Prof. dr. sc. Davor Kovačević
 3. Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
- Zamjena: Doc. dr. sc. Đani Škalamera

Datum diplomskog ispita: 29. rujan 2017.



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Development of the method for the preparation of amides using enzyme and coupling reagent

Katarina Zlatić

A lot of natural organic compounds and synthetic biologically active compounds contains amide bond. Despite a large number of methods used for the preparation of amides, there is still a need for development of new methods.

The aim of this diploma thesis is the study of the method for preparation of amides which includes the application of enzyme and coupling reagent as catalysts in the reaction between ester and amine.

The reactions of amines and esters were first carried out in terms of the classical base catalysed method, and then in terms of enzyme catalysed method (*Candida antarctica* lipase B (CalB) in organic solvent, anhydrous reaction conditions). The same reactions have been conducted with enzyme CalB and benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) as coupling reagent. Reaction condition of CalB-BOP reactions were optimised in order to obtain the best possible efficiency.

Advantages and disadvantages as well as the potential of the CalB-BOP method were determined by comparing obtained results of conducted base catalyse, enzyme catalysed and CalB-BOP catalysed reactions.

(75+23 pages, 52 figures, 13 tables, 22 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: amide bond, benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate, *Candida antarctica* lipase B, coupling reagent enzyme catalysis, nucleophilic substitution at the carbonyl group.

Mentor: Dr. Maja Majerić Elenkov, Senior Research Associate
Assistant mentor: Dr. Anamarija Knežević, Senior Research Assistant
Supervisor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
 2. Dr. Davor Kovačević, Professor
 3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Date of exam: 29th September, 2017

§ 1. UVOD

1.1. UVOD

Velik broj prirodnih organskih spojeva, kao i sintetiziranih biološki aktivnih spojeva, u svojoj strukturi sadrži amidnu vezu. Tako je kemijska veza koja povezuje aminokiselinske građevne blokove u protein upravo amidna veza, a više od 25 % lijekova na tržištu su amidi. Amidne veze vrlo su česte kako u malim organskim, tako i u vrlo kompleksim molekulama.¹

Najčešće korištena metoda pripreme amidne veze uključuje reakciju karboksilne kiseline i odgovarajućeg amina uz kondenzacijski reagens. Amidi lako nastaju u reakciji amina s acil-halogenidima ili anhidridima karboksilnih kiselina. Reakciju estera i amina kataliziraju i razni enzimi u organskim otapalima. Jedan od najčešće korištenih je lipaza B iz kvasca *Candida antarctica* (CalB).²

Prilikom pripreme [*N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida] amidnu vezu se pokušalo pripremiti iz odgovarajućeg estera i amina. Međutim, bazno katalizirana metoda i enzimski katalizatori nisu se pokazale uspješnim za pripravu navedenog spoja. Tako je konačni spoj pripremljen metodom koja uključuje enzim CalB i kondenzacijski reagens benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP) u organskom otapalu.³

Unatoč velikom broju metoda koje se koriste u pripravi amidne veze, i dalje postoji potreba za razvojem novih metoda. Cilj je između ostaloga koristiti dostupne i jeftine katalizatore i reagense, skratiti vrijeme pripreme, pojednostaviti obradu reakcije i, najbitnije, postići primjenu na što širi raspon supstrata.

Budući da se metoda koja uključuje reakciju enzimске hidrolize estera zajedno s BOP reakcijom (CalB-BOP) pokazala učinkovitom prilikom sinteze amida [*N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida]³, cilj ovog diplomskog rada jest primjena ove metode na veći broj estera i amina.

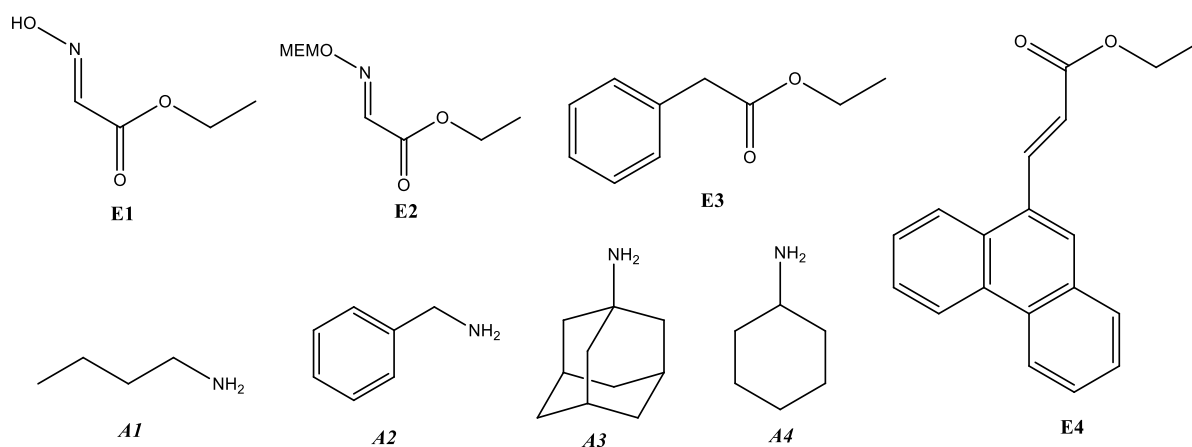
1.2. CILJ I SVRHA RADA

Cilj i svrha ovog diplomskog rada je optimizacija i primjena metode sinteze amida iz odabranih estera i amina koja uključuje enzim CalB i BOP kondenzacijski reagens kao katalizatore reakcije.

Navedenom metodom amidi će se pripraviti iz većeg broja odabranih estera i amina. Optimirani su uvjeti samih reakcija (temperatura, vrijeme reakcije, obrada reakcijske smjese) u cilju dobivanja što boljih iskorištenja. Također, dobiveni rezultati uspoređeni su u klasičnom bazno kataliziranom metodom dobivanja amida iz estera i amina, kao i s enzimski kataliziranom reakcijom uz CalB u organskom otapalu.

Molekule ciljanih amida najprije su se pokušale pripraviti klasičnom bazno kataliziranom metodom pripreme amida (EtOH, Et₃N, 70 °C) iz odgovarajućeg estera i amina. Pri tome su korišteni glioksilatoksimski esteri **E1**, **E2** u kombinaciji s raznim jednostavnijim i sterički zahtjevnijim alifatskim i aromatskim aminima **A1-A4** (slika 1). Kako bi se opseg reakcije proširio, korišteni su i aromatski esteri – jednostavniji etil-fenilacetat **E3** te sterički zahtjevniji etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat **E4**. Potom je ispitana priprava amida iz istih estera i amina u klasičnoj enzimski kataliziranoj reakciji pomoću CalB u organskom otapalu. Konačno, nakon optimiranja uvjeta CalB-BOP reakcije, provedene su reakcije pripreme istih amida CalB-BOP metodom.

Usporedbom dobivenih rezultata pokušat će se utvrditi koliko je širok raspon supstrata na koji je navedena metoda primjenjiva, te koji je potencijal ove metode u odnosu na klasične načine pripreme amida.



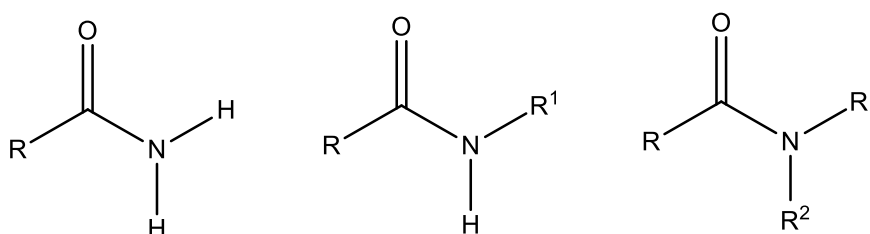
Slika 1. Strukturne formule korištenih estera **E1-E4** i amina **A1-A4** u reakcijama pripreme amida baznom katalizom, enzimskom katalizom i CalB-BOP metodom

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. AMIDI

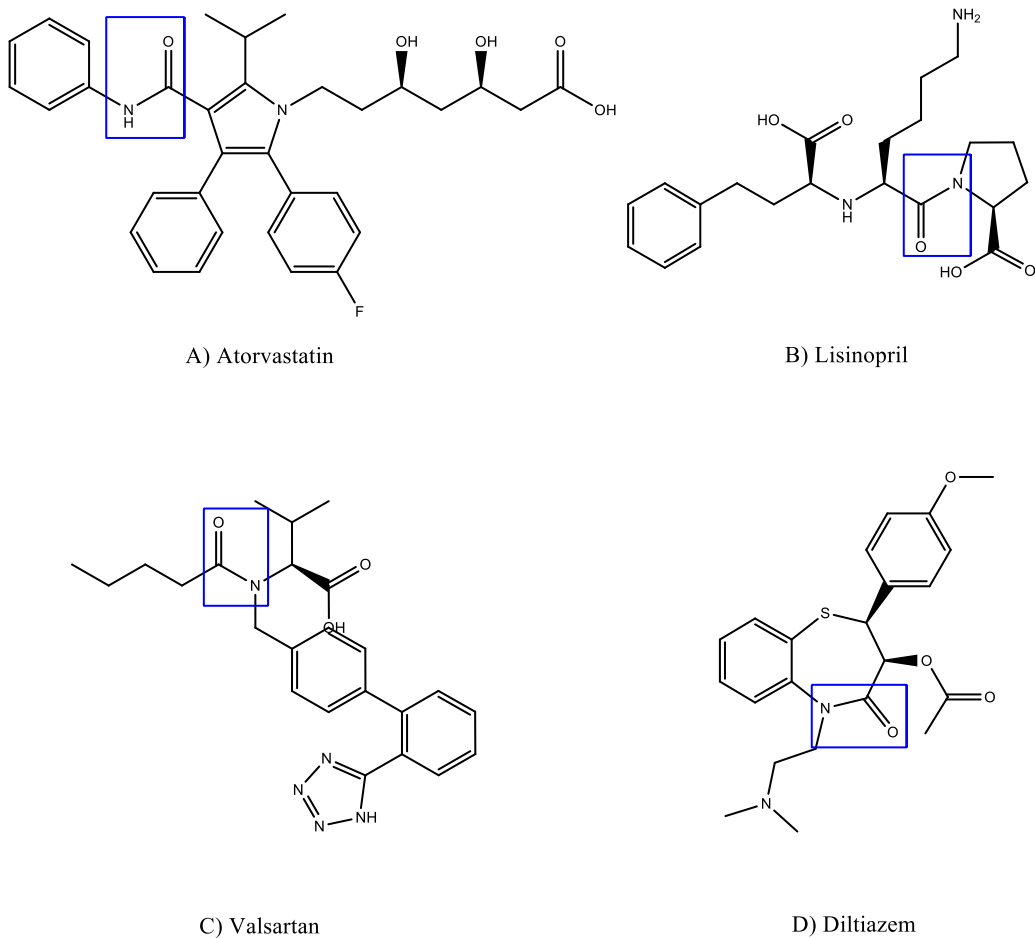
Amidi, odnosno spojevi koji sadrže amidnu vezu, mnogobrojni su i imaju široku primjenu, od prirodnih spojeva kao što su peptidi i proteini, do sintetskih polimera, lijekova i farmaceutskih proizvoda.^{1,4.}

Amidi su spojevi koji sadrže karbonilnu skupinu na koju je vezan dušik, odnosno amino-skupina (slika 2.).



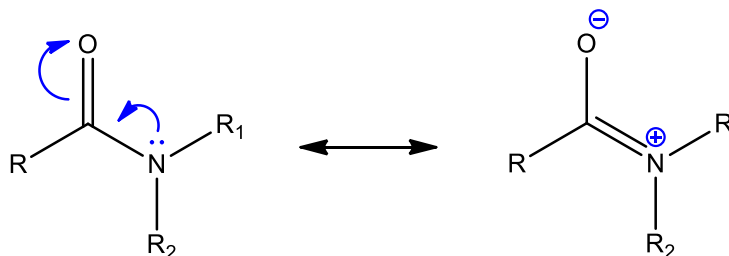
Slika 2. Općenite strukturne formule: a) primarnog, b) sekundarnog i c) tercijarnog amida

Amidna veze je vrlo raširena i važna u prirodi, primjerice amidnom vezom se povezuju aminokiseline čineći peptide i proteine. Osim toga amidi, odnosno spojevi koji sadrže amidnu vezu, često se primjenjuju u farmaceutskoj industriji kao aktivne tvari farmaceutskih proizvoda i lijekova. Primjerice, lijekovi Atorvastatin, Lisinopril, Valsartan i Diltiazem, sadrže amidnu vezu (slika 3).⁴



Slika 3. Strukturne formule molekula koje se koriste kao lijekovi te sadrže amidnu vezu⁴

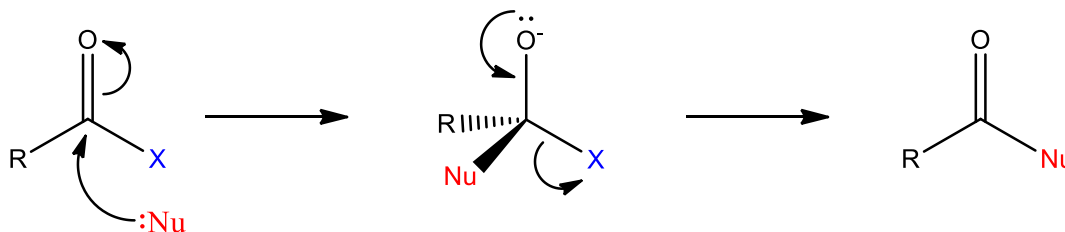
Zbog svoje strukture, amidna veza ima povoljna svojstva, kao što su velika polarnost, stabilnost i konformacijska raznovrsnost. Iz tog je razloga amidna veza vrlo popularna funkcijska skupina u svim granama organske kemije.¹ Povoljna svojstva posljedica su elektronegativnih atoma kisika i dušika što omogućuje delokalizaciju elektrona kroz vezu N-O čineći je jačom i stabilnijom (slika 4.).⁵



Slika 4. Delokalizacija elektrona u amidnoj vezi⁵

2.2. SINTEZA AMIDA

Jedna od klasičnih metoda pripreve amida je reakcija amina s derivatima karboksilnih kiselina koja se odvija mehanizmom nukleofilne supstitucije na karbonilnom ugljikovom atomu. Amin nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom derivata karboksilne kiseline, pri čemu dolazi do odcjepljenja izlazne skupine (slika 5.).⁵



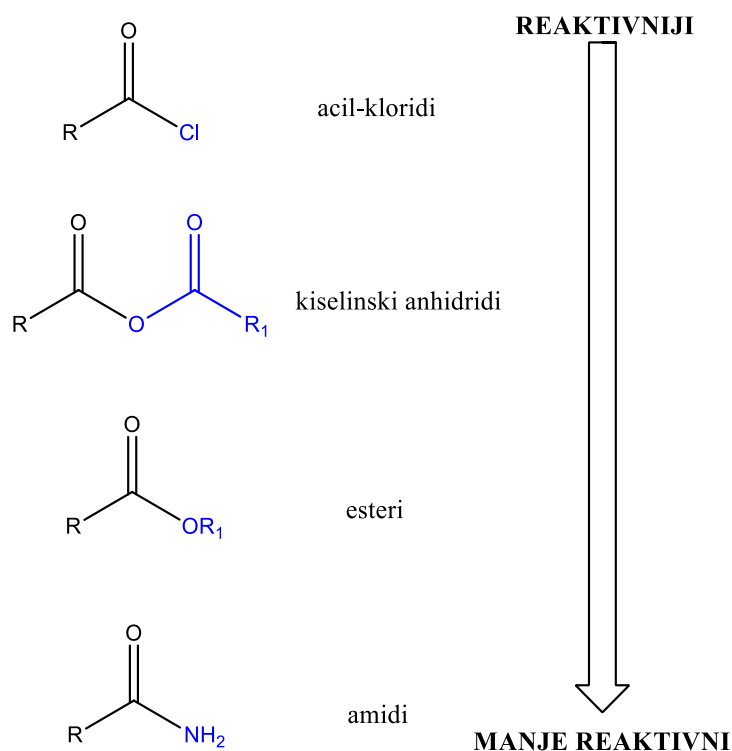
Slika 5. Mehanizam nukleofilne supstitucije na karbonilnom ugljikovom atomu (Nu=nukleofil, X=izlazna skupina)⁵

Brzina i uspješnost reakcije ovisi o nukleofilu i o izlaznoj skupini. U slučaju sinteze amida kao nukleofil djeluje amin koji je općenito vrlo dobar nukleofil. Bolja izlazna skupina povećava reaktivnost derivata karboksilne kiseline u reakcijama nukleofilne supstitucije (slika 6.).⁵

IZLAZNE SKUPINE			NUKEOFILI		
		pK_{aH}			pK_{aH}
BOLJE IZLAZNE SKUPINE ↓	R^-	50	↑ BOLJI NUKLEOFILI	R^-	50
	NH_2^-	35		NH_2^-	35
	RO^-	16		RO^-	16
	RCO_2^-	5		NH_3	9
	Cl^-	-7		RCO_2^-	5
				ROH	-5
				Cl^-	-7

Slika 6. Svojstva izlaznih skupina i nukleofila⁵

Esteri kao izlaznu skupinu sadrže alkoksidni ion koji nije dobra izlazna skupina (slika 6), te su anhidridi i acil-halogenidi reaktivniji u reakcijama nukleofilne supstitucije (slika 7.).⁵

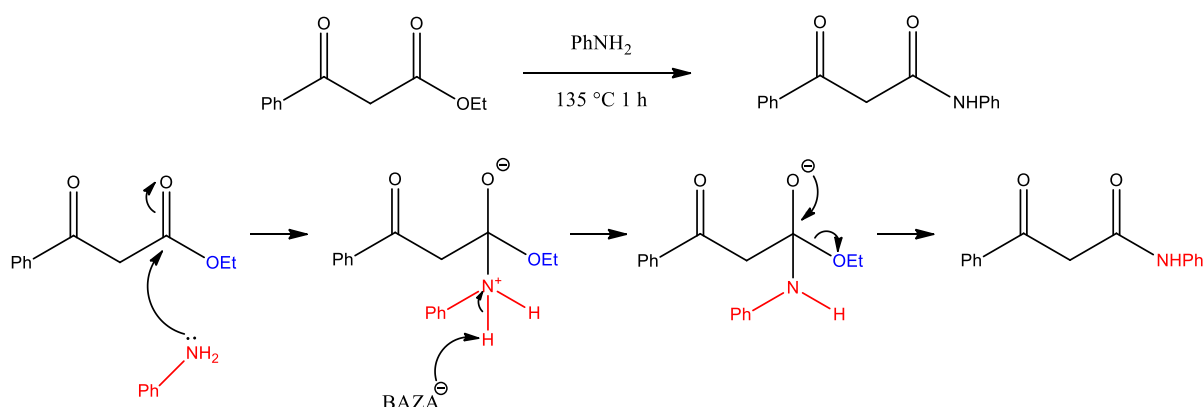


Slika 7. Reaktivnost derivata karboksilnih kiselina u reakcijama nukleofilne supstitucije na karbonilnom ugljikovnom atomu⁵

S obzirom na slabiju reaktivnost estera u reakcijama nukleofilne supstitucije na karbonilnom ugljikovom atomu, reakcije estera i amina je vrlo teško provesti bez dodatka katalizatora ili modifikacije estera u svrhu povećanja njegove reaktivnosti.⁵

2.2.1. Bazna kataliza

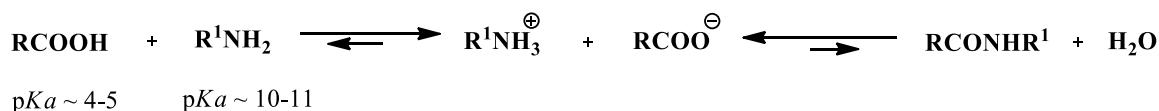
U organskoj kemiji razvijene su mnoge metode katalize. Jedna od najjednostavnijih klasičnih metoda katalize – bazna kataliza, može se primjeniti na reakcije sinteze amida iz amina i karboksilne kiseline ili derivata. Mehanizam reakcije u bazno kataliziranim uvjetima na primjeru reakcije estera i anilina prikazan je na slici 8.⁵ Baza odcjepljuje proton s dušika u tetraedarskom međuproduktu, odcjepljenje protona povećava elektronsku gustoću na dušiku što pogoduje odcjepljenu alkoksidnog iona.⁶



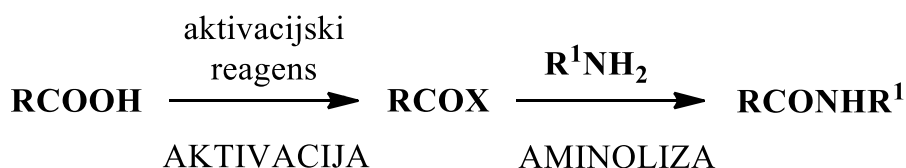
Slika 8. Mehanizam bazno katalizirane reakcije sinteze amida⁵

2.2.2. Kataliza korištenjem kondenzacijskog reagensa

Samom reakcijom između karboksilne kiseline i amina dolazi do nastanka stabilne soli. Nastajanje amida iz karboksilne kiseline i amina termodinamički je nepovoljno (slika 9.). Stoga je razvijena metoda u kojoj se karboksilna kiselina prvo “aktivira”, te zatim reagira s odgovarajućim aminom (slika 10.).⁷



Slika 9. Prikaz termodinamičke ravnoteže reakcije nastajanja amidne veze reakcijom karboksilne kiseline i amina⁷



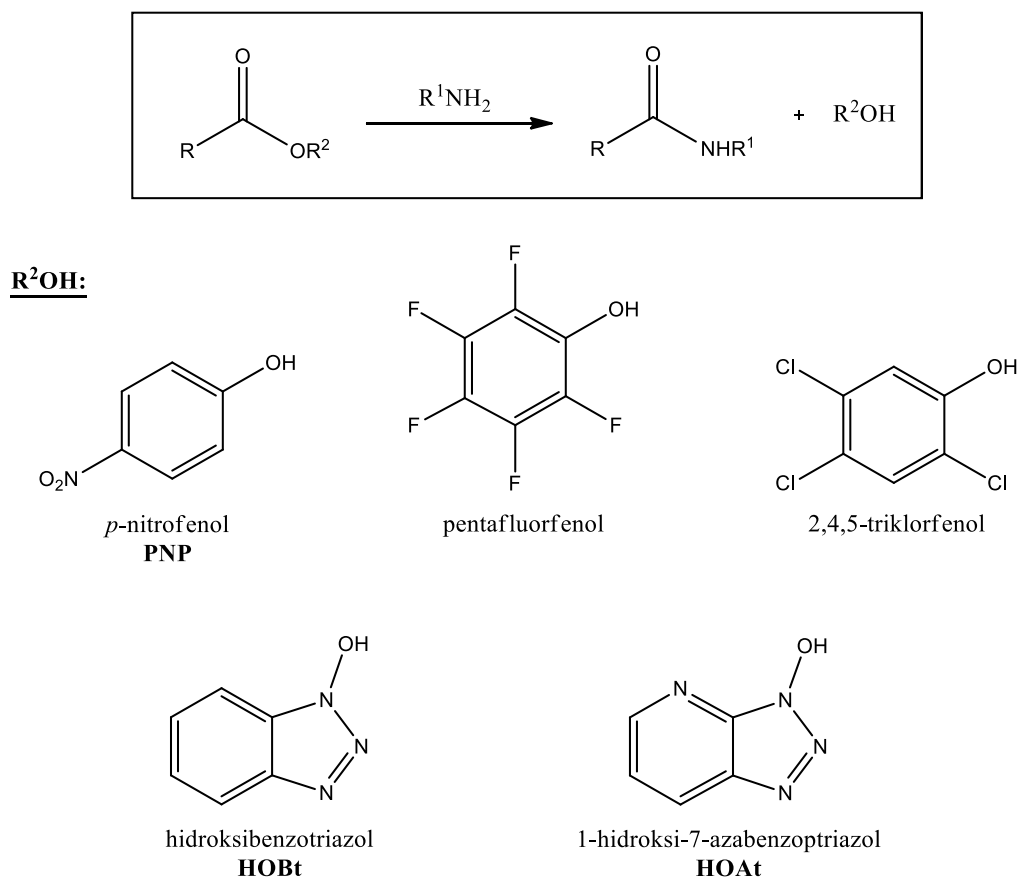
Slika 10. Shema sinteze amida iz karboksilne kiseline uz aktivaciju karboksilne kiseline⁷

Karboksilne kiseline najčešće se aktiviraju prevođenjem u acil-halogenide, azide, acil-imidazole, anhidride, aktivirane estere.^{4,7} Reagensi koji se koriste za prevođenje karboksilne kiseline u navedene derivate nazivaju se kondenzacijski reagensi (eng. *coupling reagents*). Kondenzacijski reagensi su spojevi koji reagiraju s karboksilnom kiselinom, te je prevode u reaktivniji spoj na način da se –OH skupina zamjeni halogenidom, azidom, acilom ili nekom drugom skupinom koja je bolja izlazna skupina.⁷

Razvijene su mnoge metode i kondenzacijski reagensi koji se koriste za aktivaciju karboksilnih kiselina ili estera u reakcijama sinteze amida. Tako se na primjer karboksilne kiseline ili esteri mogu prevesti u acil-halogenide korištenjem reagensa kao što su tionil-klorid (SOCl₂), fosforov triklorid (PCl₃), fosforov pentaklorid (PCl₅).⁸ Acil-azidi mogu se pripremiti korištenjem difenilfosforovog azida⁹ (DPPA), a acil-imidazoli reakcijom s karbonildiimidazolom¹⁰ (CDI).⁷

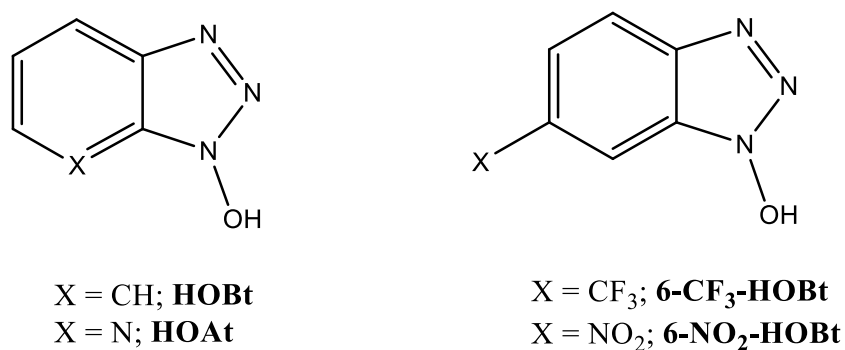
Esteri koji kao izlaznu skupinu imaju –OR, pri čemu je R neki alkil, nisu jako reaktivni u reakcijama s aminima. Postoje tzv. aktivirani esteri koji umjersto alkila kao R imaju neku drugu skupinu koja je bolja izlazna skupina. Tako se primjerice aromatski esteri lakše hidroliziraju nego alkilni esteri, te lakše reagiraju s nukleofilima poput amina. Također, elektron-odvlačeća svojstva alkohola korištenog za pripremu aktiviranog estera povećavaju elektrofilnost karbonilnog ugljikovog atoma, što pogoduje reakciji, odnosno nukleofilnom napadu amina.⁷

Strukture nekih od aktiviranih estera koji se često koriste prikazane su na slici 11. Za pripremu aktiviranih estera najčešće se koriste karbodiimidi, te fosfonijeve i amonijeve soli.¹¹



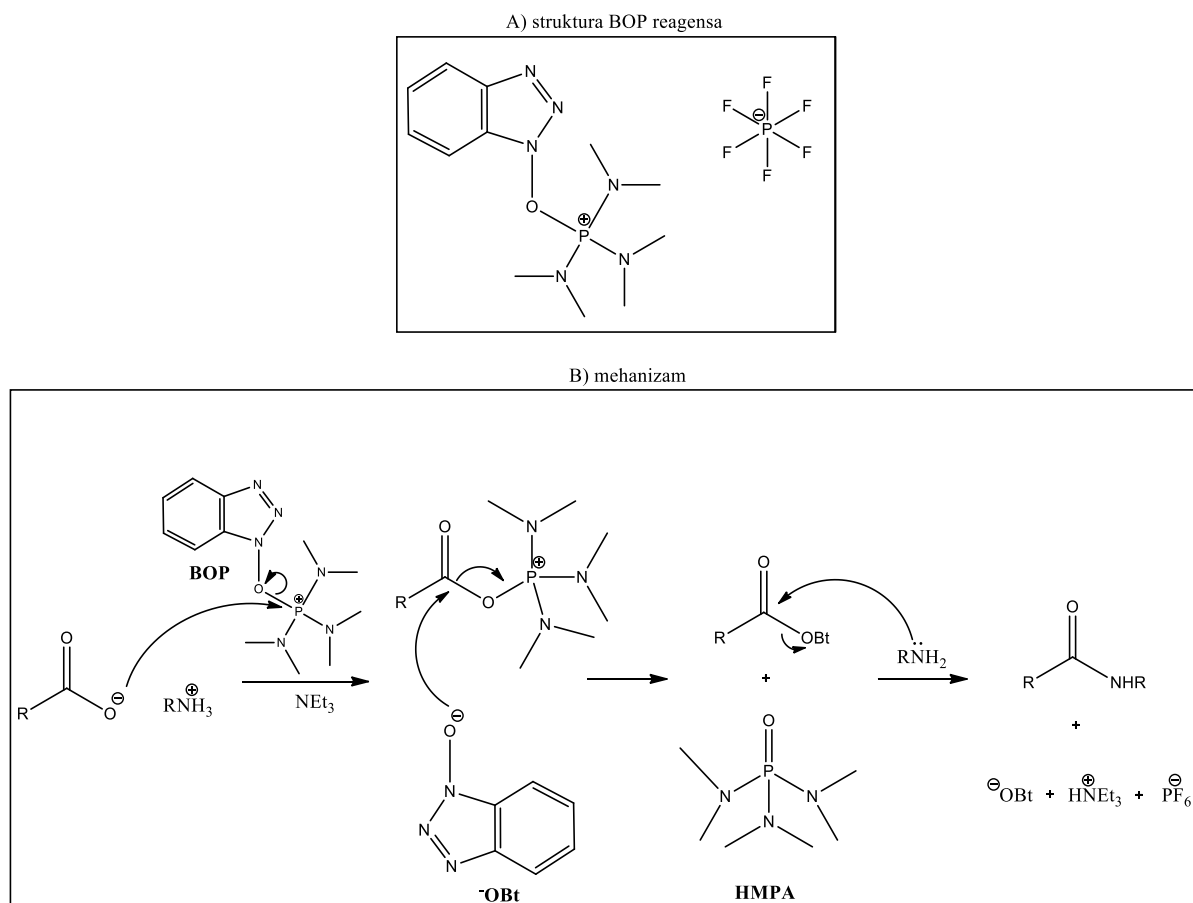
Slika 11. Strukturne formule aktiviranih estera koji se koriste u pripravi amida⁷

Aktivacija estera pripravom *N*-hidroksi-spojeva često se koristi zbog elektronegativnog atoma dušika koji ima elektron odvlačeća svojstva.¹² Povećanjem broja heteroatoma u strukturi kondenzirajućeg reagensa povećava se elektron odvlačeći utjecaj, te su zbog toga razvijeni benzotriazolni reagensi kao što su HOBt, HOAt, 6-CF₃-HOBt, 6-NO₂-HOBt (slika 12.).^{7,11}



Slika 12. Strukturne formule benzotriazolnih kondenzirajućih reagensa⁶

Benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP, Castrov reagens) fosfonijeva je sol često korištena kao kondenzacijski reagens.¹³ BOP sadrži benzotriazolnu skupinu (-OBt) vezanu na tri(dimetilamin)fosforni kation; njegova struktura kao i mehanizam reakcije prikazan je na slici 13.⁷



Slika 13. a) Strukturna formula BOP reagensa i b) mehanizam nastajanja amida uz BOP kao katalizator⁷

Reakcija se provodi u baznim uvjetima (kao baza se najčešće koristi trietilamin ili *N,N*-diizopropiletilamin-DIPEA, Hünigova baza) u kojima je karboksilna kiselina u deprotoniranom obliku. Negativno nabijeni kisikov atom nukleofilno napada pozitivno nabijeni atom fosfora BOP-a pri čemu nastaje međuprodukt – sol acil-fosfonijevog kationa i aniona benzotriazola (-OBt). Zatim dolazi do nastanka acil-OBt aktiviranog estera pri čemu nastaje nusprodukt heksametilfosfortriamid (HMPA). Nastali aktivirani ester zatim reagira s aminom te nastaje amid.⁷

2.2.3. Enzimsko kataliza

Još jedan način priprave amida, odnosno metoda katalize reakcije nastanka amidne veze je enzimsko kataliza.

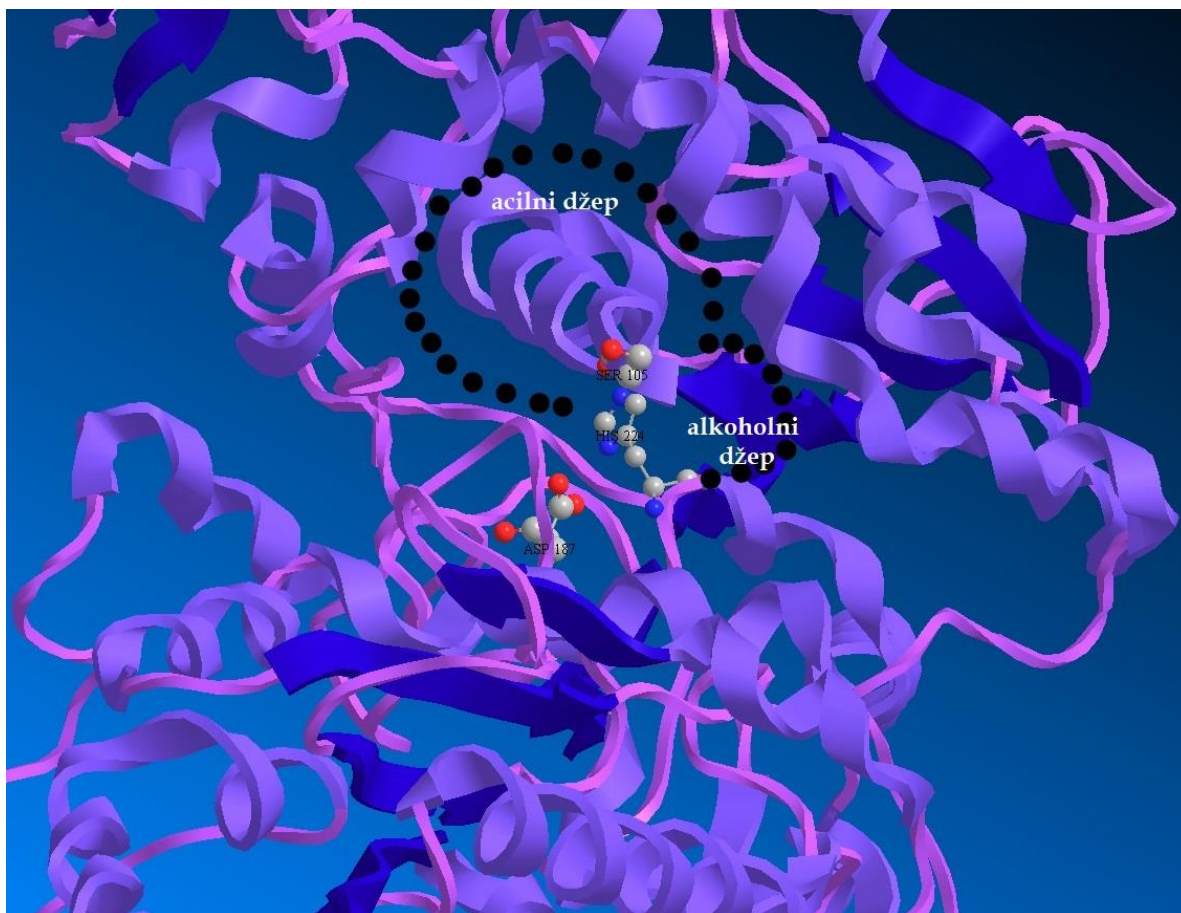
Enzimi kao katalizatori već se dugi niz godina uspješno koriste u organskoj sintezi. Zbog selektivnosti i specifičnog kemijskog okruženja koje čini aktivno mjesto enzima, reakcije u kojima se koristi enzim kao katalizator mogu povećati iskorištenja i omogućiti nastajanje produkata koji ne nastaju u reakcijama kataliziranim uobičajenim organskim i anorganskim katalizatorima. Osim navedenoga imaju i posebnu primjenu u reakcijama gdje je potrebna enantioelektivnost, kemoselektivnost i/ili regioelektivnost.

U organskoj sintezi, zbog velikog raspona reakcija koje mogu katalizirati te primjeni na velik broj molekula koje su pogodne kao supstrati, najčešće se koriste hidrolitički enzimi. Osim toga, hidrolitički enzimi aktivni su blagim uvjetima, komercijalno su dostupni, te im nije potreban kofaktor za reaktivnost.^{2,14}

Lipaze (EC 3.1.1.3) pripadaju skupini hidrolitičkih enzima, te su jedni od najviše korištenih biokatalizatora. Njihova primjena uključuje kemoselektivne, regioelektivne i stereoselektivne reakcije kao što su primjerice kinetička rezolucija racemičnih alkohola, kiselina estera ili amina kao i desimetrizaciju prokiralnih ili meso spojeva, ali i nekonvencionalne reakcije kao što su aldolna reakcija i Michaelova adicija.^{2,15}

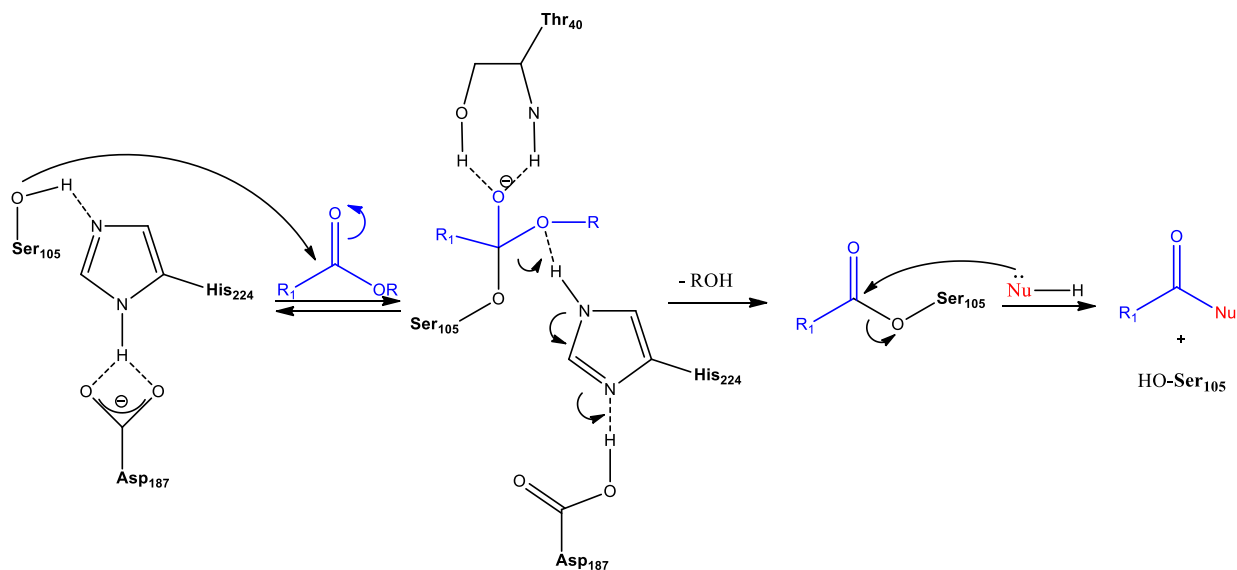
Lipaza B iz kvasca *Candida antarctica* (CalB) jedan je od najkorištenijih hidrolitičkih enzima iz skupina lipaza, te je vrlo uspješan katalizator za sintezu amina i amida. CalB enzim sadrži 317 aminokiselinskih ostataka i ima masu 33 kDa, a prvi je put izoliran iz kvasca *Candida antartica*. Kasnije se koriste i lipaze iz različitih mikrobijalnih izvora.

CalB u aktivnom mjestu sadrži katalitičku trijadu Asp-His-Ser iznad koje se nalazi veliki hidrofobni džep, a ispod manji. Acilni dio supstrata veže se u veliki hidrofobni džep, dok se izlazna skupina/nukleofil vežu u manji hidrofobni džep ispod (slika 14.).²



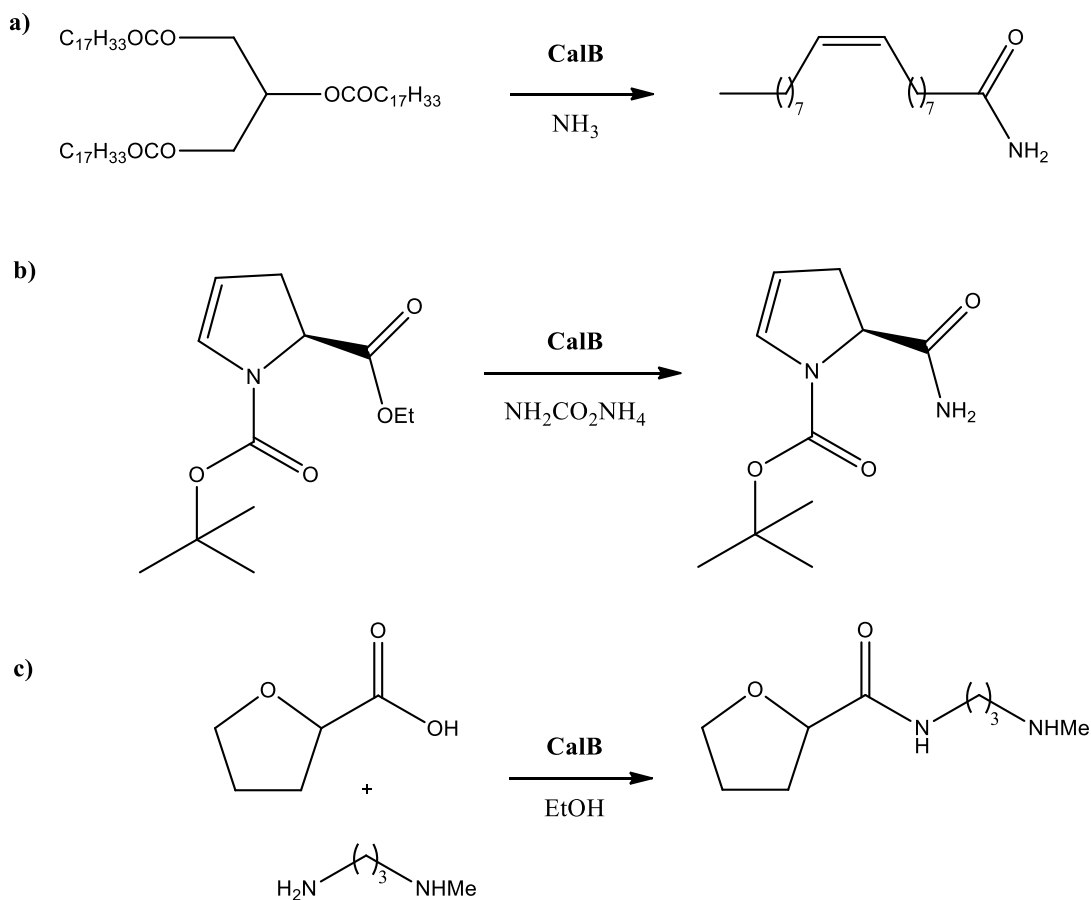
Slika 14. Aktivno mjesto lipaze B iz kvasca *Candida antarctica*¹⁶

Prilikom enzimski katalizirane reakcije, reaktant ester reagira s –OH skupinom serinskog ostatka pri čemu nastaje tetraedarski acil-enzim međuprodukt (slika 15.). Zatim se alkoholni ostatak molekule oslobađa pri čemu acilni dio ostaje vezan na serinski ostatak enzima. U sljedećem koraku, nukleofil napada karbonilni C-atom koji je vezan na enzim pri čemu dolazi do oslobađanja produkta koji je, u slučaju da je nukleofil amin, amid.¹⁷



Slika 15. Mehanizam katalize lipaze B iz kvasca *Candida antarctica*¹⁷

U literaturi su opisane mnoge uspješno provedene reakcije aminolize estera i kondenzacije karboksilinih kiselina i amina katalizirane lipazama. Neki od primjera provedenih reakcija prikazani su na slici 16.²



Slika 16. Sintaza: a) oleamida,¹⁸ b) pirol-amida,¹⁹ c) *N*-supstituiranog amida²⁰

Iako enzimska kataliza ima mnogih prednosti nad klasičnim metodama katalize, aktivno mjesto enzima prostorno je ograničeno, što može otežavati vezanje supstrata, ili pristup nukleofila karbonilnoj skupini supstrata. S druge strane, navedeno omogućuje korištenje enzima za kinetičku rezoluciju, ali može otežavati, odnosno onemogućavati, katalizu reakcija onih molekula koje se zbog veličine ili strukture ne mogu vezati u aktivno mjesto ili im je iz istih razloga ograničen pristup potrebnim funkcijskim skupinama reaktanta ili enzima.

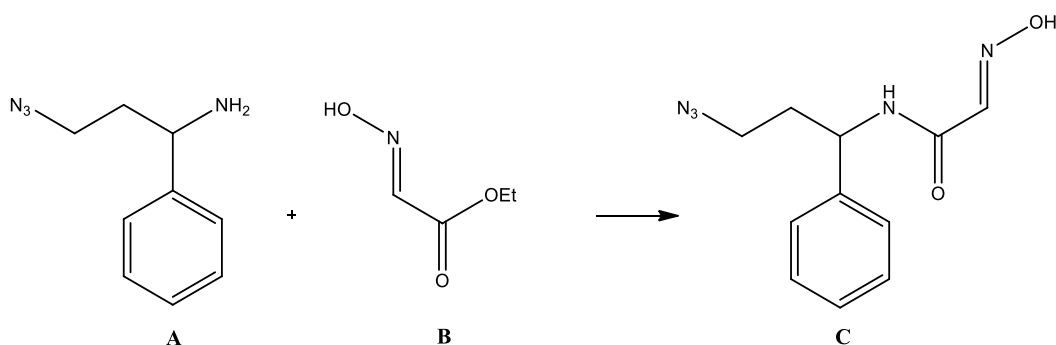
Prilikom upotrebe enzima kao katalizatora važan je i odabir otapala. Naime, u reakcijama u kojima se koriste lipaze kao na primjer CalB, voda kao otapalo, ali i sami tragovi vode u organskom otapalu, pogoduju reakcijama hidrolize. Tako u reakcijama aminolize, ako reakcijska smjesa sadrži tragove vode, enzim će katalizirati reakciju hidrolize acilnog donora, estera. Hidroliza, kao kompetentna reakcija, može znatno utjecati na iskorištenje reakcije aminolize, dok veća količina oslobođene kiseline može uzrokovati deaktivaciju enzima. Zbog navedenog je prilikom enzimski kataliziranih reakcija sinteze amida aminolizom estera ili sličnih reakcija potrebno osigurati suhe uvjete.²¹

2.2.4. Kataliza korištenjem enzima i kondenzacijskog reagensa

Kao što je već spomenuto, enzimi su vrlo učinkoviti katalizatori, ali ograničeni zbog prostornih i strukturnih karakteristika aktivnog mjesta. U reakcijama sinteze amida iz estera i amina, potrebno je uspješno vezanje i smještanje i amina i estera u aktivno mjesto enzima.

Zbog navedenih nedostataka same enzimске katalize razvijena je metoda u kojoj se za pripravu amida koriste i enzim i kondenzacijski reagens kao katalizatori. Metoda je razvijena prilikom sinteze *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida.³

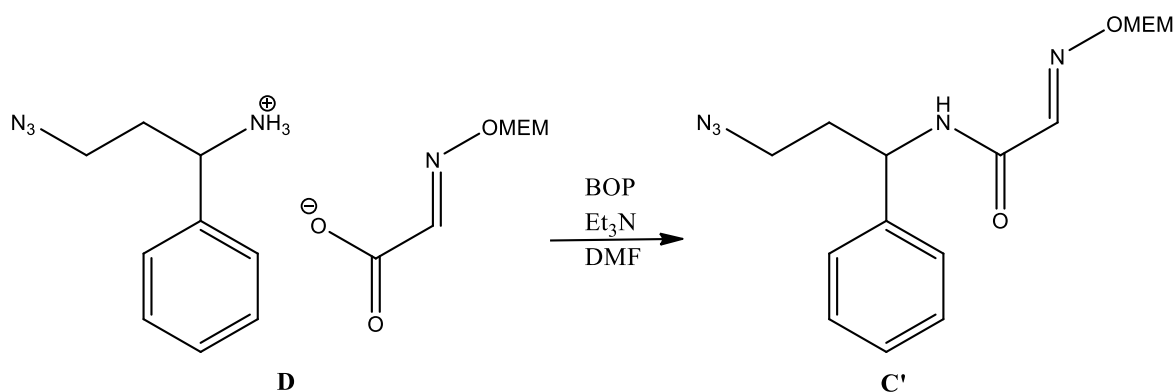
Provedena je reakcija amina **A** (3-azido-1-fenilpropilamin) i estera **B** (etilglioksilat oksim), ali niti bazno niti enzimski kataliziranim reakcijama nije nastao željeni produkt **C** (slika 17.).³



Slika 17. Shema sinteze amida **C** reakcijom amina **A** i estera **B**³

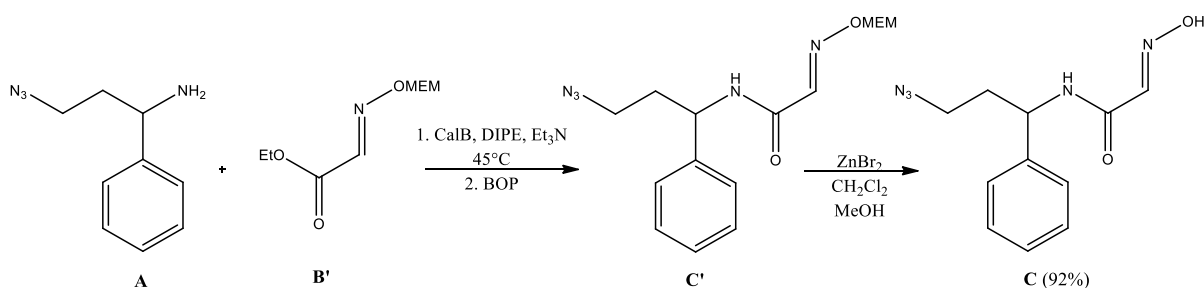
Reakcija u baznim uvjetima provedena je u različitim otapalima, korištenjem različitih baza, na više različitih temperatura i različitih vremena trajanja reakcija, ali ni u jednom slučaju sinteza nije bila uspješna.

Enzimskom katalizom uz enzim CalB kao katalizator također nije došlo do nastajanja produkta **C**. Međutim, u enzimski kataliziranoj reakciji izolirana je sol **D** uz iskorištenje od 96 %. Nastajanje i izolacija soli estera i amina upućuje na to da je enzimskom katalizom došlo do hidrolize estera. Dodatkom BOP kondenzirajućeg reagensa nastao je amid **C'** uz iskorištenje od 65 % (slika 18.).³



Slika 18. Nastajanje amida **C'** korištenjem BOP kondenzirajućeg reagensa³

Bazna kataliza i enzimsko kataliza pokazale su se kao neuspješne metode za sintezu amida **C**, te je zbog toga razvijena CalB-BOP metoda, u kojoj enzim katalizira hidrolizu estera, a BOP nastajanje amidne veze iz soli dobivene hidrolizom estera i amina (slika 19.).



Slika 19. Sinteza *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida **C** CalB-BOP metodom³

S obzirom da navedena metoda nije do sada primjenjivana za sintezu drugih amida, potrebno ju je više istražiti kako bi se utvrdila njezina učinkovitost i primjenjivost u sintezi drugih amida.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Spektri nuklearne magnetske rezonancije (^1H i ^{13}C) snimljeni su na Bruker AV 300 spektrometru. Kao unutrašnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS). Signali su označeni kao s = singlet, d = dublet, q = kvartet, m = multiplet. Korekcije iskorištenja reakcija s obzirom na signale onečišćenja primjećених u NMR spektrima produkata izračunate su pomoću formule²²:

$$r_{A/B} = \frac{I_{A/N_A}}{I_{B/N_B}}; n_A = r_{A/B} * n_B; I - \text{integral}, \quad N - \text{broj jezgri}, \quad n - \text{množina}$$

Analiza spojeva IR spektroskopijom provedena je na instrumentu Bruker ABB Bomem FT-IR, tehnikom KBr pastile. Signali su označeni prema intenzitetima u spektru kao s = jak signal, m = srednje jak signal, w = slab signal.

Snimljeni spektri asignirani su u poglavlju § 3 i prikazani u poglavlju § 7.

Za analizu spojeva masenom spektrometrijom (MS) korišten je sustav spregnut s tekućinskom kromatografijom (LC/MS) s instrumentima: HPLC - Agilent Technologies 1200 Series s binarnom pumpom, degazerom i autosamplerom, MS - Agilent Technologies 6420 Triple Quad LC/MS opremljen electrospray ionizacijskim izvorom.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) provedena je tehnikom obrnutih faza na Shimadzu 10A VP HPLC sustavu (pumpa LC-IOAD VP, degazer DGU-14A, grijač kolone CTO-10AC VP, gradijentni sklop za miješanje FCV-10AL VP, upravljački sklop SCL-10A VP, UV detektor SPD-M10A) uz gradijentno ispiranje na koloni Nucleosil 100-5 C18, veličina: 250 x 4,6 mm. Korištene su slijedeće pokretne faze: pokretna faza A: 10 % MeOH; 0,5 % H_3PO_4 (85 %)/ H_2O , pokretna faza B: MeOH. Mjerenja su provedena na 35 °C uz protok 1 mL/min, te su spojevi detektirani na 200-400 nm.

Tankoslojna kromatografija provedena je na pločicama silika-gela koji su proizvod tvrtke Sigma Aldrich uz detekciju pomoću UV lampe pri 254 nm.

Pročišćavanje reakcijskih smjesa provedeno je kolonskom kromatografijom sa nepokretnom fazom silika-gela. Korištene su dvije vrste silika-gela: silika-gel *flash* (veličina

pora: 60 Å, 220-440 veličina mreže čestica, veličina čestica: 35-75 µm), te silika-gel *normal* (veličina pora: 60 Å, 70-230 veličina mreže čestica, veličina čestica: 63-200 µm)

Korišteni enzim *Candida antarctica* lipaza B (CalB) proizvod je tvrtke Sigma-Aldrich (Lipase acrylic resin from *Candida antarctica*, ≥5000 U/g, recombinant, expressed in *Aspergillus niger*).

Ostale korištene kemikalije i otapala prikazane su u tablici 1., uz navedene proizvođače kemikalija, te kratice korištene u daljnjem tekstu.

Tablica 1. Kemikalije i otapala korišteni u reakcijama uz navedene proizvođače i korištene kratice

KORIŠTENA KEMIKA LIJA	KORIŠTENA KRATICA	PROIZVOĐAČ
1-adamantilamin	A3	Sigma Aldrich
amonijev klorid	NH ₄ Cl	Kemika
benzotriazol-1-ilokstris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat	BOP	Ark Pharm
benzilamin	A2	Sigma Aldrich
<i>n</i> -butilamin	A1	Fluka
cikloheksilamin	A4	Fluka
<i>N,N</i> -diisopropiletilamin	DIPEA	Fluka
etil-fenilacetat	E3	Sigma Aldrich
etil-glioksilat (50 % toluen)		Fluka
hidroksilamin hidroklorid	NH ₂ OH * HCl	Sigma Aldrich
2-metoksietoksimetil-klorid	MEMCl	Fluka
natrijev sulfat (bezvodni)	Na ₂ SO ₄	Gram Mol
silika-gel – veličina čestica 63-200 µm	silika-gel <i>normal</i>	Fluka
silika-gel – veličina čestica 35-75 µm	silika-gel <i>flash</i>	Sigma Aldrich
triethylamin	Et ₃ N	Fluka
KORIŠTENA OTAPALA		
acetonitril	CH ₃ CN	
diklormetan	DCM	
diizopropileter	DIPE	
etanol	EtOH	
etil-acetat	EtOAc	
<i>n</i> -heksan		
metanol	MeOH	
metil- <i>tert</i> -butil-eter	MTBE	

3.2. PRIPRAVA POLAZNIH SPOJEVA

3.2.1. Priprava etil-glioksilat oksima (E1)

Suspenzija 50 %-tne otopine etil-glioksilata u toulenu (15,06 g; 0,07 mol; 1 ekv.) i hidroksilamin hidroklorida (5,15 g; 0,07 mol; 1 ekv.) u $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 9/1$ ($V_{\text{uk}} = 60$ ml) miješa se na magnetskoj mješalici 5 minuta. Zatim se polako doda trietilamin (10,4 ml; 0,07 mol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa miješa se sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon 1 sat otapalo se upari, u ostatak dodaje se voda (20 ml) i etil-acetat (60 ml). Otopina se ekstrahira, te se organski sloj ispere sa zasićenom otopinom amonijevog klorida (20 ml) i vodom (20 ml). U organski sloj dodaje se bezvodni natrijev sulfat, smjesa se profiltrira, te se filtrat upari do konačnog produkta etil-2-(hidroksiimino)acetata (etil-glioksilat oksim), **E1**.

Dobiveno je 6,74 g (78 %) žute uljaste tekućine. Produktu je snimljen ^1H NMR spektar čime je potvrđeno da je izolirani produkt ester **E1**.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,59 (s, 1H, H-C=N-); 4,35 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2-$); 1,37 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_3$).

3.2.2. Priprava etil-MEM-glioksilat oksima (E2)

Pripravljeni etil-glioksilat oksim **E1** (2,00 g; 17,1 mmol; 1 ekv) otopi se u DCM (40 ml), u inertoj atmosferi (Ar) te se doda DIPEA (4,9 ml; 27,8 mmol; 1,6 ekv). Zatim se doda pola ukupnog volumena 2-metoksietoksimetil klorida (ukupno: 2,2 ml; 27,8 mmol; 1,6 ekv). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj mješalici 1-2 sata, te se zatim doda ostatak 2-MEMCl. Reakcijska smjesa se miješa preko noći (24 sata). Zatim se u reakcijsku smjesu doda DCM (100 ml), te se otopina ekstrahira sa zasićenom otopinom amonijevog klorida (80 ml) i vodom. Organski sloj suši se dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata, smjesa se filtrira, te se filtrat upari pri tlaku od 100 mbar. Sirovi produkt pročisti se na kromatografskoj koloni silika-gela *normal* uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 50/1.

Dobiveno je 2,46 g (70 %) žute uljaste tekućine. Produktu su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri čime je potvrđeno da je izolirani produkt etil 2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-olat (etil-MEM-glioksilat oksim) **E2**.

R_f (**E1**, DCM/MeOH=50/1) = 0,30.

R_f (**E2**, DCM/MeOH=50/1) = 0,54.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,58 (s, 1H, H-C=N); 5,35 (s, 2H, -CH₂-MEM); 4,33, (q, 2H, J = 7,1 Hz, -CH₂-); 3,80 (t, 2H, J = 4,8 Hz, -CH₂-MEM); 3,56 (t, 2H, J = 4,8 Hz, -CH₂-MEM); 3,39 (s, 3H, -CH₃-MEM); 1,35 (t, 3H, J = 7,0 Hz, -CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ /ppm: 161,26 (C=O); 142,06 (HC=N); 98,62 (-CH₂-MEM); 71,08 (-CH₂-MEM); 68,23 (-CH₂-MEM); 61,28 (-CH₂-); 58,56 (-CH₃-MEM); 13,61 (-CH₃).

3.3. METODA BAZNE KATALIZE

3.3.1. Reakcije etil-glioksilat oksima

Etil-glioksilat oksim **E1** (200 mg, 1,7 mmol) otopi se u etanolu (8 ml) nakon čega se doda odgovarajuća količina amina (tablica 2.; 1,1 ekv.) i trietilamin (477 μ l, 3,4 mmol; 2 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa 48 sati na magnetskoj mješalici uz zagrijavanje na 65 °C. Otapalo se upari, te se sirovi produkt pročisti na kromatografskoj koloni.

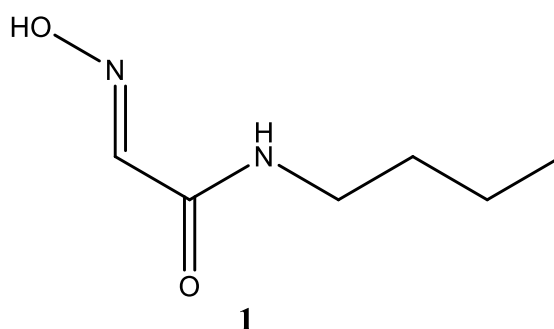
Tablica 2. Količine amina korištene u reakcijama

amin	<i>n</i> / mmol	<i>V</i> / μ l	<i>m</i> / mg
<i>n</i>-butilamin	1,9	188	-
benzilamin	1,9	208	-
1-adamantilamin	1,9	-	287
cikloheksilamin	1,9	218	-

***N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamid (1)**

Reakcijska smjesa reakcije **E1** s *n*-butilaminom pročišćena je na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 20/1.

Dobiveno je 126 mg (51 %) bijele praškaste krutine. Produktu su snimljeni ^1H NMR, ^{13}C NMR i IR spektri čime je potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamid **1** (slika 20.).



Slika 20. Strukturna formula *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1**

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,36.

R_f (**1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,17.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9,92 (s, 1H, -OH); 7,52 (s, 1H, H-C=N-); 6,69 (s, 1H, -NH-); 3,34 (q, 2H, $J = 6,7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-}n\text{Bu}$); 1,59 – 1,49 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-}n\text{Bu}$); 1,43 – 1,30 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-}n\text{Bu}$); 0,93 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_3\text{-}n\text{Bu}$).

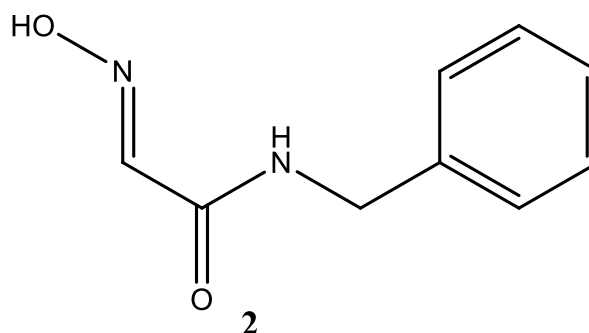
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 162,83 (C=O); 144,12 (C=N); 39,13 ($-\text{CH}_2\text{-}n\text{Bu}$); 31,39($-\text{CH}_2\text{-}n\text{Bu}$); 20,00($-\text{CH}_2\text{-}n\text{Bu}$); 13,68($-\text{CH}_3\text{-}n\text{Bu}$).

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3279 (-NH, sec. amid, s); 3109 (-OH, oksim, m); 3005-2804 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_3$, alifatski, m); 1651 (C=O, sec. amid, s); 1612 (C=N, oksim, s); 1570 (-NH, sec. amid, s); 1475 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_3$, alifatski, m); 1238 (C-C-N, amid, m).

N-benzil-2-(hidroksiimino)acetamid (2)

Reakcijska smjesa reakcije **E1** s benzilaminom pročišćena je na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 20/1.

Dobiveno je 140 mg (46 %) žuto-narančaste uljaste tekućine. Produktu su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri. Analizom snimljenih spektara potvrđeno je nastajanje amida N-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2** (slika 21.).



Slika 21. Strukturna formula N-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2**

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,36.

R_f (**2**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,23.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,48 (s, 1H, H-C=N); 7,29 – 7,15 (m, 5H, Ar); 4,43 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-}$).

*4,24 (q, 1H, $J = 7,1$ Hz); 1,28 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 163,24 ($\text{C}=\text{O}$); 143,59 ($\text{HC}=\text{N}$); 137,20 ($\text{C}-\text{Ar}$); 128,75 ($\text{CH}-\text{Ar}$); 127,73 ($\text{CH}-\text{Ar}$); 43,33 ($-\text{CH}_2-$).

*141,72; 61,83; 14,01.

*dobiveni signali koji ne odgovaraju strukturi amida, signali $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ skupine estera

N-adamantil-2-(hidroksiimino) acetamid (3)

Reakcija estera **E1** s 1-adamantilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom (TLC) u otapalu $\text{DCM}/\text{MeOH} = 30/1$ i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

TLC-om i HPLC-om reakcijske smjese nije detektiran produkt, te je potvrđeno da nije došlo do nastanka amida *N*-adamantil-2-(hidroksiimino) acetamida **3**.

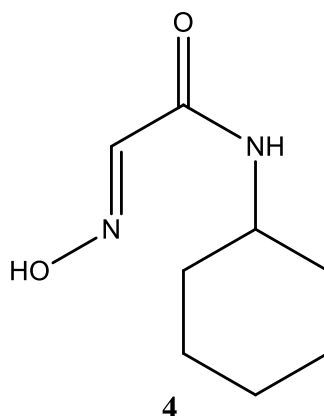
$R_f(\text{E1}, \text{DCM}/\text{MeOH} = 30/1) = 0,39$.

$t_R(\text{E1}) = 4,6 \text{ min}$.

N-cikloheksil-2-(hidroksiimino) acetamid (4)

Reakcija s cikloheksilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu $\text{DCM}/\text{MeOH}=30/1$.

Dobiveno je 78 mg smjese reaktanta i produkta. Smjesa je ponovno pročišćena na kromatografskoj koloni uz pokretnu fazu $\text{DCM}/\text{MeOH}=50/1$, te je izolirano 32 mg (11 %) žute uljaste tekućine. Produktu je snimljen ^1H NMR spektar čime je potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino) acetamid **4** (slika 22.).



Slika 22. Strukturna formula *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamida **4**

$R_f(\text{E1}, \text{DCM}/\text{MeOH} = 30/1) = 0,39$.

$R_f(\text{4}, \text{DCM}/\text{MeOH} = 30/1) = 0,20$.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,73 (s, 1H, -OH); 7,47 (s, 1H, H-C=N); 6,34 (s, 1H, -NH-); 3,89-3,79 (m, 1H, CH-Cy); 1,97-1,91 (m, 2H, Cy); 1,75-1,69 (m, 2H, Cy); 1,65-1,58 (m, 1H, Cy); 1,41-1,32 (m, 2H, Cy); 1,24-1,14 (m, 3H, Cy).

3.3.2. Reakcije etil-MEM-glioksilat oksima

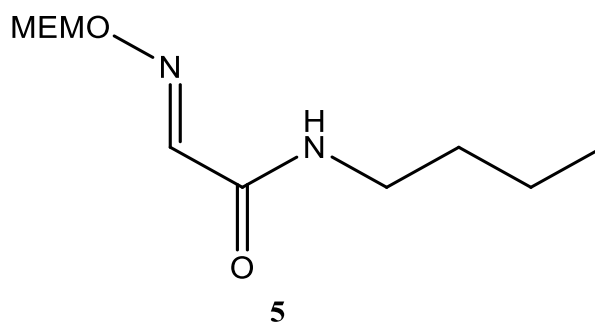
Etil-MEM-glioksilat oksima **E2** (354 mg, 1,7 mmol) otopi se u etanolu (8 ml) nakon čega se doda odgovarajuća količina amina (tablica 2.; 1,1 ekv.) i trietilamin (477 μl , 3,4 mmol; 2 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa 48 sati na magnetskoj mješalici uz zagrijavanje na 65 °C.

Otapalo se upari, te se sirovi produkt pročisti na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 50/1.

R_f (**E2**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,54.

N-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid (**5**)

Reakcijom **E2** s *n*-butilaminom dobiveno je 204 mg (51 %) žuto-narančaste uljaste tekućine. Dobivenom produktu je snimljen ^1H i ^{13}C NMR spektar. Analizom NMR spektara potvrđeno je nastajanje produkta *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **5** (slika 23.).



Slika 23. Strukturna formula *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **5**

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,50 (s, 1H, H-C=N); 6,60 (s, 1H, -NH-); 5,25 (s, 2H, -CH₂-MEM); 3,79 (t, 2H, J = 4,6 Hz, -CH₂-MEM); 3,57 (t, 2H, J = 4,6 Hz, -CH₂-MEM); 3,39 (s, 3H, -CH₃-MEM); 3,33 (q, 2H, J = 6,6 Hz, -CH₂-*n*Bu); 1,58-1,46 (m, 2H, -CH₂-*n*Bu); 1,42-1,32 (m, 2H, -CH₂-*n*Bu); 0,94 (t, 3H, J = 7,3 Hz, -CH₃-*n*Bu).

*2,74 (t, 2H, J = 7,0 Hz); 1,58-1,46 (m, 2H); 1,42-1,32 (m, 2H); 0,94 (t, 3H).

*3,60 (s, 2H).

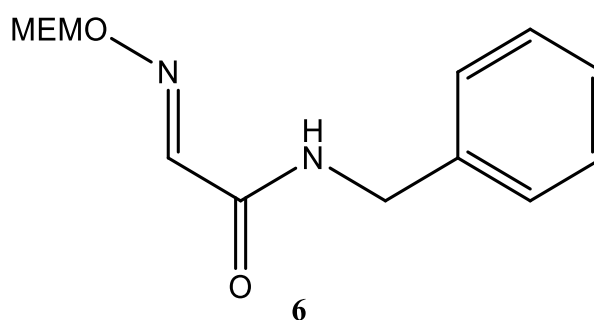
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 161,30 (C=O); 145,21 (HC=N); 98,44 (-CH₂-MEM); 71,56 (-CH₂-MEM); 68,23 (-CH₂-MEM); 59,05 (-CH₃-MEM); 39,00 (-CH₂-*n*Bu); 31,51 (-CH₂-*n*Bu); 20,13 (-CH₂-*n*Bu); 13,82 (-CH₃-*n*Bu).

*48,58; 37,36.

*dobiveni signali koji ne odgovaraju strukturi amida, signali -CH₂CH₂CH₂CH₃ skupine *n*-butilamina

N-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid (6)

Reakcijom **E2** s benzilaminom dobiveno je 168 mg (37 %) žuto-narančaste uljaste tekućine. Dobivenom produktu su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri. Analizom NMR spektara dokazano je nastajanje produkta *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **6** (slika 24.).



Slika 24. Strukturna formula *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **6**

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,58 (s, 1H, H-C=N), 7,32 (m, 5H, Ar); 6,90 (s, 1H, -NH-) 5,22 (s, 2H, -CH₂-MEM); 4,51 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, -CH₂-Bn); 3,76 (t, 2H, $J = 4,7$ Hz, -CH₃-MEM); 3,54 (t, 2H, $J = 4,7$ Hz, -CH₂-MEM); 3,36 (s, 3H, -CH₃-MEM)

*7,32 (m, 3H); 3,93 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 161,26 (C=O); 144,96 (HC=N); 137,55 (C-Ar); 128,65 (CH-Ar); 128,43 (CH-Ar); 128,90 (CH-Ar); 127,69 (CH-Ar); 98,54 (-CH₂-MEM); 71,55 (-CH₂-MEM); 68,31 (-CH₂-MEM); 59,01(-CH₃-MEM); 43,25 (-CH₂-Bn).

*51,35; 36,26.

*dobiveni signali koji ne odgovaraju strukturi amida, signali -CH₂-Ph skupine benzilamina

✚ N-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot (7)

Reakcija estera **E2** s 1-adamantilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 30/1.

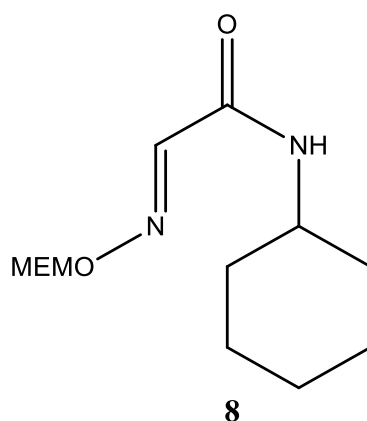
TLC-om reakcijske smjese nije detektiran produkt *N*-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot **7**. Kromatografijom na koloni iz reakcijske smjese izolirano je 255 mg reaktanta – etil-MEM-gliksilat oksima **E2** (silika-gel *flash*, DCM/MeOH = 30/1).

R_f (**E2**, DCM/MeOH = 30/1) = 0,70.

✚ N-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot (8)

Reakcija s cikloheksilaminom praćena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Dobiveno je 100 mg (23 %) žute uljaste tekućine. Dobivnom produktu snimljen je ^1H i ^{13}C NMR spektar. Analizom NMR spektara potvrđeno je nastajanje produkta *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aota **8** (slika 25.).



Slika 25. Strukturna formula *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot **8**

t_R (**E2**) = 4,5 min; t_R (**8**) = 9,8 min.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,48 (s, 1H, H-C=N); 6,43 (s, 1H, -NH-); 5,25 (s, 2H, -CH₂-MEM); 3,78 (t, 2H, J = 4,5 Hz, -CH₂-MEM); 3,57 (t, 2H, J = 4,6 Hz, -CH₂-MEM); 3,38 (s, 3H, -CH₃-MEM); 2,70-2,67 (m, 1H, Cy); 1,97 – 1,92 (m, 2H, Cy); 1,86-1,83 (m, 2H, Cy); 1,76-1,73 (m, 4H, -CH₂-Cy); 1,66-1,61 (m, 2H, -CH₂-Cy).

* 3,78 (t, 1H, J = 4,5 Hz); 3,57 (t, 1H, J = 4,6 Hz); 3,38 (s, 2H).

* 2,70-2,67 (m, 5H); 1,86-1,83 (m, 11H); 1,76-1,73 (m, 11H); 1,66-1,61 (m, 7H).

* 3,62 (s, 11H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 159,8 (C=O); 144,94 (HC=N); 71,08 (-CH₂-MEM); 67,74 (-CH₂-MEM); 54,66 (-CH₃-MEM); 47,77 (CH-Cy); 33,8 (-CH₂-Cy); 32,41(-CH₂-Cy); 32,09(-CH₂-Cy); 25,36(-CH₂-Cy); 24,94 (-CH₂-Cy).

*117,60; 97,96; 24,34; 23,91.

*dobiveni signali koji ne odgovaraju strukturi amida, signali MEM-skupine estera i cikloheksilne skupine cikloheksilamina

3.3.3. Reakcije etil-fenilacetata

N-butil-2-fenilacetamid (9)

Etil-fenilacetata **E3** (282 mg, 1,7 mmol) otopljeno je u etanolu (8 ml) nakon čega je dodan *n*-butilamin (188 μl , 1,9 mmol; 1,1 ekv.) i trietilamin (477 μl 3,4 mmol; 2 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici 48 sati na 65 °C. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM.

Tankoslojnom kromatografijom reakcijske smjese nije detektiran produkt *N*-butil-2-fenilacetamid **9**.

R_f (**E3**, DCM) = 0,66.

N-benzil-2-fenilacetamid (10), *N*-adamantil-2-fenilacetamid (11), *N*-cikloheksil-2-fenilacetamid (12)

Ester **E3** (59 mg, 0,36 mmol) otopljeno je u etanolu (3 ml) nakon čega je dodana odgovarajuća količina amina (tablica 3.; 1,1 ekv.) i trietilamin (100 μl , 0,72 mmol; 2 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici 48 sati na 65 °C. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM.

Tablica 3. Količine amina korištene u reakcijama

amin	<i>n</i> / mmol	<i>V</i> / μl	<i>m</i> / mg
benzilamin	0,40	44	-
1-adamantilamin	0,40	-	61
cikloheksilamin	0,40	46	-

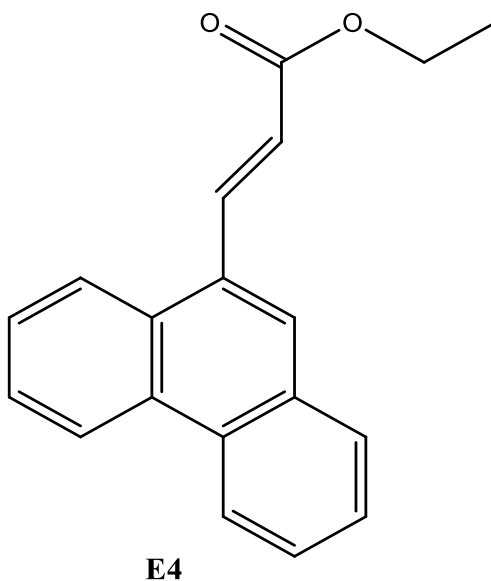
U reakcijama etil-fenilacetata s benzilaminom, cikloheksilaminom i 1-adamantilaminom tankoslojnom kromatografijom reakcijske smjese nisu detektirani produkti amidi *N*-benzil-2-fenilacetamid **10**, *N*-adamantil-2-fenilacetamid **11** i *N*-cikloheksil-2-fenilacetamid **12**.

R_f (**E3**, DCM) = 0,66.

3.3.4. Reakcije etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata

Etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4** (100 mg, 0,36 mmol) otopljeno je u etanolu (3 ml) nakon čega je dodana odgovarajuća količina amina (tablica 3.; 1,1 ekv.) i trietilamin (100 μ l, 0,72 mmol; 2 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici 48 sati na 65 °C. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom u DCM.

Tankoslojnom kromatografijom reakcijskih smjesa reakcija estera **E4** s *n*-butilaminom, benzilaminom, 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom nisu detektirani produkti. Kromatografijom na koloni (silika-gel *flash*, DCM) iz reakcijske smjese izoliran je reaktant **E4** (slika 26.).



Slika 26. Strukturna formula estera etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4**

R_f (**E4**, DCM) = 0,55.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,66 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H-Ar); 8,73 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H-Ar) 8,52 (d, 1H, J = 15,7 Hz, HC=C); 8,21 (d, 1H, J = 7,2 Hz, H-Ar); 7,98 (s, 1H, H-Ar); 7,90 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H-Ar); 7,73-7,59 (m, 4H, H-Ar); 6,61 (d, 1H, J = 15,7 Hz, HC=C); 4,34 (q, 2H, J = 7,2 Hz. $-\text{CH}_2-$); 1,39 (t, 3H, J = 7,1 Hz, $-\text{CH}_3$).

3.4. METODA ENZIMSKE KATALIZE

3.4.1. Reakcije etil-glioksilat oksima

Etil-glioksilat oksim **E1** (200 mg, 1,7 mmol) otopi se u suhom MTBE (8 ml), te se u otopinu dodaju 3 Å molekulska sita (~200 mg) i odgovarajuća količina amina (tablica 4.; 1,1 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa 15 minuta na 35 °C nakon čega se doda enzim CalB (250 mg).

Nakon 4 sata enzim se odvoji filtracijom te ispere s MTBE i DCM. Filtrat se upari, a sirovi se produkt pročisti na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*).

Tablica 4. Količine amina korištene u reakcijama

amin	<i>n</i> / mmol	<i>V</i> / µl	<i>m</i> / mg
<i>n</i>-butilamin	1,9	188	-
benzilamin	1,9	208	-
1-adamantilamin	1,9	-	287
cikloheksilamin	1,9	218	-

***N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamid (1)**

Reakcija s *n*-butilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom na pločicama silika-gela u otapalu DCM/MeOH = 20/1, te je reakcijska smjesa pročišćena na kromatografskoj koloni uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 30/1.

Dobiveno je 247 mg (94 %) bijele praškaste krutine. Dobivnom produktu snimljeni su ¹H i ¹³C NMR spektar čime je potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1** (slika 20.).

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,41.

R_f (**3**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,23.

***N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamid (2)**

Reakcija s benzilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom na pločicama silika-gela u otapalu DCM/MeOH = 20/1, te je reakcijska smjesa pročišćena na kromatografskoj koloni uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 30/1.

Tijekom reakcije nastaje bijeli talog koji se otapa ispiranjem s DCM.

Dobiveno je 246 mg (80 %) bijele praškaste krutine. Dobivenom produktu snimljen je ^1H NMR spektar čime je potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamid **2** (slika 21).

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,52.

R_f (**2**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,28.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 9,02 (s, 1H, -OH); 7,53 (s, 1H, H-C=N); 7,35-7,26 (m, 5H, CH-Ar), 6,86 (s, 1H, -NH-); 4,50 (d, 2H, J = 6,1 Hz, $-\text{CH}_2\text{-Bn}$).

N-adamantil-2-(hidroksiimino) acetamin (3)

Reakcija s 1-adamantilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 20/1.

Nakon 4 sata produkt nije detektiran pa je reakcija ostavljena preko noći. Ni nakon 24 sata produkt nije detektiran tankoslojnom kromatografijom. Reakcijska smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, DCM/MeOH = 30/1).

Pročišćavanjem je izoliran reaktant etil-glioksilat oksim **E1**, što je potvrđeno tankoslojnom kromatografijom i analizom snimljenih ^1H i ^{13}C NMR spektra.

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,52.

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 30/1) = 0,39.

N-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamid (4)

Reakcija s cikloheksilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 30/1 i DCM/MeOH = 20/1. Nakon 4 sata u TLC-om reakcijske smjese vidljivo je da je u reakcijskoj smjesi veća količina neizreagiranog reaktanta **E1**, pa je reakcija ostavljena preko noći. Sirovi produkt pročišćen je na kromatografskoj koloni uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 30/1.

Dobiveno je 84 mg (29 %) bijele praškaste krutine. Dobivenom produktu snimljen je ^1H NMR spektar čime je potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamid **4** (slika 22.).

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 30/1) = 0,35.

R_f (**4**, DCM/MeOH = 30/1) = 0,22.

3.4.2. Reakcije etil-MEM-gliksilat oksima

Etil-MEM-gliksilat oksim **E2** (351 mg, 1,7 mmol) otopi se u suhom MTBE (8 ml), te su u otopinu dodana 3 Å molekulska sita (~200 mg) i odgovarajuća količina amina (tablica 4.; 1,1 ekv.). Reakcijska smjesa se miješa 15 minuta na 35 °C nakon čega je dodan enzim CalB (250 mg).

Nakon 4 sata enzim je odvojen filtracijom te ispran s MTBE i DCM. Filtrat je uparen i pročišćen na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, pokretna faza DCM/MeOH = 50/1).

N-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida (5)

Reakcija s *n*-butilaminom praćena je TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 50/1.

Dobiveno je 297 mg (75 %) žute uljaste tekućine. Dobivenom produktu je snimljen ¹H spektar, te je analizom spektra potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **5** (slika 23.).

R_f (**E2**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,50.

R_f (**5**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,25.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,49 (s, 1H, H-C=N); 6,57 (s, 1H, -NH-); 5,24 (s, 2H, -CH₂-MEM); 3,77 (t, 2H, *J* = 4,6 Hz, -CH₂-MEM); 3,56 (t, 2H, *J* = 4,7 Hz, -CH₂-MEM); 3,38 (s, 3H, -CH₃-MEM); 3,32 (q, 2H, *J* = 6,6 Hz, -CH₂-*n*Bu); 1,58-1,48 (m, 2H, -CH₂-*n*Bu); 1,42-1,30 (m, 2H, -CH₂-*n*Bu); 0,93 (s, 3H, *J* = 7,3 Hz, -CH₃-*n*Bu).

N-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida (6)

Reakcija s benzilaminom praćena je TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 50/1.

Dobiveno je 278 mg (61 %) bijelo-žute krutine. Dobivenom produktu su snimljeni ¹H i ¹³C NMR spektri, te je analizom spektara potvrđeno da je izolirani produkt amid *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **6** (slika 24.).

R_f (**E2**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,53.

R_f (**6**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,11.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,55 (s, 1H, H-C=N); 7,31 (m, 5H, Ar); 6,94 (s, 1H, -NH-); 5,22 (s, 2H, -CH₂-MEM); 4,51 (d, 2H, J = 6,0 Hz, -CH₂-Bn); 3,76 (t, 2H, J = 4,7 Hz, -CH₂-MEM); 3,54 (t, 2H, J = 4,7 Hz, -CH₂-MEM); 3,38 (s, 3H, -CH₃-MEM).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 161,26 (C=O); 144,95 (HC=N); 137,73 (C-Ar); 128,75 (Ar-CH); 127,90 (CH-Ar); 127,68 (CH-Ar); 98,52 (-CH₂-MEM); 71,53 (-CH₂-MEM); 68,29 (-CH₂-MEM); 59,02 (-CH₃-MEM); 43,22 (-CH₂-Bn).

***N*-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot (7)**

Reakcija s 1-adamantilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 50/1.

Nakon 4 sata produkt nije detektiran pa je reakcija ostavljena preko noći. Ni nakon 24 sata produkt nije detektiran tankoslojnom kromatografijom.

Snimanjem ^1H i ^{13}C NMR spektra pročišćene smjese potvrđeno je da produkt – amid 7 nije nastao, te da je pročišćavanjem na kromatografskoj koloni izoliran reaktant **E2**.

R_f (**E2**, DCM/MeOH=50/1) = 0,54.

***N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid (8)**

Reakcija s cikloheksilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 50/1. Reakcija je ostavljena preko noći.

Tijekom reakcije došlo je do nastanka bijelog taloga netopljivog u MTBE.

Reakcijska smjesa je profiltrirana te isprana s MTBE, zaostali talog ispran je s DCM. Izoliranom talogu (118 mg) snimljeni su ^1H i ^{13}C spektri, a filtrat dobiven filtracijom otopine reakcijske smjese je uparen i pročišćen na kromatografskoj koloni (pokretna faza: DCM/MeOH = 50/1).

Analizom snimljenih spektara taloga dokazano je da talog ne sadrži produkt, a pročišćavanjem reakcijske smjese dobiveno je 146 mg (33 %) bijele praškaste krutine. Snimanjem ^1H i ^{13}C NMR spektara potvrđeno je da je izolirani produkt amid *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **8** (slika 25.).

R_f (**E2**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,54.

R_f (**8**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,30.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,49 (s, 1H, H-C=N); 6,45 (s, 1H, -NH-); 5,25 (s, 2H, -CH₂-MEM); 3,78 (t, 2H, $J = 4,6$ Hz, -CH₂-MEM); 3,57 (t, 2H, $J = 4,6$ Hz, -CH₂-MEM); 3,40 (s, 3H, -CH₃-MEM); 2,00-1,89 (m, 2H, Cy); 1,80-1,69 (m, 2H, Cy); 1,68-1,58 (m, 1H, Cy); 1,46-1,30 (m, 2H, Cy); 1,23-1,10 (m, 4H, Cy).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ /ppm: 160,50 (C=O); 145,45 (HC=N); 98,44 (-CH₂-MEM); 71,56 (-CH₂-MEM); 68,21 (-CH₂-MEM); 59,04 (-CH₃-MEM); 48,27 (CH-Cy); 32,93 (-CH₂-Cy); 25,44 (CH₂-Cy); 24,86 (-CH₂-Cy).

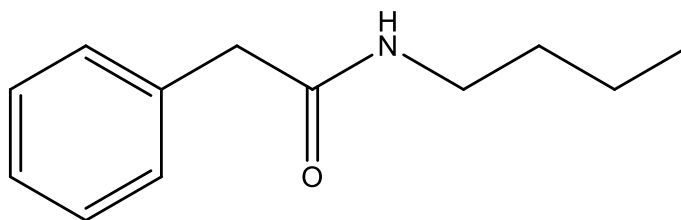
3.4.3. Reakcije etil-fenilacetata

Etil-fenilacetat **E3** (281 mg, 1,7 mmol) otopi se u suhom MTBE (8 ml) te se u otopinu doda 3 Å molekulska sita (~200 mg) i odgovarajuća količina amina (tablica 4.;1,1 ekv.). Reakcijska smjesa mješa se 15 minuta na 35 °C nakon čega je dodan enzim CalB (250 mg). Nakon 4 sata enzim je odvojen filtracijom preko vate te je ispran s MTBE. Filtrat je uparen i pročišćen na kromatografskoj koloni.

N-butil-2-fenilacetamid (**9**)

Reakcija s *n*-butilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH=50/1, te je sirovi produkt pročišćen na kromatografskoj koloni uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 50/1.

Dobiveno je 225 mg (68 %) bijele praškaste krutine. Dobivenom produktu je snimljen ^1H i ^{13}C NMR spektar, analizom dobivenih NMR spektara potvrđeno je da je izolirani produkt amid *N*-butil-2-fenilacetamid **9** (slika 27.).



9

Slika 27. Strukturna formula *N*-butil-2-fenilacetamida **9**

R_f (**E3**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,69.

R_f (**9**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,23.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,31 (m, 5H, Ar); 5,40 (s, 1H, -NH-); 3,56 (s, 2H, -CH₂-Bn); 3,20 (q, 2H, $J = 6,4$ Hz, -CH₂-*n*Bu); 3,40 (m, 2H, -CH₂-*n*Bu); 1,24 (m, 2H, -CH₂-*n*Bu); 0,87 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, -CH₃-*n*Bu).

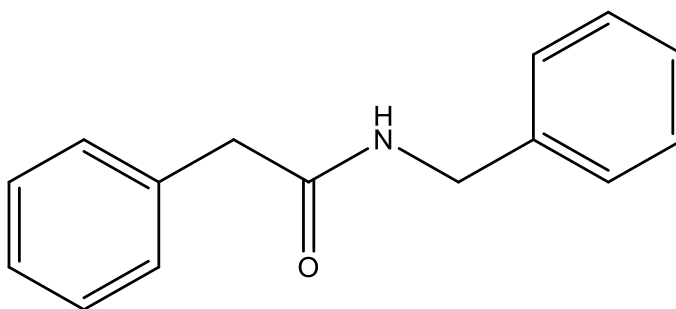
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 170,86 (C=O); 135,09 (HC=N); 129,45(-CH₂-); 189,01 (CH-Ar); 127,31(CH-Ar); 43,91 (-CH₂-Ar); 39,40 (-CH₂-*n*Bu); 31,54 (-CH₂-*n*Bu); 19,96 (-CH₂-*n*Bu); 13,69 (-CH₃-*n*Bu).

***N*-benzil-2-fenilacetamid (10)**

Reakcija s benzilaminom provedena je 24 sata u navedenim uvjetima. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 50/1.

Tijekom reakcije nastaje bijeli talog koji je nakon filtracije ispran s DCM i CH_3CN .

Dobiveno je 235 mg (61 %) bijele praškaste krutine. Dobivenom produktu je snimljen ^1H i ^{13}C NMR spektar, analizom dobivenih NMR spektara potvrđeno je da je izolirani produkt amid *N*-benzil-2-fenilacetamid **10** (slika 28.).



10

Slika 28. Strukturna formula *N*-benzil-2-fenilacetamida **10**

R_f (**E3**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,78.

R_f (**10**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,53.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,37-7,16 (m, 10H, Ar); 5,75 (s, 1H, -NH-); 4,40 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz, -CH₂-N); 3,62 (s, 2H, -CH₂-CO).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 170,83 (C=O); 138,18 (C-Ar); 134,79 (C-Ar); 129,46 (CH-Ar); 129,07 (CH-Ar); 128,66 (CH-Ar); 127,49 (CH-Ar); 127,42 (CH-Ar); 43,84 (-CH₂-N); 43,59 (-CH₂-CO).

✚ N-adamantil-2-fenilacetamid (11)

Reakcija s 1-adamantilaminom praćena je tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM.

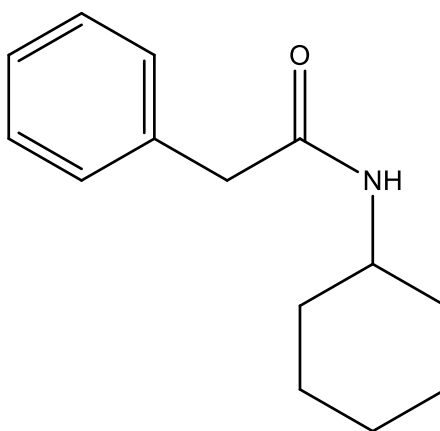
Nakon 3 sata tankoslojnom kromatografijom nije detektiran produkt. Reakcijska smjesa je profiltrirana, otapalo je upareno, te su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri nepročišćene reakcijske smjese koji također potvrđuju da nije nastao produkt – amid **11**.

R_f (E3, DCM) = 0,71.

✚ N-cikloheksil-2-fenilacetamid (12)

Reakcija s cikloheksilaminom provedena je 24 sata u navedenim uvjetima. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM/MeOH = 50/1. Tijekom reakcije nastaje bijeli talog koji je tijekom filtracije ispran s DCM i CH_3CN .

Dobiveno je 37 mg (10 %) produkta. Dobivenom produktu je snimljen ^1H i ^{13}C NMR spektar, analizom NMR spektara potvrđeno je da je izolirani produkt amid N-cikloheksil-2-fenilacetamida **12** (slika 29.).



12

Slika 29. Strukturna formula N-cikloheksil-2-fenilacetamida **12**

R_f (E3, DCM/MeOH = 50/1) = 0,68.

R_f (12, DCM/MeOH = 50/1) = 0,38.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,35-7,24 (m, 5H, Ar); 5,23 (s, 1H, -NH-); 3,84-3,68 (m, 1H, CH-Cy); 3,55 (s, 2H, -CH₂-Bn); 1,88-1,78 (m, 2H, Cy); 1,65-1,58 (m, 2H, Cy); 1,63-1,58 (m, 2H, Cy); 1,35-0,99 (m, 4H, Cy).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 170,03 (C=O); 135,21 (C-Ar); 129,38 (CH-Ar); 128,97 (CH-Ar); 127,26 (CH-Ar); 48,16 (-CH-Cy); 44,03 (-CH₂); 32,90 (-CH₂-Cy); 25,46 (CH₂-Cy); 24,69 (-CH₂-Cy).

3.4.4. Reakcije etil-(E)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata

Etil-(E)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4** (100 mg, 0,36 mmol) otopi se u suhom MTBE (8 ml) te se u otopinu dodaju 3 Å molekulska sita (~200 mg) i odgovarajuća količina amina (1,1 ekv, 0,40 mmol, tablica 5.).

Tablica 5. Količine amina korištene u reakcijama

amin	<i>n</i> / mmol	V / μl
<i>n</i> -butilamin	0,40	40
benzilamin	0,40	44

Reakcijska smjesa se miješa 15 minuta na 35 °C nakon čega se doda 250 mg enzima CalB. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom u otapalu DCM.

U obje reakcije tankoslojnom kromatografijom nisu detektirani produkti, reakcijska smjesa je ostavljana preko noći, te je nakon 24 sata provedena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti također nisu detektirani produkti.

Zatim je temperatura reakcijske smjese povećana je na 40 °C. Ni 2 sata nakon povećanja temperature tankoslojnom kromatografijom nisu detektirani produkti.

R_f (**E4**, DCM) = 0,55.

t_R (**E4**) = 23,0 min.

3.5. CalB-BOP METODA

3.5.1. Reakcije optimizacije CalB-BOP metode

Optimizacija uvjeta CalB-BOP reakcije provedena je na reakciji estera etil-fenilacetata **E3** i amina *n*-butilamina **A1**. Provedene su četiri reakcije u kojima su varirane količine enzima i trietilamina, te temperatura reakcije.

Provedene su četiri reakcije na način da se ester **E3** (281 mg; 1,7 mmol) otopi u DIPE (8 ml), u reakcijsku smjesu doda se *n*-butilamin (188 μ l 1,9 mmol, 1,1 ekv.), određena količina Et₃N i CalB enzima (tablica 6.). Reakcije se zagrijavaju na određenu temperaturu (tablica 6.), te se napredovanje reakcija prati TLC-om u otapalu DCM.

Tablica 6. Količine tvari i uvjeti provedenih reakcija

	<i>m</i> (CalB) / mg	<i>V</i> (Et ₃ N) / μ l	<i>t</i> / °C	iskorištenje
I	250	239 (1 ekv.)	40	68 %
II	250	239 (1 ekv.)	50	/
III	250	477 (2 ekv.)	40	57 %
IV	300	239 (1 ekv.)	40	/

Reakcije su zaustavljene nakon 5 sati kada je TLC-om primjećeno da u reakcijskoj smjesi nema više neizreagiranog estera. Nakon toga je dodan BOP (752 mg, 1,7 mmol, 1 ekv.). Reakcijska smjesa se zagrijava na istoj temperaturi još 2 sata.

Reakcijske smjese **I** i **III** su obrađene na način da se reakcijska smjesa profiltrira, ispere s DIPE i DCM. Filtrat se ekstrahira s zasićenom otopinom NH₄Cl. Organski sloj suši se dodatkom bezvodnog Na₂SO₄. Otapalo se upari, te se dobiveni sirovi produkt pročisti na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 50/1.

Produkti su izolirani uz iskorištenja od 68 % i 57 %. Analizom snimljenih NMR spektara potvrđeno je da je u obje reakcije izolirani produkt amid – *N*-butil-2-fenilacetamid **9** (slika 27.).

Zatim je provedena reakcija istog estera i amina na način da se u reakcijsku smjesu dodaju iste količine estera, amina, enzima i BOP reagensa kao u prethodno opisanim reakcijama. U reakcijsku smjesu doda se Et₃N (358 μ l, 2,6 mmol; 1,5 ekv). BOP reagens se doda

istovremeno kada i ostali reaktanti. Reakcijska smjesa se zagrijava na 50 °C 3 sata. Reakcijska smjesa se obradi na isti način kao i u prethodno opisanim reakcijama.

Dobiveno je 236 mg (72 %) produkta *N*-butil-2-fenilacetamida **9**.

3.5.2. Reakcije etil-glioksilat oksima

Reakcija etil-glioksilat oksima **E1** u uvjetima CalB-BOP metode (uz enzim i kondenzacijski reagens kao katalizator) provedena je nekoliko puta u različitim uvjetima (različite temperature i vremena trajanja reakcija). Ovdje su prikazani provedeni postupci za reakcije koje su dale najbolje rezultate – ostale reakcije biti će komentirane u poglavlju § 4.

N-butil-2-(hidroksiimino)acetamid (**1**)

Etil-glioksilat oksim **E1** (200 mg, 1,7 mmol) otopi se u DIPE (8 ml), doda se *n*-butilamin (188 µl, 1,9 mmol; 1,1 ekv.), Et₃N (477 µl, 3,4 mmol; 2 ekv.), BOP (752 mg, 1,7 mmol; 1 ekv.) i enzim CalB (250 mg). U reakcijsku smjesu doda se par kapi vode. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na sobnoj temperaturi. Zatim se reakcijska smjesa profiltrira, te ispere s DIPE i DCM. Filtrat se ekstrahira sa zasićenom otopinom NH₄Cl (20 ml), u organski sloj se doda bezvodni Na₂SO₄, profiltrira se, otapalo se upari, te se sirovi produkt pročisti na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, EtOAc/heksan = 1/1).

Dobiveno je 27 mg (11 %) bijele praškaste krutine. Produktu je snimljen ¹H NMR. Analizom spektra potvrđeno je da je izolirani spoj *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamid **1** (slika 20.).

N-benzil-2-(hidroksiimino)acetamid (**2**)

Reakcija s benzilaminom provedena je u istim uvjetima kao i reakcija s *n*-butilaminom.

Dobiveno je 59 mg produkta (19 %) *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2**. Produktu je snimljen ¹H NMR, analizom spektra potvrđeno je nastajanje amida *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2**.

R_f (**E1**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,36.

R_f (**2**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,25.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,51 (s, 1H, H-C=N); 7,37-7,26 (m, 5H, Ar); 6,85 (s, 1H, -NH-); 4,50 (d, 2H, *J* = 6,1 Hz, -CH₂-Bn).

*7,37-7,26 (m, 6H), 4,29 (s, 1H).

*dobiveni signali koji ne odgovaraju strukturi amida, signali -CH₂-Ph skupine benzilamina

Osim amida, na kromatografskoj koloni izoliran je i nepoznati spoj **2'**- 130 mg prozirne tekućine, izoliranom spoju snimljen je ^1H i ^{13}C NMR spektar, IR spektar, te MS.

R_f (**2'**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,74.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,33-7,26 (m, 5H); 4,96 (s, 1H); 4,36 (d, 2H, J = 5,9 Hz); 4,14 (q, 2H, J = 7,1 Hz); 1,25 (t, 3H, J = 7,2 Hz).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ /ppm: 156,66, 138,63, 128,65, 127,48, 127,44, 61,00, 44,90, 14,63.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3331 (s); 3031 (m); 2982 (m); 1701 (vs); 1528 (vs); 1258 (vs).

ESI-MS: m/z = 179

N-adamantil-2-(hidroksiimino)acetamid (3)

Ester **E1** (200 mg, 1,7 mmol) otopi se u DIPE (8 ml), doda se 1-adamantilamin (287 mg, 1,1 ekv, 1,9 mmol), Et_3N (477 μl , 2 ekv, 3,4 mmol), BOP (752 mg 1 ekv, 1,7 mmol) i enzim CalB (250 mg). Reakcijska smjesa zagrijava se na 50 °C.

Reakcija je praćena TLC-om u otapalu EtOAc/heksan = 7/3. Reakcija je zaustavljena nakon 4 sata nakon što TLC-om nije detektirano nastajanje produkta.

Reakcijska smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu EtOAc/heksan = 1/1 pri čemu nije izoliran produkt.

R_f (**E1**, EtOAc/heksan = 7/3) = 0,55.

N-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamid (4)

Reakcija estera **E1** s cikloheksilaminom provedena je tako što se etil-glioksilat oksim **E1** (200 mg, 1,7 mmol) otopi u DIPE (8 ml), doda se cikloheksilamin (218 mg 1,9 mmol; 1,1 ekv.), Et_3N (477 μl , 3,4 mmol; 2 ekv.), BOP (752 mg, 1,7 mmol; 2 ekv.) i enzim CalB (250 mg). Reakcijska smjesa zagrijava se na 50 °C 24 sata. Reakcija je praćena TLC-om u otapalu EtOAc/heksan = 7/3.

Reakcijska smjesa je obrađena na isti način kao i reakcijske smjese reakcija **E1** s drugim aminima, te je pročišćena na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* s pokretnom fazom EtOAc/heksan = 1/1.

Pročišćavanjem nije izoliran produkt *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamida **4** (slika 22.) što je potvrđeno snimanjem ^1H NMR spektra frakcija izoliranih pročišćavanjem na koloni.

Reakcija je ponovljena s istim količinama reaktanata i katalizatora tako da je prvo dodan enzim, te je zagrijavano 24 sata na 50 °C. Zatim je dodan BOP, Et_3N i cikloheksilamin, te je reakcija ostavljena 3,5 sata na sobnoj temperaturi. Snimljen je ^1H NMR spektar nepročišćene reakcijske smjese čime je potvrđeno da ni u ovim uvjetima nije nastao amid.

R_f (**E1**, EtOAc/heksan = 7/3) = 0,55.

3.5.3. Reakcije etil-MEM-glioksilat oksima

Etil-MEM-glioksilat oksim **E2** (351 mg, 1,7 mmol) otopi se u DIPE (8 ml), doda se odgovarajuće količina amina (tablica 7.; 1,1 ekv.), Et_3N (477 μl , 3,4 mmol; 2 ekv.), BOP (752 mg, 1 ekv, 1,7 mmol) i enzim CalB (250 mg). U reakcijsku smjesu doda se par kapi vode. Reakcijska smjesa se miješa 2,5 sata na sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 50/1.

Reakcijska smjesa se profiltrira, te ispere s DIPE i DCM. Filtrat se ekstrahira s 20 ml zasićene otopine NH_4Cl , u organski sloj se doda bezvodni Na_2SO_4 , profiltrira se, otapalo se upari, te se sirovi produkt pročisti na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, DCM/MeOH = 100/1).

R_f (**E2**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,54.

Tablica 7. Količine amina korištene u reakcijama

amin	n / mmol	V / μl	m / mg
<i>n</i>-butilamin	1,9	188	-
benzilamin	1,9	208	-
1-adamantilamin	1,9	-	287
cikloheksilamin	1,9	218	-

✚ ***N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid (5)**

U reakciji estera **E2** s *n*-butilaminom dobiveno je 238 mg (60 %) žute uljaste tekućine. Produktu je snimljen ^1H NMR. Analizom spektra potvrđeno je da je izolirani spoj *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **5** (slika 23.).

R_f (**5**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,15.

✚ ***N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid (6)**

U reakciji estera **E2** s benzilaminom dobiveno je 141 mg (31 %) bijelo-žute krutine. Produktu je snimljen ^1H NMR. Analizom spektra potvrđeno je da je izolirani spoj *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **6** (slika 24.).

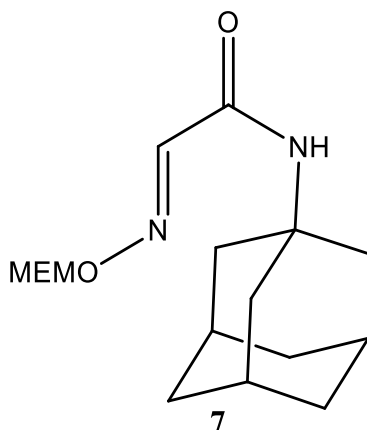
R_f (**6**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,34.

✚ ***N*-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot (7)**

Reakcija s 1-adamantilaminom provedena je 24 sata uz zagrijavanje na 50 °C. Reakcija je praćena TLC-om u otapalu EtOAc/heksan = 7/3.

Obrada reakcijske smjese provedena je isto kao i u reakcijama istog estera s *n*-butilaminom i benzilaminom. Sirovi produkt pročišćen je na kromatografskoj koloni silikagela *flash* uz pokretnu fazu EtOAc/heksan = 1/1.

Dobiveno je 75 mg (14 %) žute uljaste tekućine. Produktu su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri. Analizom spektara potvrđeno nastajanje amida *N*-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aota **7** (slika 30.).



Slika 30. Strukturna formula *N*-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aota **7**

R_f (**E2**, EtOAc/heksan = 7/3) = 0,56.

R_f (**7**, EtOAc/heksan = 7/3) = 0,15.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,38 (s, 1H, H-C=N); 6,26 (s, 1H, -NH-); 5,24 (s, 2H, -CH₂-MEM); 3,77 (t, 2H, $J = 4,7$ Hz, -CH₂-MEM); 3,57 (t, 2H, $J = 4,7$ Hz, -CH₂-MEM); 3,39 (s, 3H, -CH₃-MEM) 2,10 (s, 3H, -CH-Ad), 2,04 (s, 6H, -CH₂-Ad); 1,70 (s, 6H, -CH₂-Ad).

*4,32 (q, $J = 7,3$ Hz); 1,35 (t, $J = 7,1$ Hz).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ /ppm: 160,18 (C=O); 146,32 (HC=N); 98,40 (-CH₂-MEM); 71,58 (-CH₂-MEM); 68,19(-CH₂-MEM); 59,06 (-CH₃-MEM); 52,12 (-C-Ad); 41,40 (-CH-Ad); 36,26 (-CH₂-Ad); 29,39 (-CH₂-Ad).

*61,80; 14,11.

*dobiveni signali koji ne odgovaraju strukturi amida, signali -O-CH₂CH₃ skupine estera

N-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aot (8)

Reakcija s cikloheksilaminom provedena je 3,5 sata uz zagrijavanje na 50 °C. Reakcija je praćena TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 20/1.

Obrada reakcijske smjese provedena je isto kao i u reakcijama istog estera s *n*-butilaminom, benzilaminom i 1-adamantilaminom. Sirovi produkt pročišćen je na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu EtOAc/heksan = 1/1.

Dobiveno je 181 mg (41 %) produkta. Produktu je snimljen ^1H spektar čijom analizom je potvrđeno da je izolirani spoj N-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-aota **8** (slika 25.). Produktu je snimljen i IR spektar.

R_f (E2, EtOAc/heksan = 7/3) = 0,56

R_f (8, EtOAc/heksan = 7/3) = 0,15

R_f (E2, DCM/MeOH = 20/1) = 0,75

R_f (8, DCM/MeOH = 20/1) = 0,36

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3304 (-NH, sec. amid, s); 2989-2860 (-CH₂,-CH₃, alifatski, m); 1649 (C=O, sec. amid, s); 1599 (C=N, oksim, s); 1543 (-NH, sec. amid, s); 1242 (C-C-N, amid, m); 1113 (C-O-C, eter); 540 (O-C-O, eter, m); 434 (C-O-C, eter, m).

3.5.4. Reakcije etil-fenilacetata

Etil-fenilacetat **E3** (281 mg, 1,7 mmol) otopi se u DIPE (8 ml), doda se odgovarajuća količina amina (tablica 7.; 1,9 mmol; 1,1 ekv.), Et₃N (477 µl, 3,4 mmol; 2 ekv.), BOP (752 mg, 1,7 mmol; 1 ekv.) i enzim CalB (250 mg). U reakcijsku smjesu doda se par kapi vode. Reakcijska smjesa se miješa 3 sata na 50 °C.

Reakcijska smjesa se profiltrira, te ispere s DIPE i DCM. Filtrat se ekstrahira s 20 ml zasićene otopine NH₄Cl, u organski sloj se doda bezvodni Na₂SO₄, profiltrira se, otapalo se upari, te se sirovi produkt pročisti na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, DCM/MeOH = 100/1).

N-butil-2-fenilacetamid (**9**)

Reakcija s *n*-butilaminom praćena je TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 20/1.

Reakcijom s *n*-butilaminom izolirano je 236 mg (73 %) produkta. Pročišćenom produktu snimljen je ¹H NMR spektar čime je dokazano da je izolirani spoj *N*-butil-2-fenilacetamid **9** (slika 27). Produktu je snimljen i IR spektar.

R_f (**E3**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,80.

R_f (**9**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,52.

IR (KBr) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3252 (-NH, sec. amid, s); 3076 (=CH, aromatski, m); 2959-2874 (-CH₂-, CH₃, alifatski, m); 1630 (C=O, sec. amid, s); 1560 (-NH, sec. amid, s); 1454 (-CH₂ -CH₃, alifatski, m); 1200 (C-C-N, amid, m); 757,692 (CH, monosup. benzen).

N-benzil-2-fenilacetamid (**10**)

Reakcija s benzilaminom praćena je TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 50/1.

Dobiveno je 240 mg (62 %) produkta *N*-benzil-2-fenilacetamida **10** (slika 28.). Dobivenom produktu snimljen je ¹H NMR. Snimljeni spektar odgovara strukturi amida **10**.

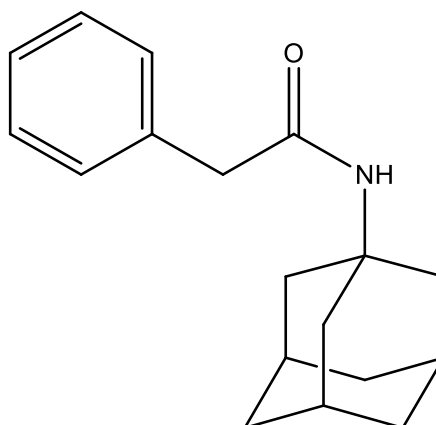
R_f (**E3**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,74.

R_f (**10**, DCM/MeOH = 50/1) = 0,38.

✚ N-adamantil-2-fenilacetamid (11)

Reakcija s 1-adamantilaminom miješana je 3 sata na sobnoj temperaturi, te zatim preko noći na 50 °C. Reakcijska smjesa je profiltrirana i pročišćena na kromatografskoj koloni silika-gela *flash* uz pokretnu fazu DCM/MeOH = 100/1.

Dobiveno je 267 mg (58 %) bijele praškaste krutine. Analizom snimljenog ¹H NMR spektara potvrđeno je da je izolirani produkt N-adamantil-2-fenilacetamida **11** (slika 31.).



11

Slika 31. Strukturna formula spoja N-adamantil-2-fenilacetamida **11**

R_f (**E3**, DCM/MeOH = 100/1) = 0,70.

R_f (**11**, DCM/MeOH = 100/1) = 0,48.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,37 – 7,21 (m, 5H, Ar); 5,05 (s, 1H, –NH–); 3,47 (s, 2H, –CH₂-Bn); 2,03 (s, 3H, –CH-Ad); 1,91 (d, 6H, J = 2,8 Hz, –CH₂-Ad); 1,64 (t, 6H, J = 2,8 Hz, –CH₂-Ad).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ /ppm: 170,03 (C=O); 135,57 (C-Ar); 129,29 (HC-Ar); 128,88 (HC-Ar); 127,09 (HC-Ar); 51,92 (C-Ad); 45,00 (–CH₂-Bn); 41,48 (–CH₂-Ad); 36,30 (–CH₂-Ad); 29,39 (–CH-Ad).

N-cikloheksil-fenilacetamid (12)

Reakcija s cikloheksilaminom također je praćena TLC-om u otapalu DCM/MeOH = 20/1.

Nakon 3 sata TLC-om je primjećeno nastajanje produkta, ali i veća količina neizreagiranog estera **E3**, pa je reakcija ostavljena preko noći. Nakon 24 sata reakcijska smjesa je obrađena na isti način kao i reakcijske smjese s drugim aminima.

Izolirano je 186 mg (50 %) produkta N-cikloheksil-fenilacetamida **12** (slika 29.). Produktu je snimljen ^1H NMR spektar. Snimljeni spektar odgovara strukturi amida **12**.

R_f (**E3**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,80.

R_f (**12**, DCM/MeOH = 20/1) = 0,55.

3.5.5. Reakcije etil-(E)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata

Ester **E4** (100 mg 0,36 mmol) otopi se u DIPE (8 ml), doda se odgovarajuća količina amina (tablica 8.; 1,1 ekv.), Et_3N (75 μl , 0,54 mmol; 1,5 ekv.), BOP (159 mg, 0,36 mmol; 1 ekv.) i enzim CalB (55 mg). U reakcijsku smjesu doda se par kapi vode. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na 50 °C. Reakcija je praćena TLC-om u otapalu DCM.

R_f (**E4**, DCM) = 0,55

Tablica 8. Količine amina korištene u reakcijama

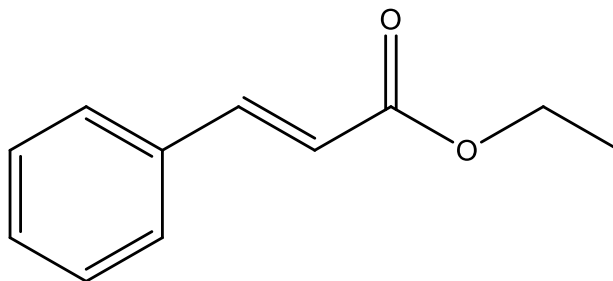
amin	n / mmol	V / μl
<i>n</i>-butilamin	0,40	40
benzilamin	0,40	44

Nakon 24 sata nisu detektirani produkti pa je temperatura povećana na 60 °C, te su reakcije ostavljene preko noći. Ni nakon 24 sata na 60 °C TLC-om nisu detektirani produkti.

Reakcijska smjesa je zatim obrađena i pročišćena: reakcijska smjesa se filtrira, te ispere s DIPE i DCM. Filtrat se ekstrahira s 20 ml zasićene otopine NH_4Cl , u organski sloj se doda bezvodni Na_2SO_4 , filtrira se, otapalo se upari, te se pročisti na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, DCM). Pročišćavanjem je izoliran reaktant **E4** što je potvrđeno TLC-om i snimanjem ^1H NMR spektra.

3.5.6. Reakcije *trans*-etil-cinamata

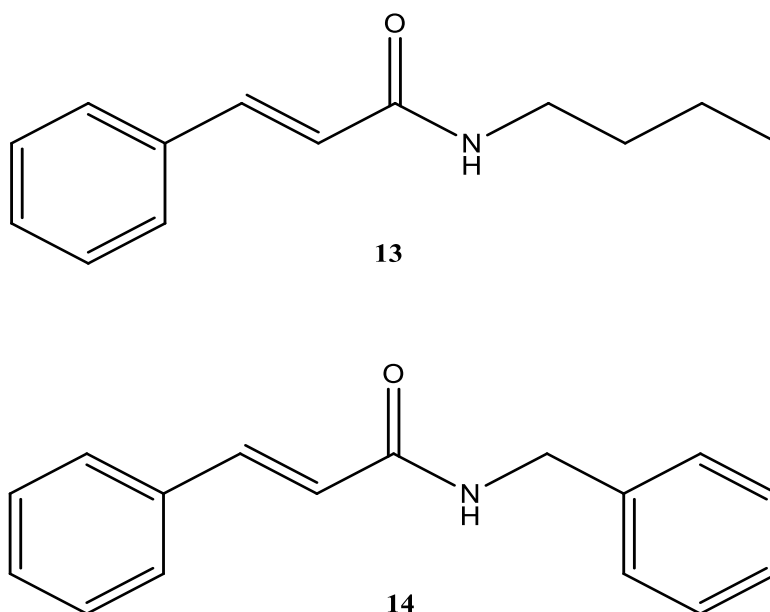
Provedene su reakcije estera *trans*-etil-cinamata (slika 32.) s *n*-butilaminom i benzilaminom.



Slika 32. Strukturna formula estera *trans*-etil-cinamata

trans-etil-cinamat (300 mg, 1,7 mmol) otopi se u DIPE (8 ml), doda se odgovarajuća količina amina (1,1 ekv, tablica 7.), Et₃N (477 μ l, 3,4 mmol; 2 ekv.), BOP (752 mg, 1,7 mmol; 1 ekv.) i enzim CalB (250 mg). U reakcijsku smjesu doda se par kapi vode. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na 50 °C. Reakcije su praćene TLC-om u otapalu DCM.

Reakcijska smjesa je obrađena kao i reakcijske smjese reakcija estera E4. Sirovi produkt pročišćen je na kromatografskoj koloni (silika-gel *flash*, pokretna faza: DCM/MeOH = 20/1). Dobiveni su amidi *N*-butilcinamamid **13** i *N*-benzilcinamamid **14** uz iskorištenja 77 % i 51 % (slika 33.).

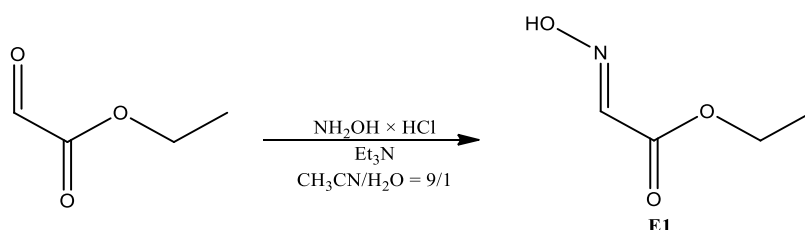


Slika 33. Strukturne formule amida *N*-butilcinamamida **13** i *N*-benzilcinamamida **14**

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

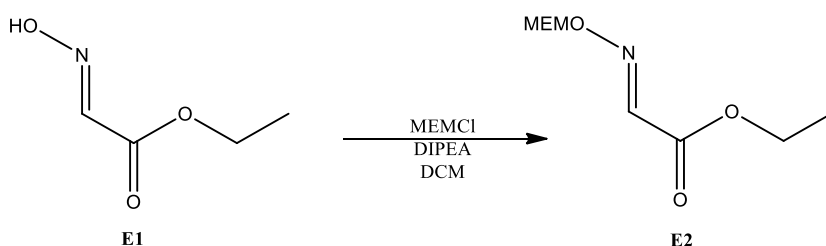
4.1. PRIPRAVA POLAZNIH SPOJEVA

Ester etil-glioksilat oksim **E1** pripravljen je reakcijom etil-glioksilata i hidroksilamin hidroklorida (slika 34.). Ester **E1** pripravljen je uz iskorištenje reakcije 78 %, te je analizom snimljenog NMR spektra potvrđena struktura i čistoća izoliranog produkta.



Slika 34. Shema reakcije priprave **E1**

Iz pripravljenog estera **E1** pripravljen je ester **E2** vezanjem MEM zaštitne skupine na –OH skupinu oksimske skupine estera (slika 35.). Ester **E1** pripravljen je uz iskorištenje reakcije 70 %. Struktura i čistoća izoliranog produkta potvrđene su analizom snimljenih NMR spektara.

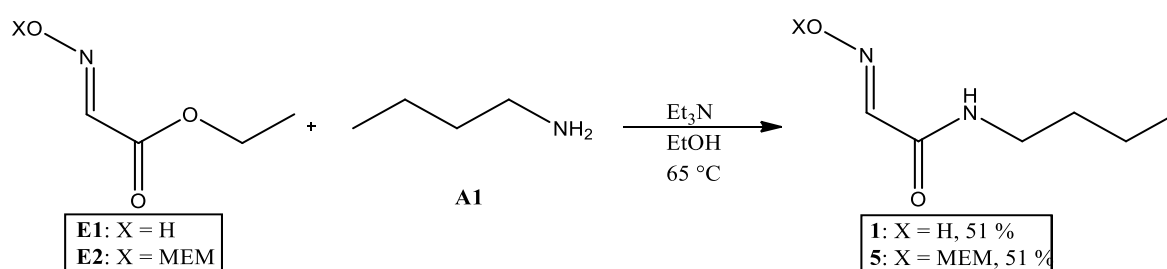


Slika 35. Shema reakcije priprave estera **E2**

4.2. METODA BAZNE KATALIZE

4.2.1. Reakcije etil-glioksilat oksima i etil-MEM-glioksilat oksima

Provedene su bazno katalizirane reakcije etil-glioksilat oksima **E1** i etil-MEM-glioksilatoksima **E2** s *n*-butilaminom **A1**. Reakcijska smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni, te su izolirani produkti *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamid **1** i *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **5** što je potvrđeno analizom snimljenih NMR spektara (slika 36.).

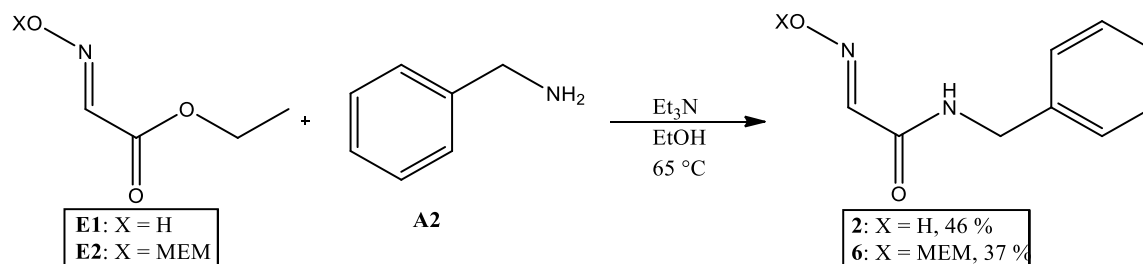


Slika 36. Priprava *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1** i *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **5** metodom bazne katalize

NMR spektri pročišćene reakcijske smjese reakcije estera **E1** i amina **A1** se poklapaju sa strukturom amida **1**.

U NMR spektrima pročišćene reakcijske smjese reakcije estera **E2** i amina **A1** osim signala amida **5** vidljivi su i signali koji ne odgovaraju amidu. Dodatni signali odgovaraju *n*-butilnoj skupini, što upućuje na to da neizreagirani *n*-butilamin nije uspješno odvojen od produkta da ili dolazi do nastajanja nusprodukta tijekom reakcije koji sadrži *n*-butilnu skupinu. S obzirom da izolirani produkt nije u potpunosti čist iskorištenje reakcije zapravo je manje od dobivenih 51 %. Omjer integrala dodatnih signala u odnosu na broj jezgri vodika koje sadrži je 1/1. Uz pretpostavku da su navedeni dodatni signali pripadaju *n*-butilaminu izračunato je da je stvarno iskorištenje reakcije 39 %.

Zatim su provedene reakcije etil-glioksilat oksima **E1** i etil-MEM-glioksilatoksima **E2** s benzilaminom **A2** (slika 37.).



Slika 37. Sinteza *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2** i *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **6** metodom bazne katalize

Metodom bazne katalize, zagrijavanjem estera **E1** i **E2** i amina **A2** na 65°C 48 sati u etanolu uz dodatak trietilamina kao katalizatora, pripremljeni su i izolirani amidi *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2** i *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **6** uz iskorištenja 46 % i 37 %. Sirovi produkti pročišćeni su na kromatografskoj koloni, a nastajanje produkata potvrđeno je analizom ^1H i ^{13}C NMR spektara.

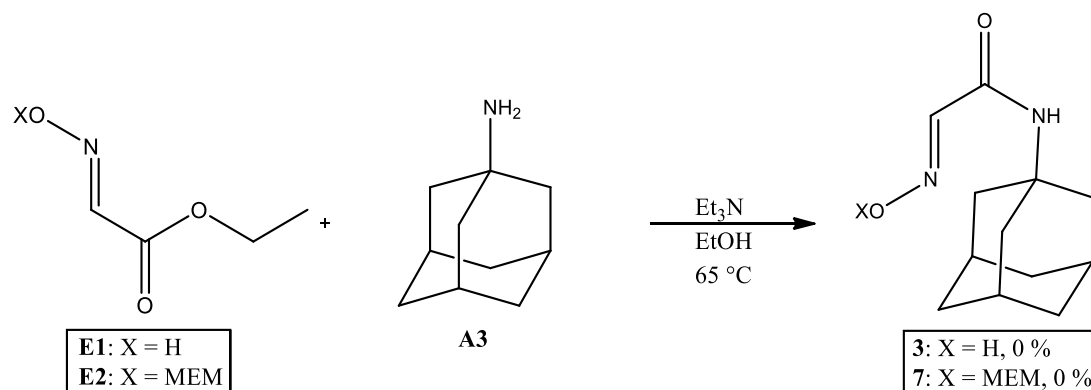
U obje reakcije pročišćavanje nije bilo potpuno uspješno – u NMR spektrima pročišćene reakcijske smjese uočavaju se signali koji ne pripadaju amidima.

U NMR spektrima reakcijske smjese reakcije estera **E1** i amina **A2** uočavaju se signali $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ esterske skupine što upućuje na neuspješno odjeljivanje reaktanta - estera i produkta – amida, što je uočeno i tankoslojnom kromatografijom. Omjeri integrala dodatnih signala u odnosu na broj jezgri vodika koje sadrže su 0,9/2 i 1,3/3. Uz pretpostavku da su navedeni dodatni signali od estera **E1** izračunato je da je stvarno iskorištenje reakcije 36 %.

U NMR spektrima reakcijske smjese reakcije estera **E2** i amina **A2** nisu vidljivi signali estera, ali su uočena dodatni signali aromatskih vodikovih atoma i $-\text{CH}_2-$ skupine benzilne skupine amina. Navedeno upućuje na to da neizreagirani benzilamin nije uspješno odvojen od produkta, ili da je i tijekom reakcije došlo do nastajanja nusprodukta koji sadrži benzilnu skupinu. Omjer integrala dodatnih signala u odnosu na broj jezgri vodika koje sadrži je 0,9/2. Uz pretpostavku da su navedeni dodatni signali benzilamina, izračunato je da je stvarno iskorištenje reakcije 31 %.

Iskorištenja reakcija su manja nego u reakciji istih estera s *n*-butilaminom što je vjerojatno posljedica steričkih utjecaja benzilne skupine amina, a reaktivnost zaštićenog i nezaštićenog estera je i u reakciji s benzilaminom približno jednaka.

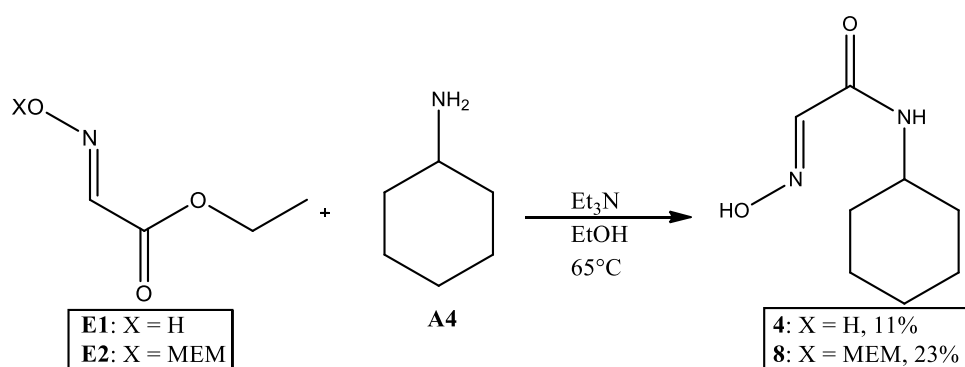
Provedene su i reakcije estera etil-gliksilat oksima **E1** i etil-MEM-gliksilat oksima **E2** s 1-adamantilaminom **A3** u istim uvjetima bazne katalize (slika 38.). Reakcije su praćene TLC-om i HPLC-om te navedenim metodama nakon 48 sati reakcije nisu detektirani produkti.



Slika 38. Provedene reakcije etil-glioksilat oksima **E1** i etil-MEM-glioksilat oksima **E2** s 1-adamantilaminom u uvjetima bazne katalize

Iako su navedeni esteri uspješno reagirali s *n*-butilaminom i benzilaminom, u reakciji s aminom koji na amino-skupini ima vezan veći supstituent (adamantil) nije došlo do reakcije, odnosno nastajanja amida. Nukleofilni napad amino skupine na karbonilnu skupinu estera je vjerojatno sterički ometan zbog veličine i strukture 1-adamantilamina.

Zatim su provedene reakcije navedenih estera (**E1**, **E2**) s cikloheksilaminom **A4**. Reakcijama u bazno kataliziranim uvjetima pripremljeni su i izolirani amidi *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamid **4** i *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **8** (slika 39.).



Slika 39. Sinteza *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamida **4** i

N-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amid **8** metodom bazne katalize

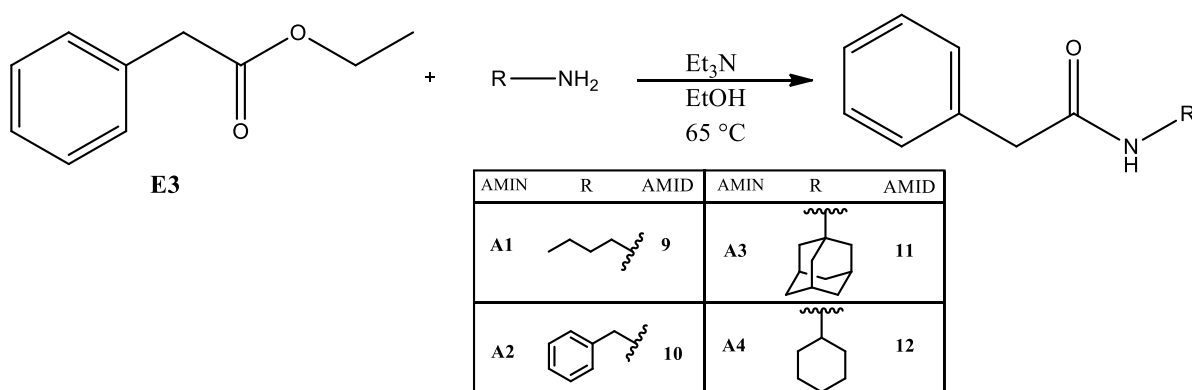
Nastajanje amida potvrđeno je analizom ^1H i ^{13}C NMR spektara pročišćene reakcijske smjese. NMR spektar produkta **4** odgovara strukturi amida. U NMR spektrima produkta **8** vidljivi su signali amida, ali spektri sadrže i signale koji ne odgovaraju strukturi amida.

Spektar amida **8** sadrži dodatne signale MEM zaštitne skupine – odnosno signale estera, te višak signala vodika cikloheksilne skupine. Navedeno upućuje na to da reaktanti ester i amin nisu uspješno odvojeni od produkta. S obzirom na veću količinu dodatnih signala i estera i amina, te njihovu tešku razlučivost od signala produkata, korekcije iskorištenja iz snimljenog NMR spektra nisu provedene. Iskorištenja reakcija, i bez provedene korekcije, su mala, te je zaključeno da ova metoda nije povoljna za dobivanje amida **4** i **8** iz odgovarajućih estera i amina.

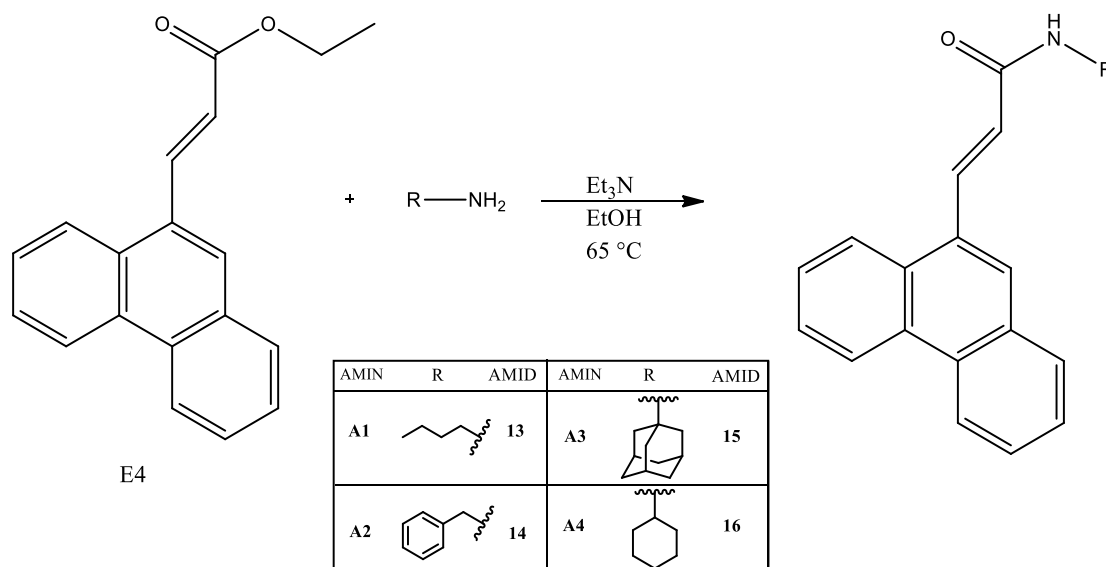
Reakcije istih estera s *n*-butilaminom i benzilaminom u istim uvjetima bile su uspješnije. Slabija reaktivnost u reakcijama s cikloheksilaminom vjerojatno je posljedica strukture cikloheksilamina – šesteročlani prsten vezan na amino skupinu vjerojatno sterički ometa pristup amino-skupine karbonilnoj skupini estera, kao što je slučaj i s 1-adamantilaminom.

4.2.2. Reakcije etil-fenilacetata i etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata

U istim reakcijskim uvjetima kao reakcije etil-glioksilat oksima **E1** i etil-MEM-glioksilat oksima **E2** s *n*-butilaminom, benzilaminom, 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom provedene su reakcije estera etil-fenilacetata **E3** i etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4** s navedenim aminima (slika 40., slika 41.).



Slika 40. Bazno katalizirane reakcije etil-fenilacetata s aminima: *n*-butilaminom, benzilaminom, 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom



Slika 41. Bazno katalizirane reakcije etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata s aminima: *n*-butilaminom, benzilaminom, 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom

U reakcijama estera **E3** s navedenim aminima u uvjetima bazne katalize nije došlo do nastanka produkta – amida (**11-14**).

Ni u reakcijama estera **E4** nije došlo do nastanka amida. Tankoslojnom kromatografijom reakcijskih smjesa nisu detektirani produkti, a pročišćavanjem reakcijske smjese na kromatografskoj koloni izoliran je reaktant etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat.

Etil-fenilacetat i etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat nisu reagirali ni s jednim korištenim aminom u uvjetima bazne katalize. Navedeni esteri su vjerojatno zbog svoje strukture manje reaktivni. Pristup karbonilnoj skupini sterički je ometan arilnim supstituentima, te je moguće da na reaktivnost navedenih estera utječu i elektronski efekti kao posljedica aromatskih sustava koje sadrže. U slučaju reakcija s 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom uzrok neuspješnosti reakcija mogu biti sterički utjecaji kao posljedica veličine i strukture amina, kao što je bio slučaj u reakcijama etil-glioksilat oksima i etil-MEM-glioksilat oksima s navedenim aminima.

4.2.3. METODA BAZNE KATALIZE – usporedba rezultata

U tablici 9. prikazane su sve provedene bazno katalizirane reakcije, te dobiveni rezultati i iskorištenja.

Tablica 9. Bazno katalizirane reakcije: rezultati i iskorištenja reakcija

BAZNO KATALIZIRANA METODA				
	<i>n</i> -butilamin	benzilamin	1-adamantilamin	cikloheksilamin
Etil-gliksilat oksim E1	51 %	*36 %	0 %	11 %
Etil-MEM-gliksilatoksim E2	*39 %	*31 %	0 %	* < 23 %
Etil-fenilacetat E3	0 %	0 %	0 %	0 %
Etil-(<i>E</i>)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat E4	0 %	0 %	0 %	0 %

* izračunata iskorištenja s obzirom na NMR signale nečistoća primjećenih u spektrima

Od korištenih estera samo su esteri **E1** i **E2** uspješno reagirali s aminima (**A1**, **A2** i **A4**) pri čemu je došlo do nastajanja amida. Esteri **E3** i **E4** nisu reagirali ni s jednim korištenim aminom, a nijedan ester nije reagirao s 1-adamantilaminom **A3**.

Pročišćavanje dobivenih produkata u većini reakcija nije bilo u potpunosti uspješno. Iz dobivenih iskorištenja može se zaključiti da je reaktivnost nezaštićenog i zaštićenog estera etil-gliksilat oksima približno jednaka u uvjetima bazne katalize, odnosno da MEM zaštitna skupina nema utjecaj na reaktivnost navedenog estera.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda bazne katalize bila uspješna za pripravu amida iz estera etil-gliksilat oksima i etil-MEM-gliksilat oksima u reakcijama s *n*-butilaminom i benzilaminom. U reakcijama navedenih estera s cikloheksilaminom došlo je do nastanka amida, ali iskorištenja reakcija su mala, pa se može reći da navedene reakcije nisu bile uspješne.

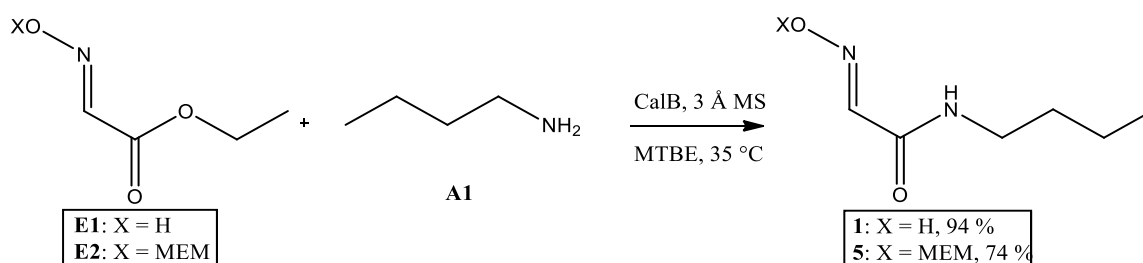
Dobiveni rezultati vjerojatno su posljedica slabe reaktivnosti estera u reakcijama nukleofilne supstitucije, steričkih utjecaja, te utjecaja oksimske skupine u reakcijama estera etil-gliksilat oksima i etil-MEM-gliksilatoksima. Moguće je i da oksimska skupina koja se nalazi u blizini karbonilne skupine estera etil-gliksilat oksima i etil-MEM-gliksilatoksima oksima utječe na njihovu reaktivnost povećavajući je u reakcijama nukleofilne supstitucije s aminima.

Za razliku od oksimske skupine, aromatski i konjugirani sustav ne povećava aktivnost estera u navedenim reakcijama. Zbog navedenog, reakcije estera etil-gliksilat oksima i etil-MEM-gliksilatoksima bile su uspješnije od reakcija etil-fenilacetata i etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata s istim aminima.

4.3. METODA ENZIMSKE KATALIZE

4.3.1. Reakcije etil-gliksilat oksima i etil-MEM-gliksilat oksima

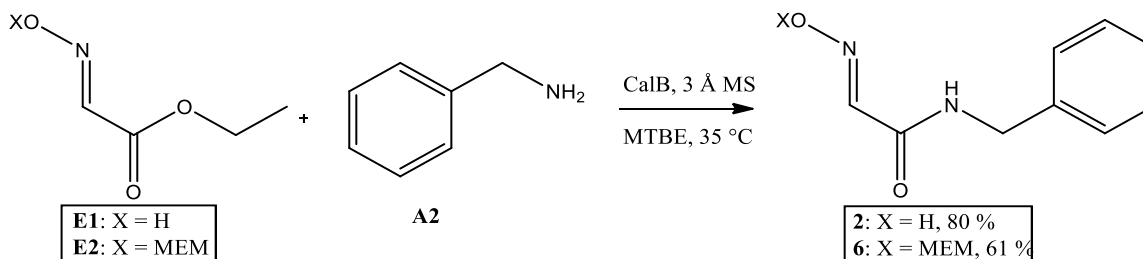
Provedene su enzimski katalizirane reakcije etil-gliksilat oksima **E1** i etil-MEM-gliksilat oksima **E2** s *n*-butilaminom **A1**. Reakcijom u MTBE u suhim uvjetima (uz dodatak 3 Å molekulskih sita) i enzimom CalB kao katalizatorom dobiveni su amidi *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamid **1** i *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-olat **5** uz iskorištenja od 94 % i 74 % (slika 42.). Reakcijska smjesa je pročišćena na kromatografskoj koloni, a nastanak amida je potvrđen analizom ^1H i ^{13}C NMR spektra.



Slika 42. Sinteza *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1** i *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-olata **5** metodom enzimske katalize

Dobiveni produkti su čisti, te su iskorištenja reakcija vrlo dobra. Iskorištenje reakcije estera zaštićenog MEM-zaštinom skupinom malo je manje od reakcije nezaštićenog estera s istim aminom.

Reakcijom estera **E1** i **E2** s benzilaminom **A2** u uvjetima enzimske katalize dobiveni su amidi *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamid **2** i *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-olat **6** uz iskorištenja od 80 % i 61 % (slika 43.). Sirovi produkti pročišćeni su na kromatografskoj koloni, te snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri odgovaraju strukturama amida **2** i **6**.

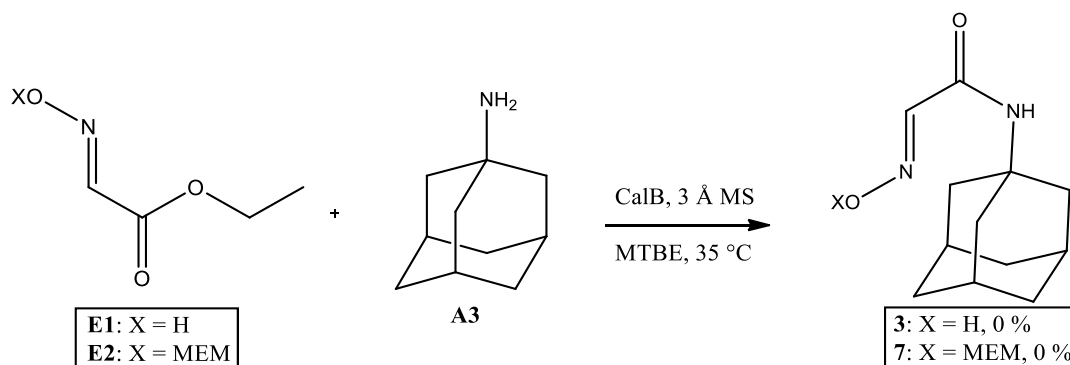


Slika 43. Sinteza *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2** i *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-olata **6** metodom enzimske katalize

Amidi **1**, **2**, **5** i **6** uspješno su pripremljeni iz odgovarajućih estera i amina u uvjetima enzimске katalize. Produkti su dobiveni s vrlo dobrim iskorištenjima, te su produkti uspješno izolirani pročišćavanjem na kromatografskoj koloni.

Produkt reakcije **E2** s benzilaminom dobiven je s manjim iskorištenjem u usporedbi s reakcijom nezaštićenog **E1** s benzilaminom, kao i u slučaju reakcija istih estera s *n*-butilaminom. Iskorištenja reakcija nešto su manja od reakcija istih estera s *n*-butilaminom. S obzirom da je tijekom enzimski katalizirane reakcije potrebno vezanje i estera i amina u aktivno mjesto enzima, aromatski prsten benzilamina može sterički utjecati na vezanje amina u aktivno mjesto. Stoga su vjerojatno iskorištenja reakcija s benzilaminom manja nego reakcija istih estera s *n*-butilaminom.

Provedene su i reakcije istih estera s 1-adamantilaminom **A3** u uvjetima enzimске katalize (slika 44.).

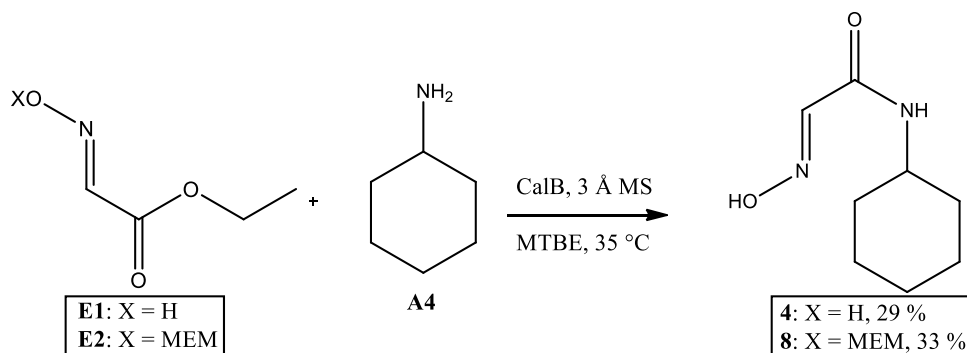


Slika 44. Provedene reakcije etil-glioksilat oksima **E1** i etil-MEM-glioksilat oksima **E2** s 1-adamantilaminom u uvjetima enzimске katalize

Ni etil-glioksilat oksim ni etil-MEM-glioksilat oksim nisu reagirali s 1-adamantilaminom u uvjetima enzimске katalize. U navedenim reakcijama nije došlo do nastanka amida **3** i **7**, što je potvrđeno TLC-om i analizom snimljenih NMR spektara.

S obzirom da su reakcije estera **E1** i **E2** s aminima **A1** i **A2** bile uspješne može se pretpostaviti da se navedeni esteri mogu uspješno vezati u aktivno mjesto enzima. Stoga je vjerojatno u reakcijama s 1-adamantilaminom bilo problematično vezanje amina u aktivno mjesto. Usporedbom struktura amina *n*-butilamina i benzilamina može se primjetiti da je molekula 1-adamantilamina veća te se može pretpostaviti da je vezanje 1-adamantilamina sterički ometano.

U organskom otapalu uz enzim CalB kao katalizator provedene su reakcije estera **E1** i **E2** s cikloheksilaminom **A4** (slika 45.). Reakcijske smjese su pročišćene na kromatografskoj koloni, te je analizom ^1H i ^{13}C NMR spektara produkata potvrđeno nastajanje amida *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino) acetamida **4** i *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-oata **8** uz iskorištenja reakcija 29 % i 33 %.



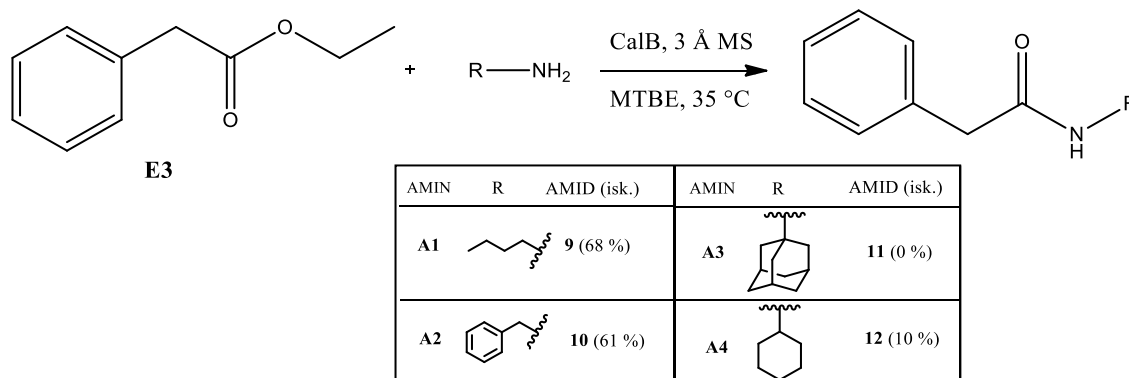
Slika 45. Sinteza *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamida **4** i *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-oata **8** metodom enzimske katalize

Iako je potvrđeno nastajanje amida, iskorištenja reakcija nisu velika. Reakcije istih estera s *n*-butilaminom i benzilaminom su bile uspješnije od reakcija s cikloheksilaminom.

Slabija reaktivnost estera **E1** i **E2** u reakcijama s cikloheksilaminom u usporedbi s reakcijama s *n*-butilaminom i benzilaminom vjerojatno je posljedica strukture cikloheksilamina. Vezanje cikloheksilamina u aktivno mjesto enzima je više sterički ometano nego kod *n*-butilamina i benzilamina.

4.3.2. Reakcije etil-fenilacetata

Provedene su reakcije etil-fenilacetata **E3** s aminima *n*-butilaminom **A1**, benzilaminom **A2**, cikloheksilaminom **A3** i 1-adamantilaminom **A4** u uvjetima enzimske katalize (slika 46.)



Slika 46. Provedene reakcije enzimske katalize estera etil-fenilacetata **E3** s aminima: *n*-butilaminom **A1**, benzilaminom **A2**, 1-adamantilaminom **A3** i cikloheksilaminom **A4**

U enzimski kataliziranim reakcijama estera **E3** s aminima **A1** i **A2** uspješno su pripremljeni amidi **9** i **10**, uz iskorištenja od 68 % i 61 %. Nastajanje amida potvrđeno je analizom snimljenih NMR spektara koji odgovaraju strukturama amida **9** i **10**. Pročišćavanje i izolacija produkata bila je uspješna te su dobivena iskorištenja dobra.

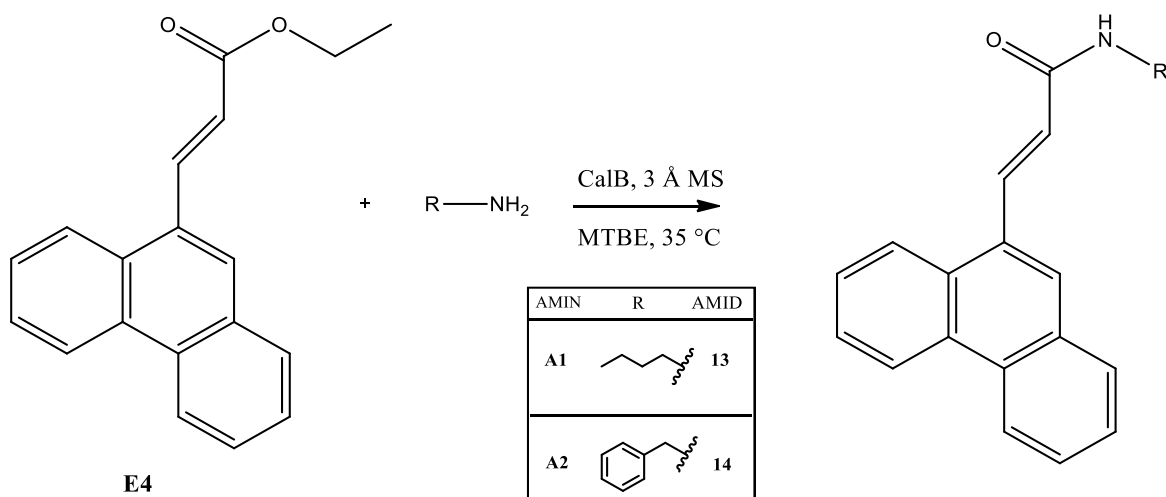
Reakcijom estera **E3** s 1-adamantilaminom nije dobiven amid **11**.

Ni esteri **E1** i **E2** nisu reagirali s 1-adamantilaminom u uvjetima enzimske katalize. Uzrok slabe reaktivnosti navedenog amina vjerovastno je posljedica njegove strukture koja onemogućuje vezanje amina u aktivno mjesto enzima CalB, što je već spomenuto i objašnjeno u poglavlju 4.3.1.

Reakcijom estera **E3** s cikloheksilaminom dobiven je amid **12**. Iskorištenje reakcije je vrlo malo, te se zbog toga ne može reći da je enzimska kataliza najpovoljnija metoda za dobivenje amida **12** iz odgovarajućeg estera i amina. Ali s obzirom da je u reakciji došlo do nastajanja amida optimizacijom uvjeta reakcije (vrijeme, temperatura, količine reaktanata, katalizatora) je zasigurno moguće postići bolja iskorištenja reakcija.

4.3.3. Reakcije etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata

Provedene su reakcije estera etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4** aminima *n*-butilaminom i benzilaminom u uvjetima enzimske katalize (slika 47.).



Slika 47. Provedene reakcije enzimske katalize estera etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4** s aminima *n*-butilaminom **A1**, benzilaminom **A2**

Ni u reakciji s *n*-butilaminom ni u reakciji s benzilaminom nije došlo do nastanka produkata amida **13** i **14**. S obzirom da su amini **A1** i **A2** uspješno reagirali s ostalim esterima u uvjetima enzimske katalize, znači da se navedeni amini mogu uspješno vezati u aktivno mjesto enzima. U slučaju estera **E4** arilni supstituenti zbog veličine vjerojatno otežavaju vezanje navedenog estera u aktivno mjesto enzima CalB.

4.3.4. METODA ENZIMSKE KATALIZE – usporedba rezultata

U tablici 10. prikazane su sve provedene enzimski katalizirane reakcije u organskom otapalu uz CalB kao enzimski katalizator, te dobiveni rezultati i iskorištenja.

Tablica 10. Enzimski katalizirane reakcije: rezultati i iskorištenja reakcija

ENZIMSKI KATALIZIRANA METODA				
	<i>n</i> -butilamin	benzilamin	1-adamantilamin	cikloheksilamin
Etil-glioksilat oksim E1	94 %	80 %	0 %	29 %
Etil-MEM-glioksilat oksim E2	74 %	61 %	0 %	33 %
Etil-fenilacetat E3	68 %	61 %	0 %	10 %
Etil-(<i>E</i>)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat E4	0 %	0 %	/	/

Reakcije enzimske katalize bile su uspješne kod estera **E1**, **E2** i **E3**, dok ester **E4** nije reagirao ni s jednim aminom. Također nijedan ester nije dao produkt u reakciji s 1-adamantilaminom.

Produkt etil-glioksilat oksima s *n*-butilaminom i benzilaminom su dobiveni uz vrlo dobra iskorištenja od 94 % i 80 %. Iskorištenja reakcija ostala dva estera s istim aminima su također dobra (61-74 %). Može se reći da je enzimski katalizirana metoda dobra za pripravu amida iz navedenih estera i amina.

U reakcijama enzimske katalize reaktivnost zaštićenog estera etil-MEM-glioksilat oksima je nešto slabija od estera bez MEM zaštitne skupine što upućuje na to da bi MEM zaštitna skupina mogla utjecati na vezanje navedenog estera u aktivno mjesto enzima. Iskorištenja reakcija s benzilaminom manja su od reakcija s *n*-butilaminom u reakcijama s istim esterima što također upućuje na to da aromatski prsten benzilamina može utjecati na vezanje amina u aktivno mjesto enzima.

U reakcijama s cikloheksilaminom dobiveni su amidi s esterima **E1**, **E2** i **E3**, ali su iskorištenja reakcija mala. Iz toga se može zaključiti da se cikloheksilamin može vezati u aktivno mjesto enzima, ali je vjerojatno vezanje sterički ometano. Optimizacija reakcijskih uvjeta u cilju dobivanja boljih iskorištenja jedan je od smjerova kojim je moguće dobiti bolje rezultate. Međutim u uvjetima u kojim su provedene enzimski katalizirane reakcije, ova metoda se nije pokazala kao dobra za pripravu amida iz estera **E1-E4** i cikloheksilamina.

Dobiveni rezultati vjerojatno su posljedica činjenice da je u enzimski kataliziranim reakcijama potrebno vezanje oba reaktanta, i estera i amina, u aktivno mjesto. S obzirom na strukture estera etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat i amina 1-adamantilamina i cikloheksilamina vezanje navedenih molekula u aktivno mjesto enzima CalB je vjerojatno sterički ometano, zbog čega priprava amida enzimskom katalizom nije bila uspješna.

Esteri etil-glioksilat oksim, etil-MEM-glioksilat oksim i etil-fenilacetat uspješno se vežu u aktivno mjesto enzima, te su zbog toga reakcije navedenih estera s aminima *n*-butilaminom i benzilaminom bile uspješne.

4.4. CalB-BOP METODA

4.4.1. Optimizacija uvjeta CalB-BOP reakcija

Optimizacija uvjeta CalB-BOP reakcije provedena je na reakciji estera etil-fenilacetata **E3** i amina *n*-butilamina **A1**.

Provedene su reakcije s istim količinama estera i amina, te su varirane su količine enzima, trietilamina i temperatura reakcije. Uvjeti provedenih reakcija prikazani su u tablici 11.

Tablica 11. Količine tvari i uvjeti provedenih reakcija

	<i>m</i> (CalB) / mg	<i>V</i> (Et ₃ N)	<i>t</i> / °C	iskorištenje
I	250	1 ekv.	40	68 %
II	250	1 ekv	50	/
III	250	2 ekv	40	57 %
IV	300	1 ekv	40	/

Reakcije su provedene na način da su u reakcijsku smjesu dodaju ester, amin, Et₃N i CalB enzim. Reakcije su zagrijavane na određenu temperaturu, te su praćene TLC-om. Reakcije su zaustavljene nakon 5 sati kada je TLC-om primjećeno da u reakcijskoj smjesi nema više neizreagirano estera. Nakon toga je dodan BOP, te su reakcije zagrijavane na istoj temperaturi.

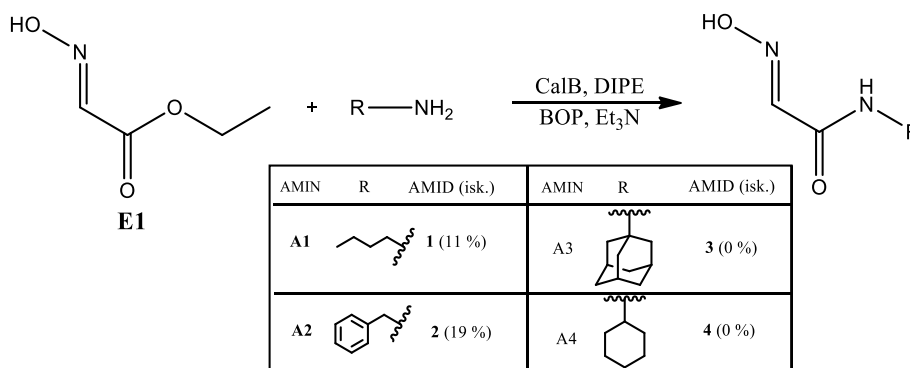
Sve provedene reakcije su napredovale približno jednako te se može zaključiti da varirani uvjeti nemaju velikog utjecaja na samu reakciju. Reakcijske smjese **I** i **III** su pročišćene, te su produkti izolirani uz iskorištenja od 68 % i 57 %.

Provedena je reakcija u kojoj su svi reaktanti dodani u reakcijsku smjesu istovremeno. Reakcija je zagrijavana 3 sata na 50 °C uz iste količine reaktanata kao u prethodnim reakcijama, te je dodano 1,5 ekvivalenata Et₃N. Produkt je izoliran uz iskorištenje 73 %.

Iz navedenog je zaključeno da je za navedenu reakciju povoljnije da se reakcija provede na način da se svi reaktanti istovremeno dodaju u reakcijsku smjesu, te da se reakcija zagrijava na 50 °C. Stoga su reakcije ostalih estera i amina provedene ovaj način.

4.4.2. Reakcije etil-glioksilat oksima

Provedene reakcije etil-glioksilat oksima **E1** s aminima **A1-A4** u uvjetima CalB-BOP metode prikazane su na slici 48.



Slika 48. Reakcije estera etil-glioksilat oksima **E1** provedene CalB-BOP metodom s aminima: *n*-butilaminom **A1**, benzilaminom **A2**, 1-adamantilaminom **A3** i cikloheksilaminom **A4**

Reakcija etil-glioksilat oksima i *n*-butilamina, te reakcija istog estera s benzilaminom uz CalB i BOP kao katalizatore provedena je nekoliko puta u različitim uvjetima. Jedino u slučaju kada su reakcije provedene tako da su enzim i BOP dodani istovremeno, te su reakcije ostavljene preko noći na sobnoj temperaturi, dobiveni su i izolirani produkti amidi **1** i **2**.

U reakcijama koje su zagrijavane na 50 °C (i kada su svi reaktanti dodani istovremeno i kada je prvo provedena hidroliza te zatim dodan BOP) nastala je smjesa različitih produkata što je uočeno TLC-om i HPLC-om. Nastanak produkta amida nije bilo moguće potvrditi zbog veće količine nusprodukata pri čemu amid nije uspješno izoliran.

Iz toga je zaključeno da je ester **E1** vjerojatno prerekativan kada se reakcijska smjesa zagrijava na 50 °C, tj. da uz nastajanje produkata nastaje veći broj nusprodukata.

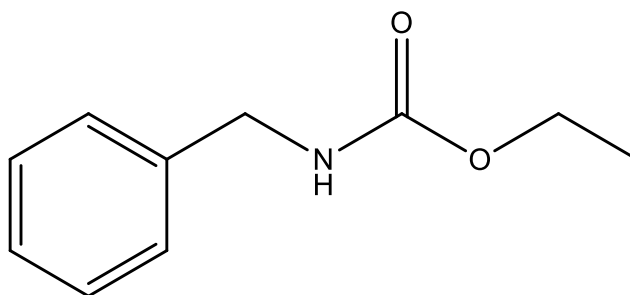
Kada je reakcija **E1** s *n*-butilaminom provedena na sobnoj temperaturi dobiven je amid, ali iskorištenje reakcije nije veliko – 11 %. Malo iskorištenje vjerojatno je također posljedica nastajanja nusprodukata, koji nastaju i u reakcijama na sobnoj temperaturi što je vidljivo TLC-om i HPLC-om. Razlog većoj reaktivnosti **E1** u navedenim reakcijama može biti slobodna –OH skupina oksimske skupine koja može reagirati kao nukleofil.

U reakciji estera **E1** s benzilaminom, amid **2** izoliran je uz iskorištenje 19 %. U NMR spektru osim signala koji odgovaraju strukturi amida uočeni su dodatni signali –CH₂-Ph skupine benzilamina. Omjeri integrala dodatnih signala u odnosu na broj jezgri vodika koje

sadrže je 0,6/2. Uz pretpostavku da su navedeni dodatni signali od benzilamina izračunato je da je stvarno iskorištenje reakcije 16 %.

U reakciji s benzilaminom jedan nusprodukt je uspješno izoliran, i to u većoj količini nego sami produkt [m (nusprodukt) = 130 mg, m (4) = 59 mg]. Dobivenom spoju su snimljeni NMR, IR i MS spektri.

Iz snimljenog ^1H NMR spektra vidljivo je da izolirani spoj sadrži esterski dio $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ skupinu i benzilnu skupinu amina $-\text{CH}_2-\text{Ph}$. Također, u ^{13}C NMR spektru uočen je izostanak signala $\text{HC}=\text{N}$ oksimske skupine, te su vidljivi signali i benzilne skupine amina, te etoksi skupine estera. Iz IR spektra može se zaključiti da dobiveni spoj ne sadrži slobodnu $-\text{OH}$ skupinu. Uočen je i izostanak signala u području $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, te s obzirom da je iz NMR spektara uočen izostanak $\text{HC}=\text{N}$ skupine, može se pretpostaviti da nusprodukt **2'** ne sadrži oksimsku skupinu. Molarna masa dobivena snimanjem MS spektra poklapa se sa molarnom masom spoja etil-benzilkarbamata ($M = 179$, slika 49.). Struktura navedenog spoja također se poklapa s dobivenim ^1H -NMR, ^{13}C -NMR i IR spektrima.



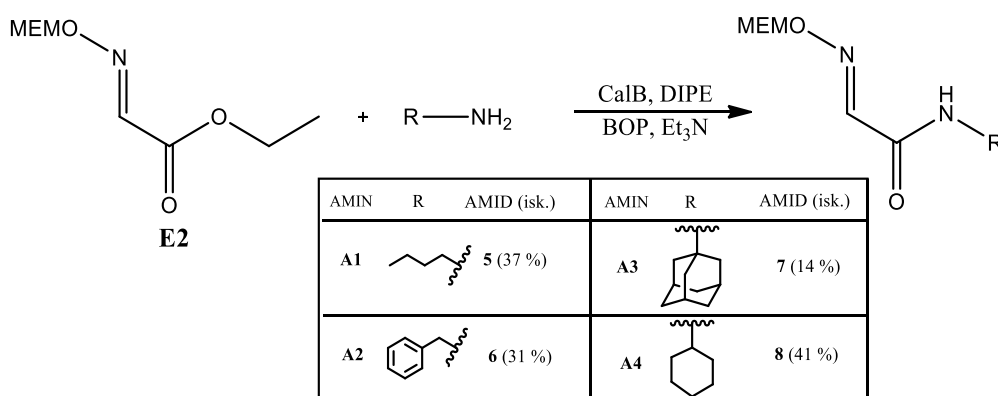
Slika 49. Strukturna formula etil-benzilkarbamata

S obzirom da nusprodukt sadrži estersku skupinu može se zaključiti da je nastali nusprodukt vjerojatno nastao u reakciji estera i amina, tj. da je ester reagirao s aminom prije same hidrolize estera enzimom. Zbog toga su obje reakcije ponovljene na način da je prvo hidroliziran ester (prvo je u reakcijsku smjesu dodan samo enzim i ester), te kada je TLC-om i HPLC-om vidljivo da je većina estera hidrolizirana dodan amin, BOP i Et_3N , te je reakcija provedena na sobnoj temperaturi. U reakcijama provedenim na ovaj način isto nisu izolirani amidi **1** i **2**. Reakcija je provedena i iz prethodno pripremljene soli kiseline estera. U toj reakciji primjećena je slaba topljivost kiseline u DIPE, što je to moguć razlog zbog kojeg u navedenim reakcijama nisu uspješno pripremljeni amidi **1** i **2**.

Reakcije s 1-adamantilaminom **A3** i cikloheksilaminom **A4** provedene su na način da su svi reaktanti i katalizatori pomiješani u DIPE-u, te je reakcija zagrijavana na 50 °C. U tim uvjetima nije došlo do nastanka amida, vjerojatno iz istih razloga kao i u reakcijama s aminima **A1** i **A2**.

4.4.3. Reakcije etil-MEM-glioksilat oksima

Reakcije estera **E2** s istim aminima uz CalB i BOP kao katalizatore bile su uspješnije od istih reakcija estera bez MEM zaštitne skupine. Provedene reakcije prikazane su na Slici 50.



Slika 50. Reakcije estera etil-MEM-glioksilat oksima **E2** provedene CalB-BOP metodom s aminima: *n*-butilaminom **A1**, benzilaminom **A2**, 1-adamantilaminom **A3** i cikloheksilaminom **A4**

U reakciji s *n*-butilaminom produkt amid **5** dobiven je uz iskorištenje od 37 %. Produkt je uspješno pročišćen i izoliran na kromatografskoj koloni. Reakcija s benzilaminom također je bila uspješna, te je amid **6** dobiven uz iskorištenje od 31 %. Iskorištenja reakcija s *n*-butilaminom i benzilaminom nisu velika, ali su dobra, te veća nego u reakcijama estera **E1**.

CalB-BOP metodom dobiven je i amid **7** uz iskorištenje od 14 %. Nastajanje amida potvrđeno je analizom snimljenih ¹H i ¹³C spektara. Spektri osim signala amida sadrže i signale -OCH₂CH₃ skupine estera. Omjeri integrala dodatnih signala u odnosu na broj jezgri vodika koje sadrže su 0,4/2 i 0,7/3. Uz pretpostavku da su navedeni dodatni signali od estera **E2** izračunato je da je stvarno iskorištenje reakcije 11 %.

Iskorištenje reakcije je malo, ali navedeni amid nije uspješno pripremljen ni bazno kataliziranom metodom ni u reakcijama enzimske katalize. U obje reakcije problem je bila

struktura 1-adamantilamina koja je u baznoj katalizi sterički ometala napad amino-skupine na karbonilnu skupinu estera, a u enzimski kataliziranoj reakciji 1-adamantilamin se nije mogao vezati u aktivno mjesto zbog steričkih razloga.

U CalB-BOP metodi amin reagira s hidroliziranim esterom aktiviranim pomoću BOP reagensa te izvan aktivnog mjesta enzima. Time sterička ometanja zbog voluminozne strukture amina imaju manji utjecaj na reakciju zbog veće reaktivnosti samog estera.

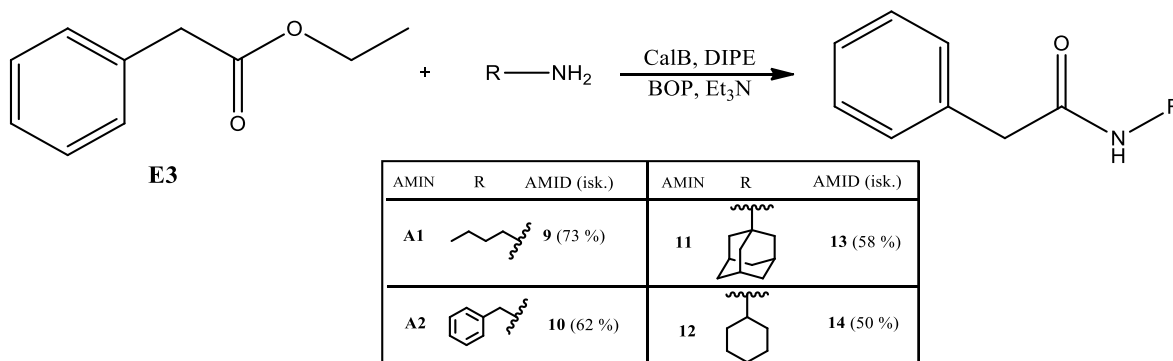
Navedeno se može primjeniti i u reakciji s cikloheksilaminom. U reakciji **E2** s cikloheksilaminom, amid **8** dobiven je uz iskorištenje reakcije 41 %, što je više nego u istim reakcijama provedenim enzimskom i baznom katalizom.

Usporedbom s istim reakcijama provedenim s **E1** vidljivo je da MEM zaštitna skupina ima utjecaja na reaktivnost estera u ovoj metodi. Nezaštićeni oksim ima slobodnu –OH skupinu koja može reagirati kao nukleofil što može uzrokovati nastanak nusprodukata, te time manje iskorištenje. Kod estera **E2** hidroksilna skupina je zaštićena čime je smanjen broj mogućih kompetitivnih reakcija.

Iskorištenja svih reakcija estera **E2** u uvjetima CalB-BOP metode nisu velika, ali su u svim reakcijama dobiveni i izolirani amidi, te je modifikacija samih uvjeta reakcije dobra strategija za postizanje boljih iskorištenja reakcija.

4.4.4. Reakcije etil-fenilacetata

Provedene su i reakcije etil-fenilacetata **E3** s aminima **A1-A4** (slika 51.). U reakciji s *n*-butilaminom produkt **9** izoliran je uz iskorištenje 73 %, a u reakciji s benzilaminom amid **10** dobiven je uz iskorištenje 62 %. U reakciji estera **E3** s 1-adamantilaminom dobiven je produkt **11** uz iskorištenje 58 %, te u reakciji s cikloheksilaminom amid **12** izoliran je uz iskorištenje 50 %.



Slika 51. Reakcije estera etil-fenilacetata **E3** provedene CalB-BOP metodom s aminima: *n*-butilaminom **A1**, benzilaminom **A2**, 1-adamantilaminom **A3** i cikloheksilaminom **A4**

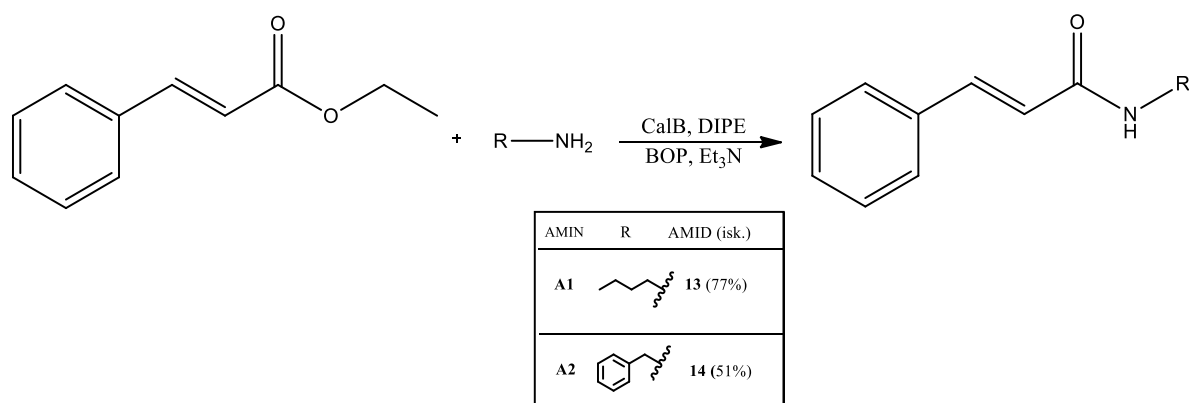
Produkti – amidi uspješno su pripremljeni u reakcijama estera **E3** sa svim korištenim aminima. Iskorištenja reakcija **E3** su vrlo dobra, te su produkti uspješno pročišćeni i izolirani.

Usporedbom s reakcijama estera **E1** i **E2** provedenih s istim aminima CalB-BOP metodom vidljivo je da su reakcije estera **E3** bile uspješnije. Razlog tome je vjerojatno to što su esteri **E1** i **E2** u CalB-BOP i u ostalim metodama bili reaktivniji od estera **E3**, što je za posljedicu imalo veća iskorištenja u enzimski i bazno kataliziranim reakcijama, te manja iskorištenja zbog nastanka nusprodukata u reakcijama provedenim CalB-BOP metodom.

4.4.5. Reakcije etil-(E)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata

Provedene su reakcije etil-(E)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4** s *n*-butilaminom **A1** i benzilaminom **A2** u uz CalB i BOP kao katalizatore. U obje reakcije odgovarajući amidi nisu pripremljeni. Razlog zbog kojeg nije došlo do reakcije je to što ester **E4** nije moguće enzimski hidrolizirati zbog nemogućnosti vezanja estera u aktivno mjesto enzima CalB. Navedeno je dokazano i objašnjeno u enzimski kataliziranim reakcijama.

Kako bi se objasnili razlozi nemogućnosti vezanja estera u aktivno mjesto enzima, provedena je reakcija s esterom *trans*-etil-cinamatom, koji ima iste funkcionalne skupine kao **E4**, ali je očekivano da će sterički utjecaji biti smanjeni zbog manje aromatske skupine (slika 32.). Reakcija *trans*-etil-cinamata s aminima **A1** i **A2** provedene su na isti način kao i reakcije estera **E4**. Dobiveni su amidi *N*-butilcinamamid i *N*-benzilcinamamid uz iskorištenja 77 % i 51 % (slika 52.)



Slika 52. Reakcije estera *trans*-etil-cinamata provedene CalB-BOP metodom s aminima *n*-butilaminom **A1** i benzilaminom **A2**

S obzirom da su reakcije navedenog estera bile uspješne, a reakcije estera **E4** nisu, može se zaključiti da su dodatni benzenski prstenovi koje sadrži **E4** razlog zbog kojeg se ester **E4** ne može vezati u aktivno mjesto enzima.

4.4.6. CalB-BOP metoda – usporedba rezultati

U tablici 12. prikazane su sve reakcije provedene uz enzim CalB i kondenzirajući reagens BOP, te dobiveni rezultati i iskorištenja.

Tablica 12. CalB-BOP katalizirane reakcije: rezultati i iskorištenja reakcija

CalB-BOP METODA				
	<i>n</i> -butilamin	benzilamin	1-adamantilamin	cikloheksilamin
Etil-glioksilat oksim E1	11 %	*16 %	0 %	0 %
Etil-MEM-glioksilat oksim E2	37 %	31 %	*11 %	41 %
Etil-fenilacetat E3	73 %	62 %	58 %	50 %
Etil-(<i>E</i>)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat E4	0 %	0 %	/	/

* izračunata iskorištenja s obzirom na NMR signale nečistoća primjećениh u spektrima

Od korištenih estera svi osim estera **E4** su reagirali s aminima **A1** i **A2** pri čemu je došlo do nastanka amida. S aminima **A3** i **A4** dobiveni su amidi u reakcijama estera **E2** i **E3**.

Princip CalB-BOP metode je da tijekom reakcije prvo dođe do enzimski katalizirane hidrolize estera, te zatim aktivacije hidroliziranog estera BOP kondenzirajućim reagensom koji katalizira reakciju s aminom pri čemu nastaje amid.

Vezanje estera etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata vjerojatno je, kao i u reakcijama enzimске katalize, sterički onemogućeno, što onemogućuje enzimsku hidrolizu estera. Reakcija strukturno sličnog estera *trans*-etil-cinamata je bila uspješna što upućuje na to da je onemogućeno vezanje **E4** u aktivno mjesto posljedica razlike u aromatskim skupinama vezanim na *trans* dvostruku vezu estera. Može se zaključiti da CalB-BOP metoda nije povoljna metoda za dobivanje amida iz etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata, ali metoda bi mogla biti primjenjiva za strukturno slične estere koji umjesto fenantrenskog supstituenta imaju manje voluminozan supstituent.

Reakcije etil-fenilacetata bile su uspješne, dobivena iskorištenja sa svim aminima su vrlo dobra (tablica 12.). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je ova metoda dobra za dobivanje odgovarajućih amida reakcijama etil-fenilacetata s aminima *n*-butilaminom, benzilaminom, 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom.

U CalB-BOP metodi amin reagira s hidroliziranim esterom aktiviranim pomoću BOP reagensa te izvan aktivnog mjesta enzima, pa time sterička ometanja zbog voluminozne strukture amina imaju manji utjecaj na reakciju. Navedeno objašnjava uspješnost reakcija s volumioznijim aminima 1-adamantilaminom i cikloheksilaminom.

Reakcije etil-MEM-glioksilat oksima i etil-glioksilat oksima bile su manje uspješne od reakcija etil-fenilacetata.

U reakcijama etil-glioksilat oksima amidi su dobiveni samo s *n*-butilaminom i benzilaminom i to uz mala iskorištenja. TLC-om i HPLC-om detektirano je nastajanje više nusprodukata. Isprobani su različiti uvjeti, te su amidi dobiveni samo u reakcijama koje su provedene na sobnoj temperaturi (dok su ostale CalB-BOP reakcije provedene na 50 °C), te je primjećena slaba topljivost hidroliziranog estera u DIPE. Navedeno upućuje na to da bi za ester **E1** možda bila potrebna daljnja optimizacija uvjeta reakcija kako bi se povećala uspješnost ili da ester **E1** zbog slobodne –OH oksimske skupine nije povoljan supstrat za navedenu metodu.

Ester etil-MEM-glioksilat oksim nema slobodnu –OH skupinu oksima, te su vjerovatno zbog toga reakcije zaštićenog etil-glioksilat oksima bile uspješnije od estera bez MEM zaštitne skupine.

Iskorištenja reakcija etil-MEM-glioksilat oksima nisu velika, ali samo nastajanje i uspješna izolacija amida upućuje na potencijal metode za sintezu amida iz etil-MEM-glioksilat oksima i korištenih amina. Možda samom optimizacijom uvjeta reakcije kao što su temperatura, otapalo, vrijeme reakcije, ili korištenjem drugog kondenzacijskog reagensa, se iskorištenja reakcija mogu povećati, kao i u ostalim reakcijama u kojima su amidi uspješno sintetizirani uz manja iskorištenja.

4.5. USPOREDBA METODA

U tablici 13. prikazani su dobiveni rezultati i iskorištenja svih provedenih reakcija estera i amina u uvjetima bazne katalize, enzimske katalize i CalB-BOP kataliziranih reakcija.

Tablica 13. Rezultati i iskorištenja dobiveni u provedenim reakcijama sinteze amida: enzimski katalizirane reakcije, bazno katalizirane i reakcije katalizirane enzimom i BOP reagensom

BAZNO KATALIZIRANA METODA				
	<i>n</i> -butilamin	benzilamin	1-adamantilamin	cikloheksilamin
etil-gliksilat oksim E1	51 %	*36 %	0 %	11 %
etil-MEM-gliksilat oksim E2	*39 %	*31 %	0 %	* < 23 %
etil-fenilacetat E3	0 %	0 %	0 %	0 %
etil-(<i>E</i>)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat E4	0 %	0 %	0 %	0 %
ENZIMSKI KATALIZIRANA METODA				
	<i>n</i> -butilamin	benzilamin	1-adamantilamin	cikloheksilamin
etil-gliksilat oksim E1	94 %	80 %	0 %	29 %
etil-MEM-gliksilat oksim E2	74 %	61 %	0 %	33 %
etil-fenilacetat E3	68 %	61 %	0 %	10 %
etil-(<i>E</i>)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat E4	0 %	0 %	/	/
CalB-BOP METODA				
	<i>n</i> -butilamin	benzilamin	1-adamantilamin	cikloheksilamin
etil-gliksilat oksim E1	11 %	*16 %	0 %	0 %
etil-MEM-gliksilat oksim E2	37 %	31 %	*11 %	41 %
etil-fenilacetat E3	73 %	62 %	58 %	50 %
etil-(<i>E</i>)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat E4	0 %	0 %	/	/

* izračunata iskorištenja s obzirom na NMR signale nečistoća primjećених u spektrima

Najmanje produkata amida dobiveno je u reakcijama bazne katalize. Samo esteri **E1** i **E2** su reagirali s aminima *n*-butilaminom, benzilaminom i cikloheksilaminom, te su u reakcijama s cikloheksilaminom amidi dobiveni uz mala iskorištenja.

Iskorištenja reakcija estera **E1**, **E2** i **E3** su u enzimski kataliziranim reakcijama veća nego u bazno kataliziranim reakcijama. Reakcije s *n*-butilaminom i benzilaminom imaju vrlo dobra iskorištenja (61-94 %). Iz toga se može zaključiti da je metoda enzimske katalize bolja metoda za pripravnu odgovarajućih amida iz navedenih estera i amina.

CalB-BOP metoda pokazala se kao dobra metoda za sintezu amida iz estera etil-fenilacetata i korištenih amina. U usporedbi s ostalim metodama, CalB-BOP metoda se pokazala najboljom za sintezu odgovarajućih amida iz navedenih estera i amina, pogotovo za amide dobivene reakcijom etil-fenilacetata s cikloheksilaminom i 1-adamantilaminom, koji nisu dobiveni ni u bazno kataliziranim ni u enzimski kataliziranim reakcijama. CalB-BOP metoda nije se pokazala povoljnom za sintezu amida iz estera etil-glioksilat oksima.

U reakcijama bazne katalize dobiveni rezultati vjerojatno su posljedica slabe reaktivnosti estera u reakcijama nukleofilne supstitucije, te steričkim utjecajima zbog volumioznih struktura estera i amina u slučaju estera etil-fenilacetata i etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata te amina 1-adamantilamina i cikloheksilamina.

U reakcijama enzimске katalize slaba reaktivnost estera etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata, te u reakcijama estera s 1-adamantilaminom je posljedica nemogućnosti vezanja navedenog estera i amina u aktivno mjesto enzima. Sterička ometanost vezanja u aktivno mjesto također je uzrok malih iskorištenja reakcija s cikloheksilaminom.

U reakcijama kataliziranim s CalB i BOP reagensom ester se enzimski hidrolizira, a zatim reagira s aminom uz BOP kao katalizator, zbog toga samo ester ulazi u aktivno mjesto enzima. Slaba reaktivnost etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata posljedica je nemogućnosti vezanja navedenog estera u aktivno mjesto enzima CalB, što je uzrok i neuspješnosti enzimski kataliziranih reakcija istog estera. S obzirom da amin ne ulazi u aktivno mjesto enzima, što u enzimski kataliziranim reakcijama predstavlja problem za amine 1-adamantilamin i cikloheksilamin zbog njihove volumiozne strukture, uspješnost reakcija s navedenim aminima veća je u reakcijama provedenim CalB-BOP metodom. U reakcijama etil-glioksilat oksima i etil-MEM-glioksilat oksima primjećeno je nastajanje većeg broja nusprodukata što je vjerojatno posljedica veće reaktivnosti navedenih estera.

§ 5. ZAKLJUČAK

CalB-BOP metoda specifična je po tome što se enzim koristi za hidrolizu estera, a kondenzacijski reagens kao katalizator za reakciju s aminom. Prilikom enzimske hidrolize estera potrebno uspješno vezanje i smještanje estera u aktivno mjesto enzima zbog čega je metoda ograničena samo na estere koji se mogu vezati u aktivno mjesto enzima. To isključuje voluminoznije estere kao što je etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoat. Amin reagira s hidroliziranim i aktiviranim esterom izvan aktivnog mjesta enzima zbog čega je metoda povoljna za volumiozne amine kao što su korišteni 1-adamantilamin i cikloheksilamin. CalB-BOP metoda se u usporedbi s metodom sinteze amida enzimskom katalizom u slučaju volumioznijih amina pokazala pogodnijom i uspješnijom. Navedeno je posljedica toga da se u enzimski kataliziranoj reakciji nastajanja amidne veze i amin mora vezati u aktivno mjesto enzima, što je u slučaju većih amina sterički onemogućeno ili otežano.

Također, CalB-BOP metoda se nije pokazala naročito uspješnom u reakcijama estera etil-glioksilat oksima. Povećana reaktivnost zbog oksimske skupine, te slobodne –OH skupine koja može reagirati kao nukleofili uzrokuje nastajanje nusprodukata i manja iskorištenja reakcija. Stoga se može zaključiti da navedena metoda nije povoljna za reaktivnije estere i estere koje u svojoj strukturi sadrže slobodne oksimske skupine.

Za zaštićeni i nezaštićeni etil-glioksilat oksim enzimska kataliza pokazala se kao bolja metoda u reakcijama s manje volumioznim aminima – *n*-butilaminom i benzilaminom. Za navedene i slične spojeve moguća je optimizacija CalB-BOP metode korištenjem drugog kondenzacijskog reagensa ili promjenom uvjeta same reakcije. Bolji rezultati mogu se postići i uvođenjem zaštitnih skupina na slobodne –OH skupine. Uvođenjem MEM zaštitne skupine na etil-glioksilat oksim dobiveni su bolji rezultati.

Može se zaključiti da je enzimska kataliza povoljnija metoda za reaktivnije estere i manje amine, a CalB-BOP metoda za manje reaktivne estere bez slobodne –OH skupine i voluminoznije amine, dok su obje metode ograničene na estere koji se mogu vezati u aktivno mjesto enzima. Stoga se može reći da CalB-BOP metoda ima potencijal kao alternativna metoda za reakcije koje nije moguće provesti enzimskom katalizom ili za postizanje boljih iskorištenja. Daljnji korak u razvoju metode jest istraživanje drugih pogodnih supstrata te ispitivanje drugih kondenzacijskih reagensa.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

6-CF ₃ -HOBt	1-hidroksi-6-trifluorometilbenzotriazol
6-NO ₂ -HOBt	1-hidroksi-6-nitrobenzotriazol
Asp	asparaginska kiselina, aspartat
BOP	benzotriazol-1-iloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
CalB	lipaza B iz kvasca <i>Candida antarctica</i>
CDI	karbonildiimidazol
CH ₃ CN	acetonitril
δ / ppm	kemijski pomak u ppm
DCM	diklormetan
DIPE	diizopropileter
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	dimetilformamid
DPPA	difenilfosforov azid
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
ESI-MS	spektrometrija masa uz elektroraspršenje kao način ionizacije
Et ₃ N	triethylamin
His	histidin
HMPA	heksametilfosfortriamid
HOAt	1-hidroksi-7-azabenzotriazol
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>High-performance liquid chromatography</i>)
IR	infracrveno zračenje (eng. <i>Infrared radiation</i>)
LC/MS	spektrometrija masa spregnuta s tekućinskom kromatografijom (eng. <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>)
MEM	metoksietoksimetilna skupina
MEMCl	2-metoksietoksimetil-klorid
MeOH	metanol
MHz	megaherc

MS	spektrometrija masa (eng. <i>Mass spectrometry</i>)
MTBE	metil-tert-butil-eter
m/z	omjer mase i naboja
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (eng. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
PCl_3	fosforov triklorid
PCl_5	fosforov pentaklorid
Ph	fenilna skupina
ppm	dijelova na milion (eng. <i>parts per million</i>)
R_f	faktor zadržavanja (eng. <i>retention factor</i>)
Ser	serin
SOCl_2	tionil-klorid
t_R	retencijsko vrijeme (eng. <i>retention time</i>)
TLC	tankoslojna kromatografija (eng. <i>thin-layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan

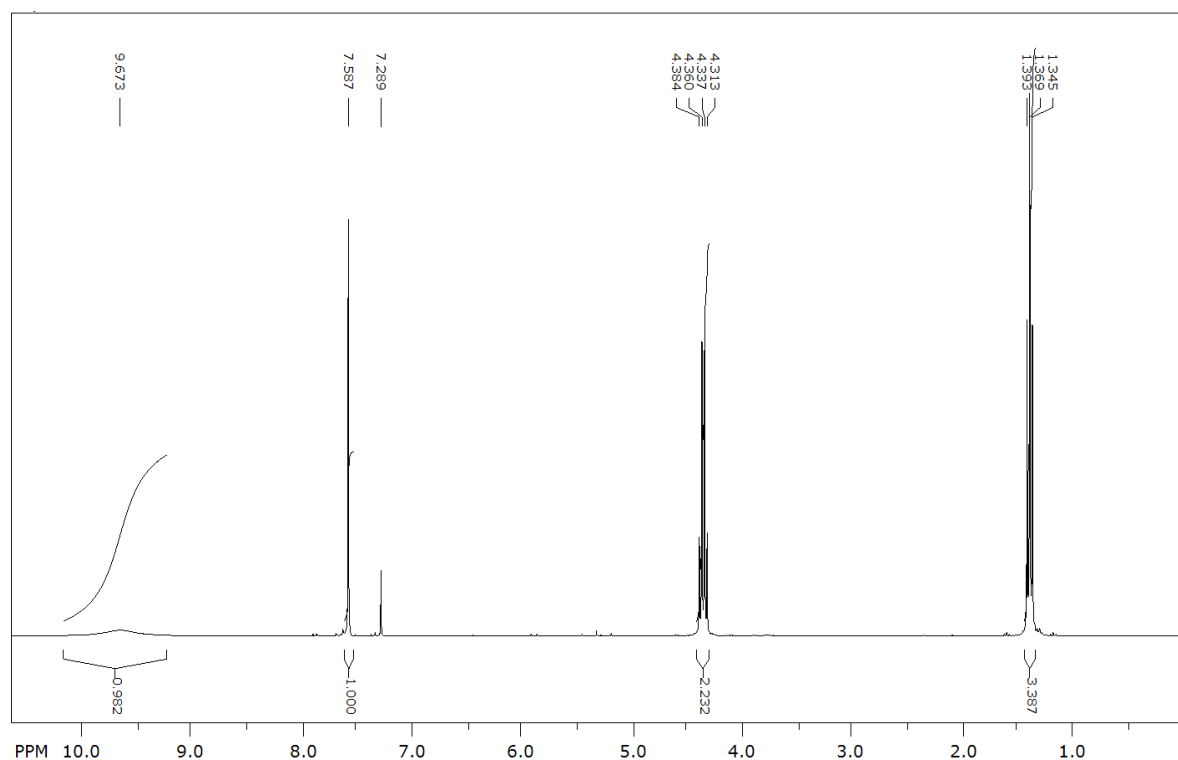
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **480** (2011) 471.–479.
2. V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **348** (2006) 797.–812.
3. A. Knežević, V. Vinković, N. Maraković, G. Šinko, *Tetrahedron Lett.* **55** (2014) 4338.–4341.
4. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606.–631.
5. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers; *Organic Chemistry*, 1. Izd., Oxford University Press Inc, New York, 2001., 12. *Nucleophilic substitution at the carbonyl (C=O) group*
6. F. A. Carey, R. J. Sundberg; *Advanced Organic Chemistry Part A - Structure and Mechanisms*, 5. Izd, Springer Science+Business Media, LLC, 2007., 7.4. *Substitution Reactions of Carboxylic Acid Derivatives*
7. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827.–10852.
8. *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups*; Pearson, A. J., Roush, W. R., Eds., Wiley: New York, 1999., str. 333., 335.-338., 370.-373.
9. T. Shioiri, K. Ninomiya, S.Y. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 6203.–6205.
10. R. Paul, W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **82** (1960) 4596.–4600.
11. Tarfah I. Al-Warhi, Hassan M.A. Al-Hazimi, Ayman El-Faham, *Journal of Saudi Chemical Society* **16** (2012) 97.–116.
12. Z.J. Kamiński, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **55** (2000.) 140.
13. B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **14** (1975.) 1219.–1222.
14. M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6** (2002) 145. – 150.
15. a) D. Wikteliu, *Synlett* **13** (2005), 2113 – 2114.
b) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **15** (2004) 3331. – 3351.
c) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **105** (2005) 313. – 354.
16. Y. Xie, J. An, G. Yang, G. Wu, Y. Zhang, L. Cui, Y. Feng, *J.Biol.Chem.* **289** (2014.) 7994-8006, PDB ID: 4K6G
17. F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **60** (2004) 501.–519.
18. M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2** (1996) 141 – 145.

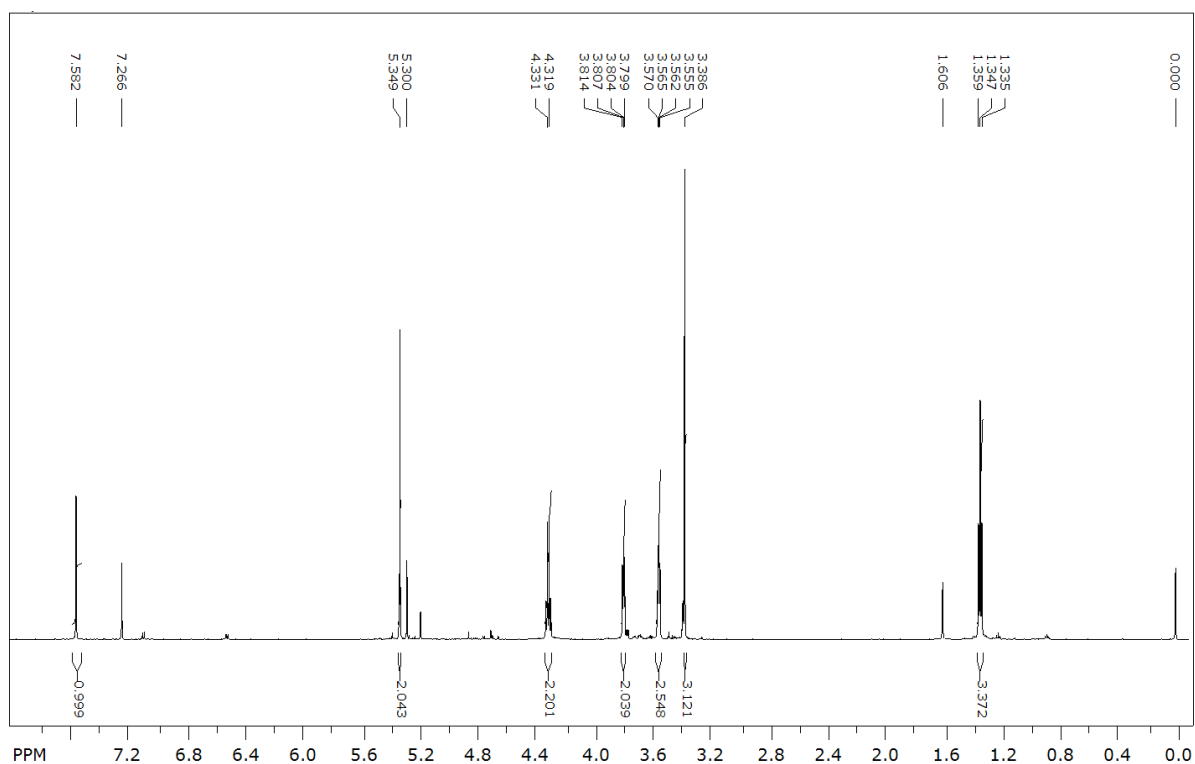
19. I. Gill, R. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 705 –709.
20. A. Baldessari, C. P. Mangone, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **11** (2001) 335 – 341.
21. F. van Rantwijk, M.A.P. J. Hacking, R. A. Sheldon, *Monatsh. Chem.* **131** (2000.) 549–569.
22. [http://www.organ.su.se/bo/Gruppfiler/NMR %20yield %20calculation.pdf](http://www.organ.su.se/bo/Gruppfiler/NMR%20yield%20calculation.pdf) (5.9.2017.)

§ 8. DODATAK

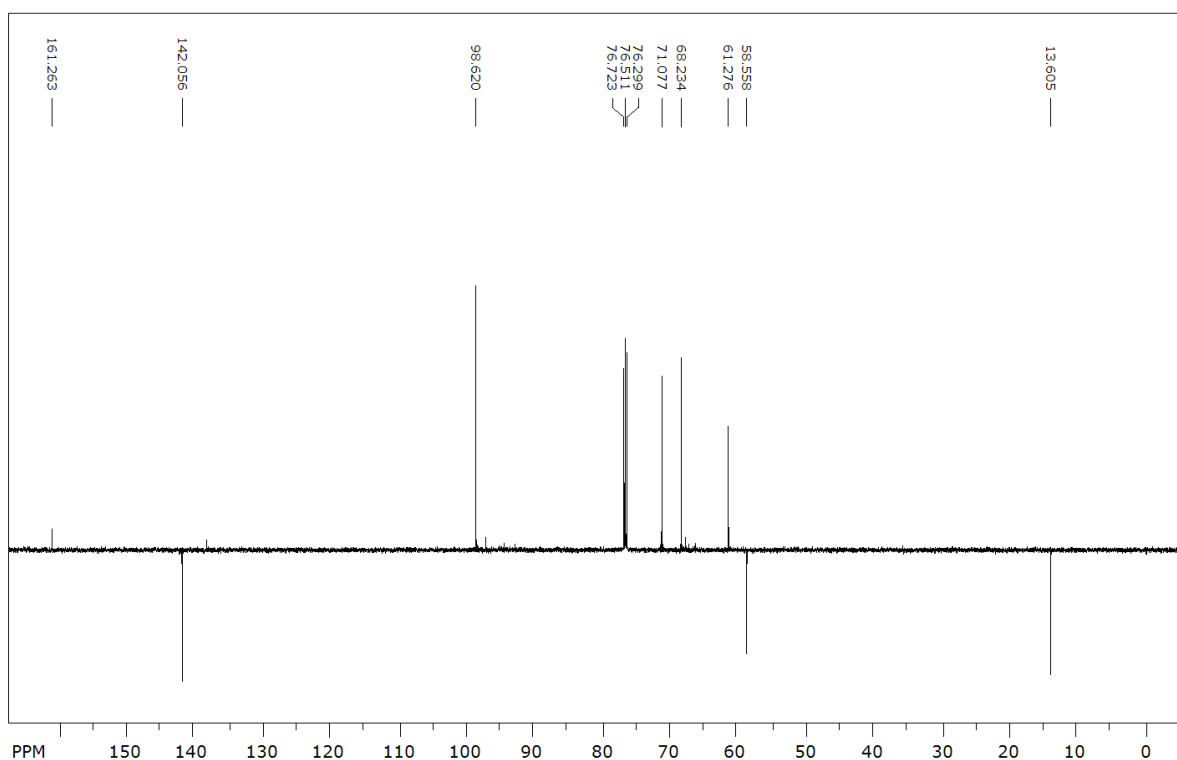
DODATAK 1: NMR spektri estera E1,E2 i E4



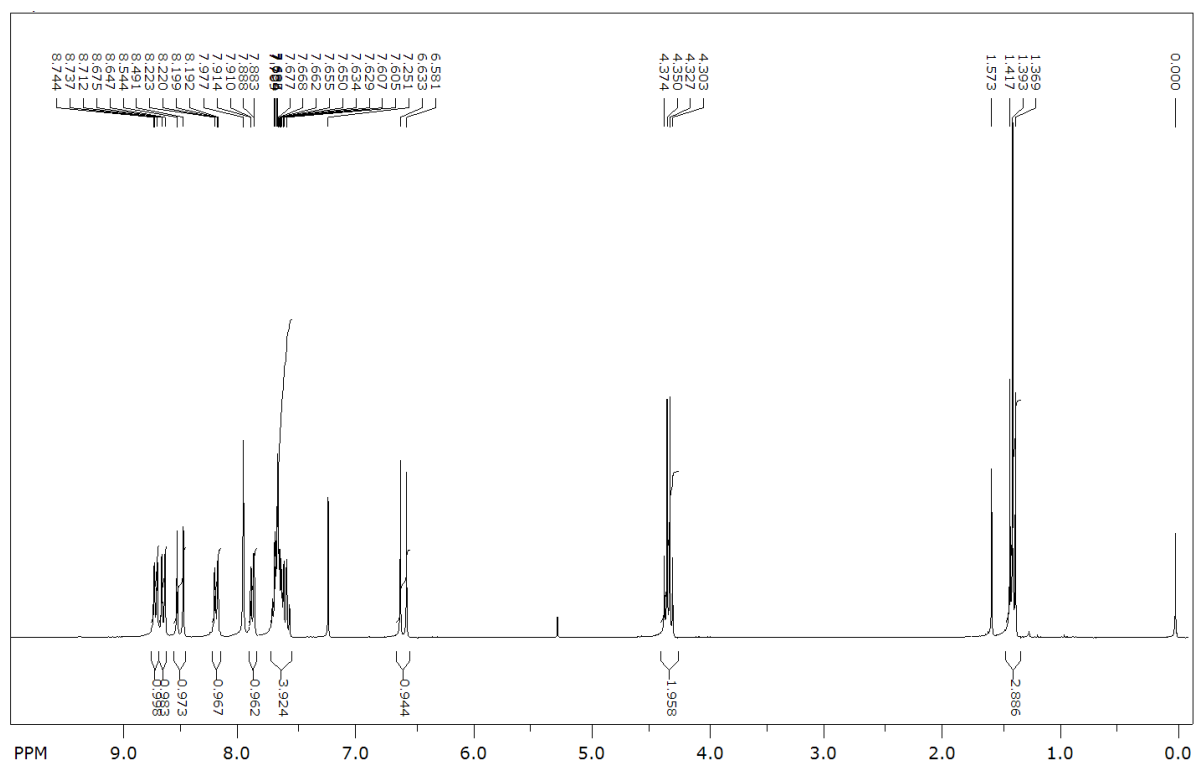
Slika D1.1. ^1H NMR spektar etil-glioksilat oksima E1



Slika D1.2 ¹H NMR spektar etil-MEM-glioksilat oksima E2

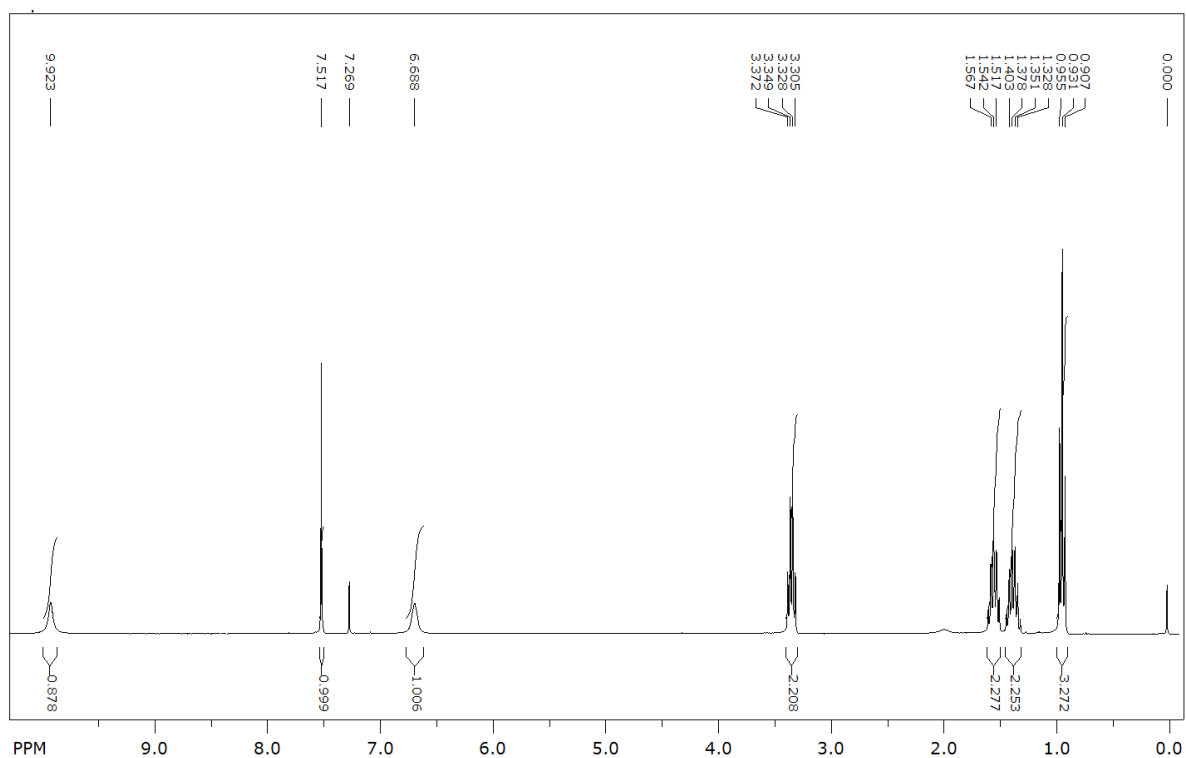


Slika D1.3 ¹³C NMR spektar etil-MEM-glioksilat oksima E2

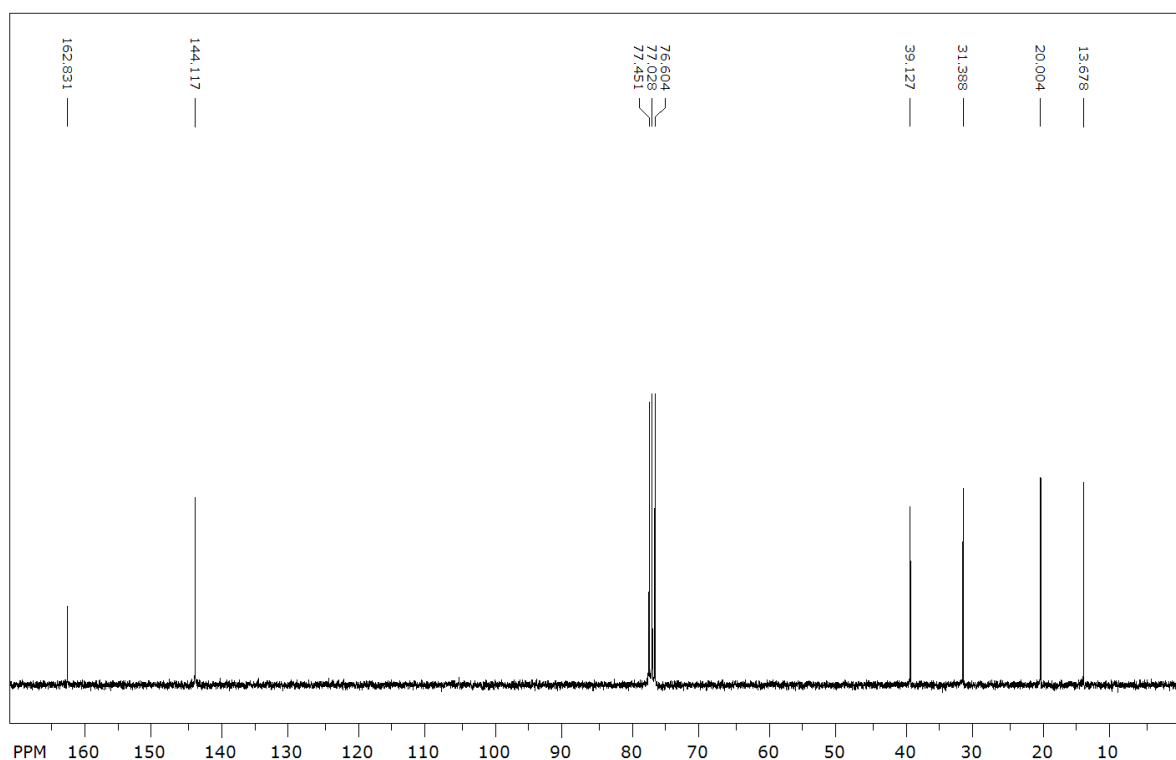


Slika D1.4 ¹H NMR spektar etil-(*E*)-3-(fenantr-9-il)-2-propenoata **E4**

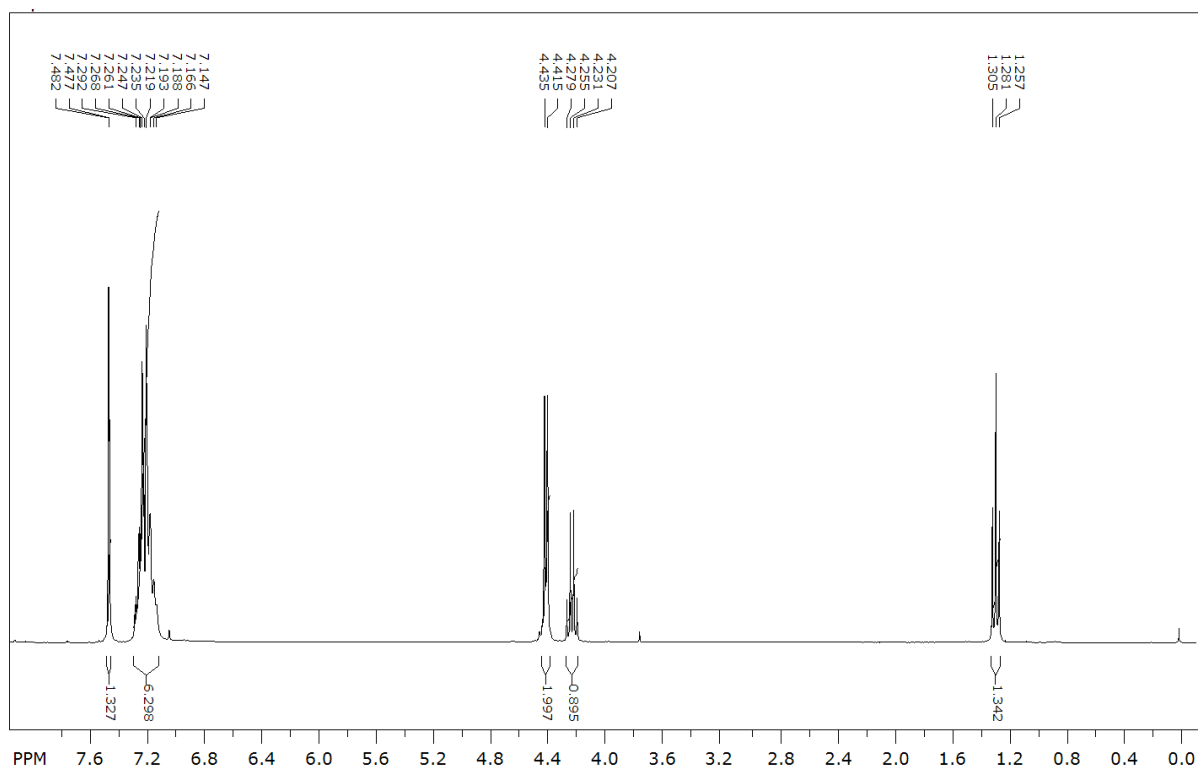
DODATAK 2: NMR spektri snimljeni u reakcijama bazne katalize



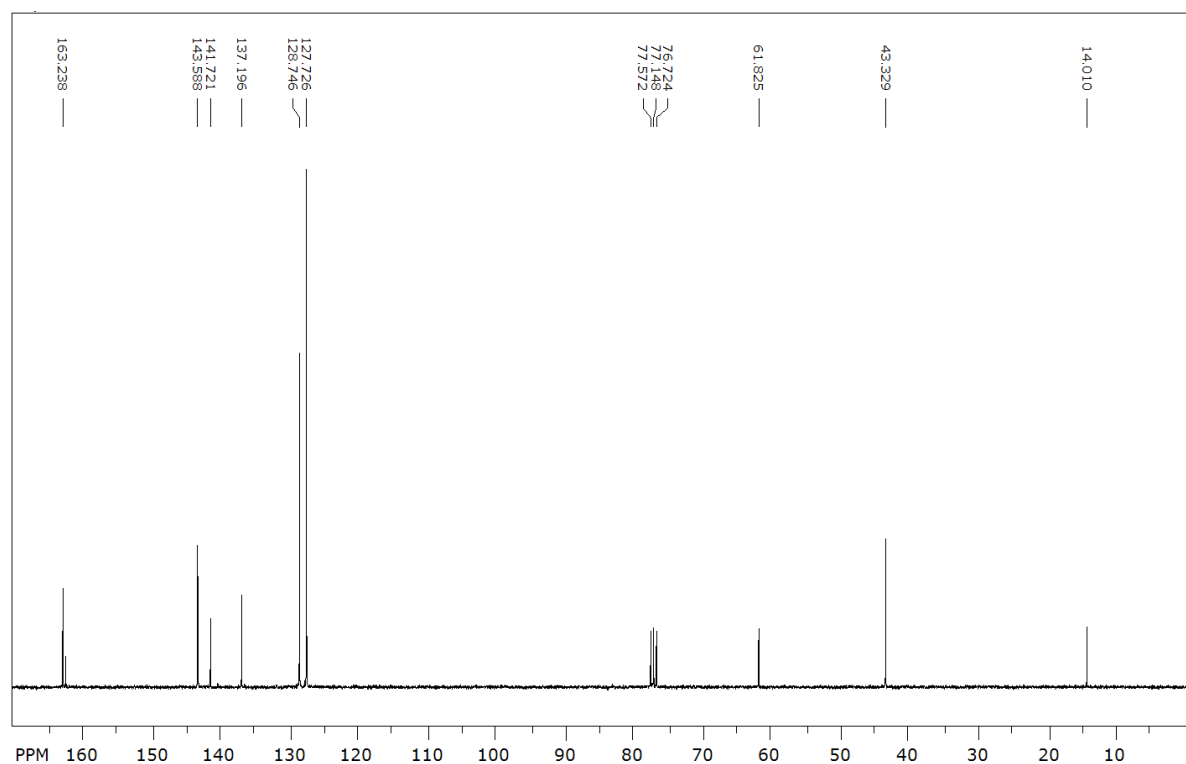
Slika D2.1. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1**



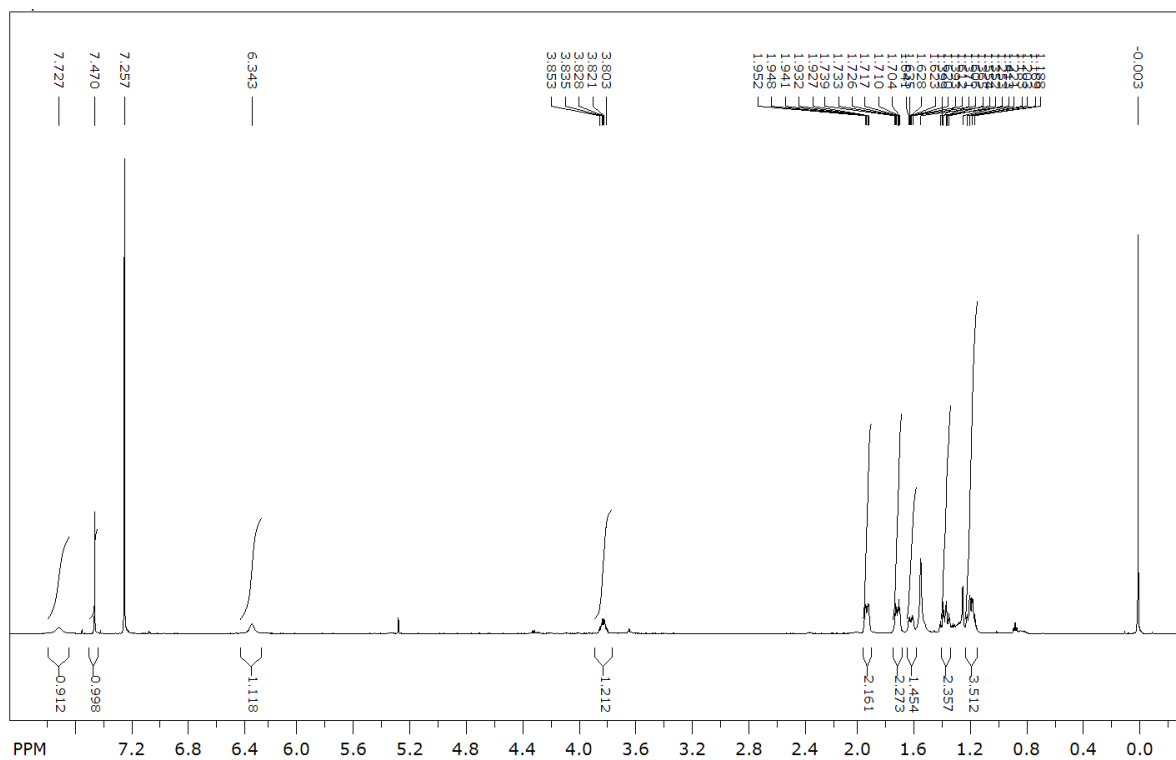
Slika D2.2. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1**



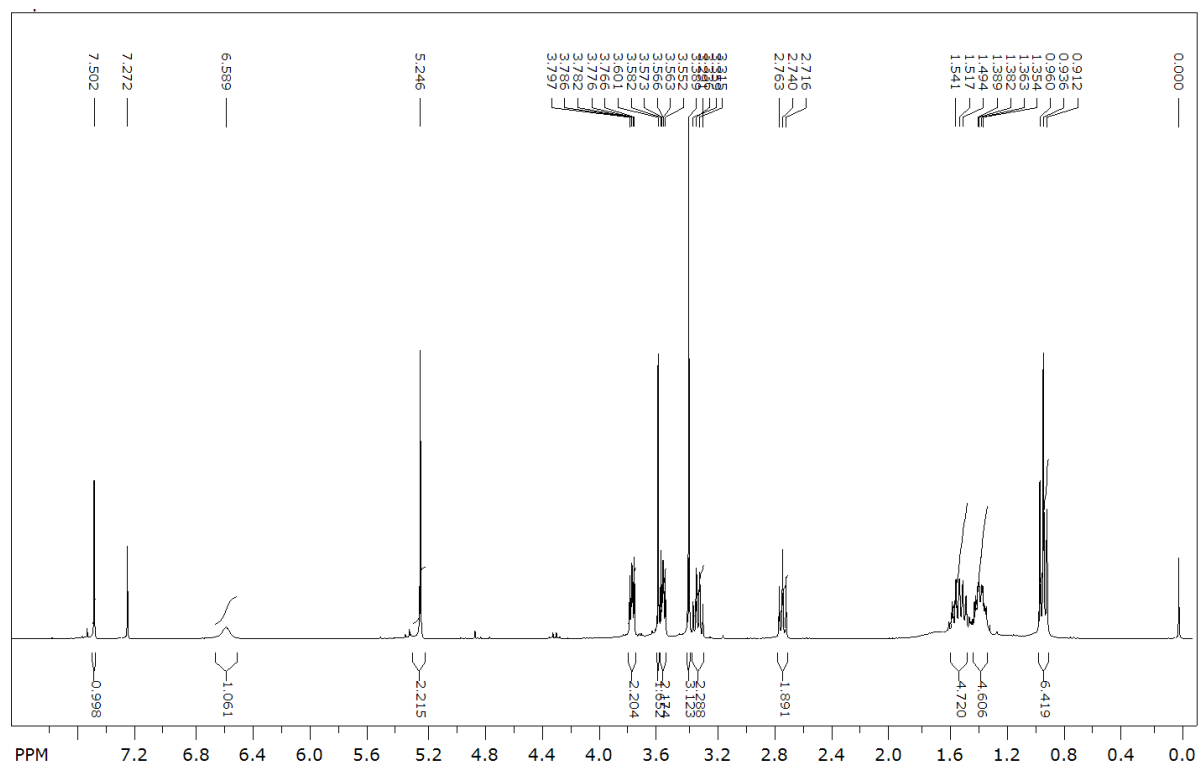
Slika D2.3. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida 2

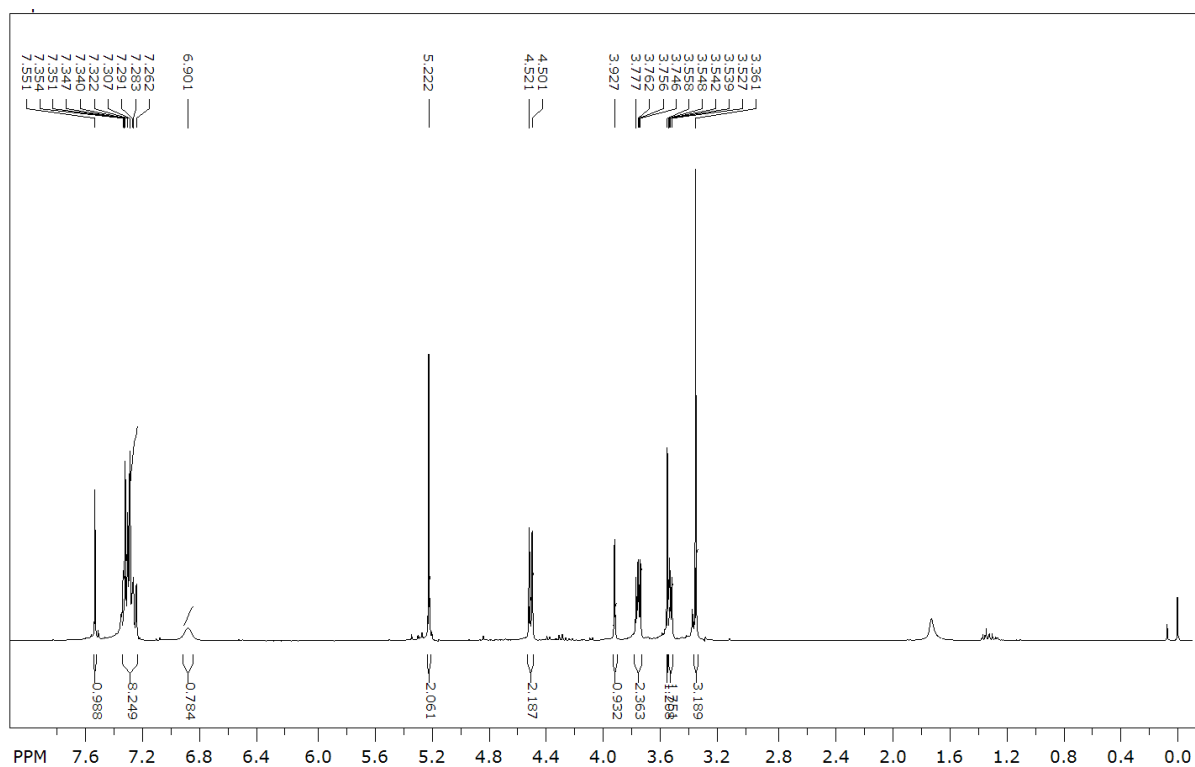


Slika D2.4. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida 2

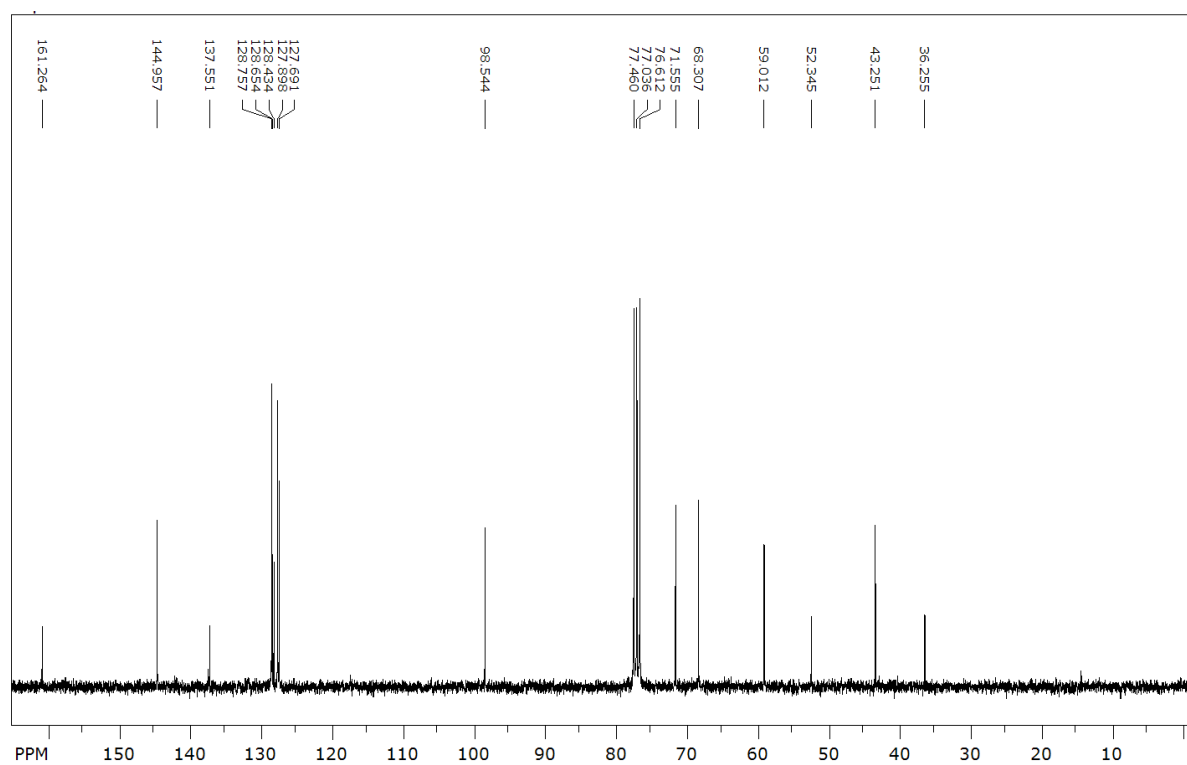


Slika D2.5. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2-(hidroksiimino)acetamida **4**

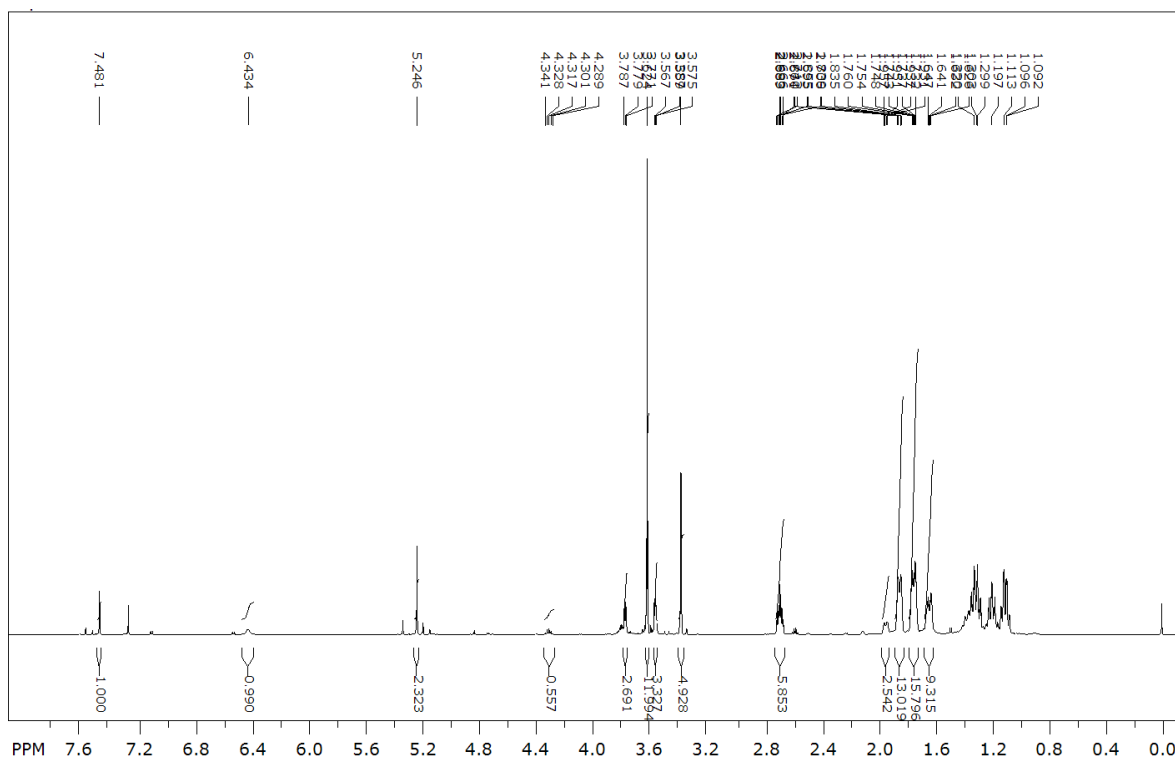




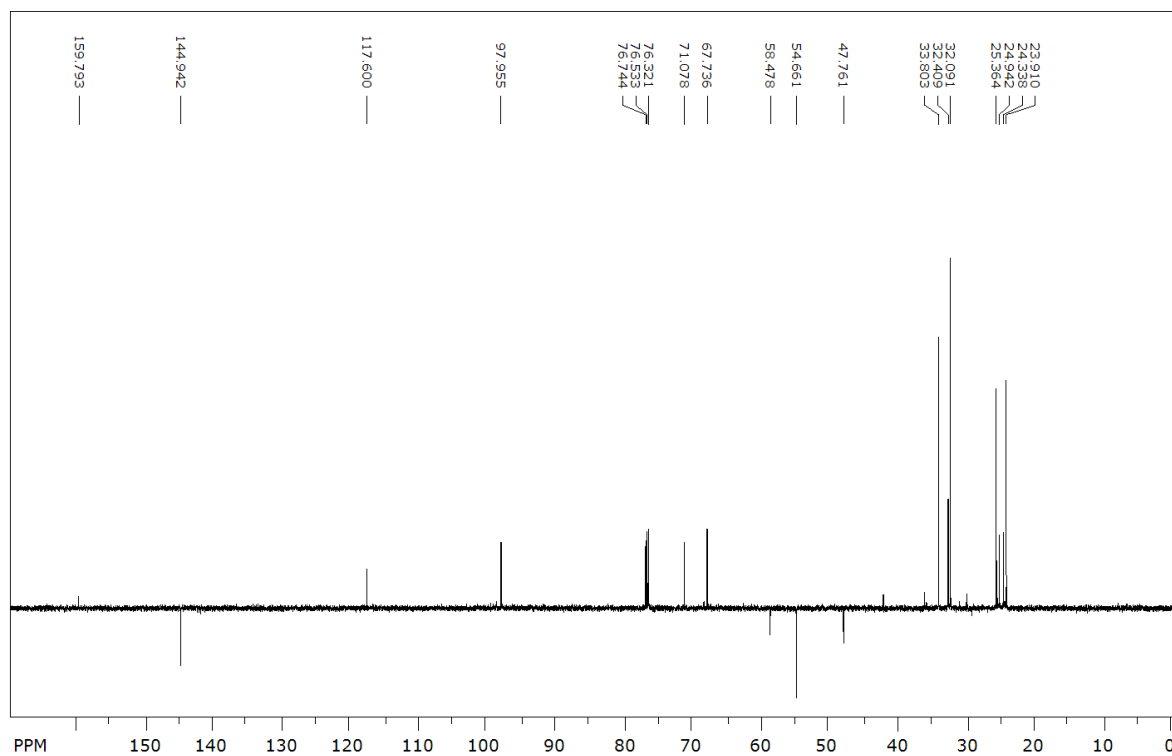
Slika D2.8. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **6**



Slika D2.9. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **6**

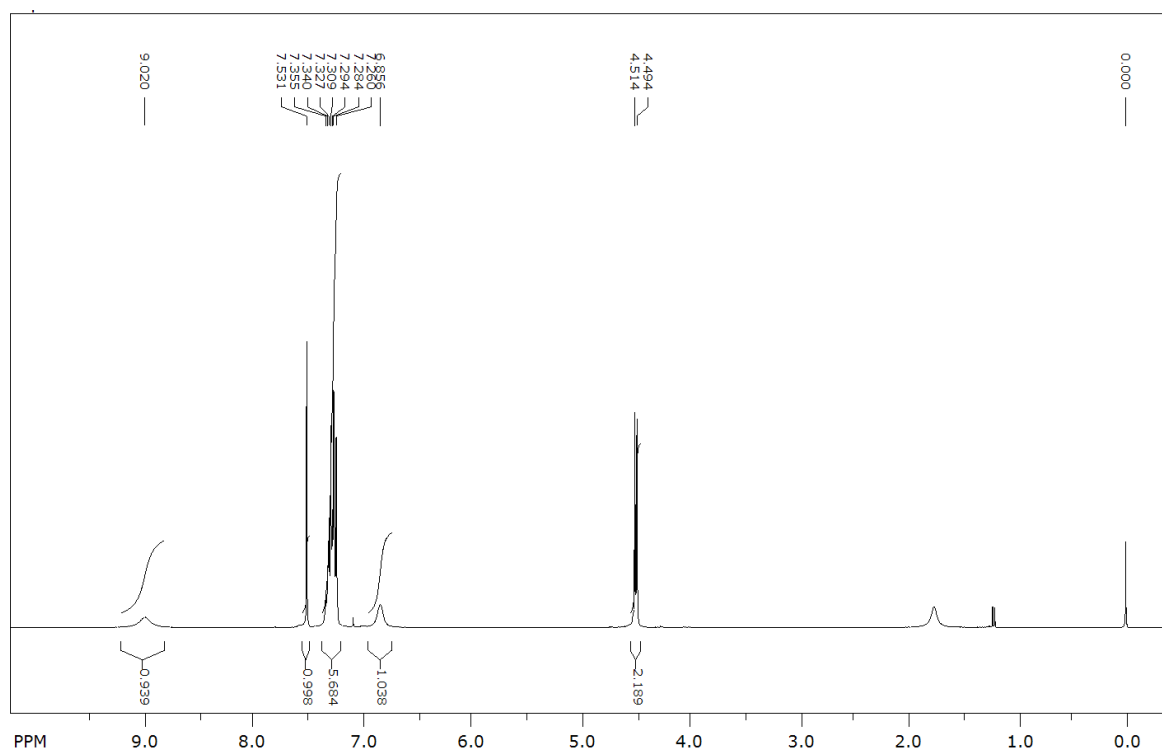


Slika D2.10. ^1H NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **8**

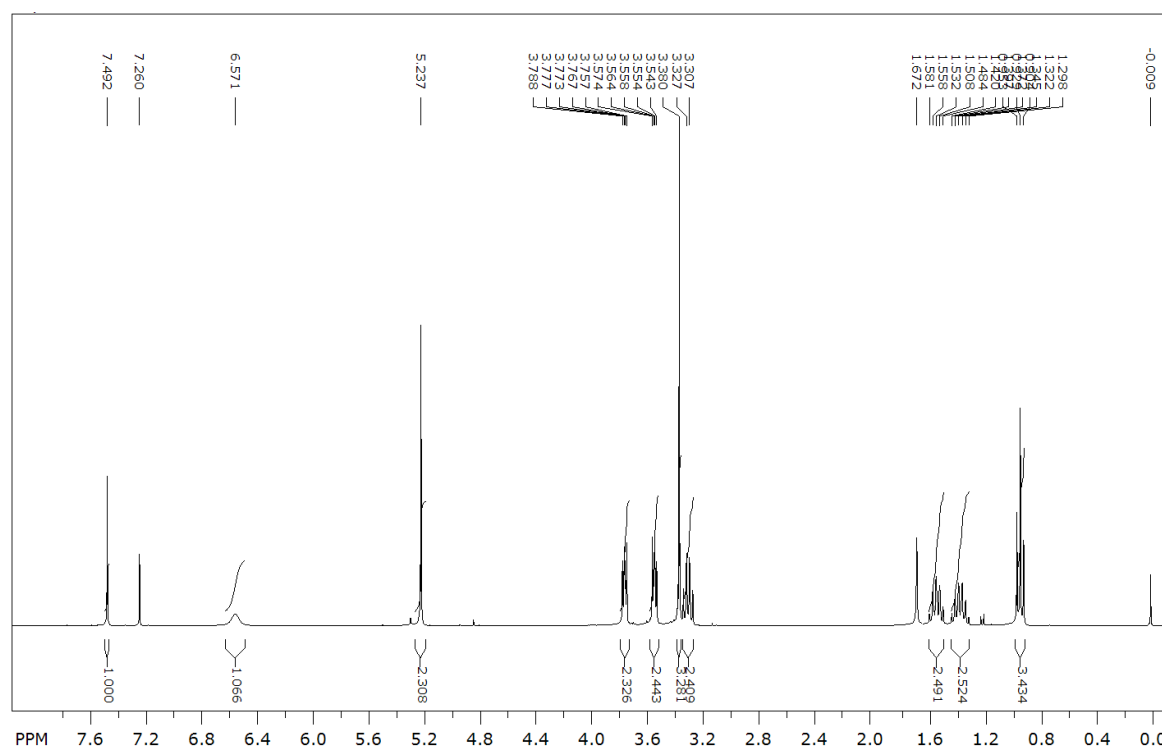


Slika D2.11. ^{13}C NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **8**

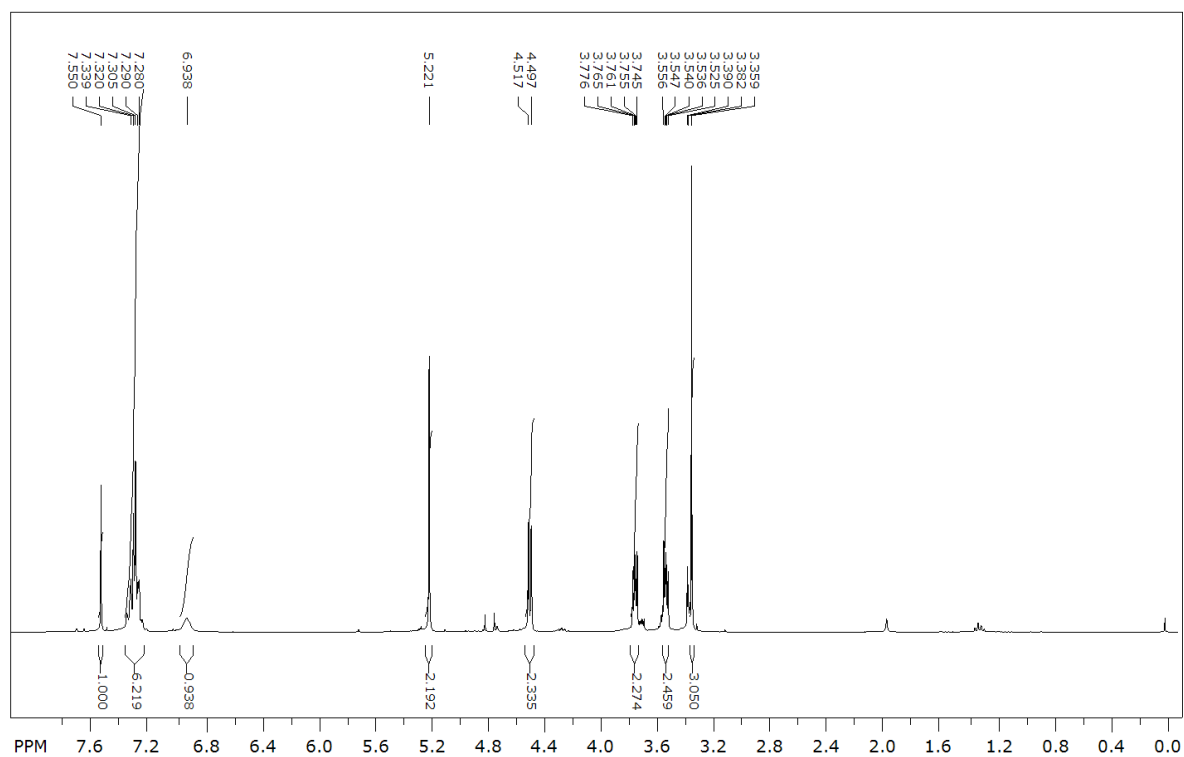
DODATAK 3: NMR spektri snimljeni u reakcijama enzimske katalize



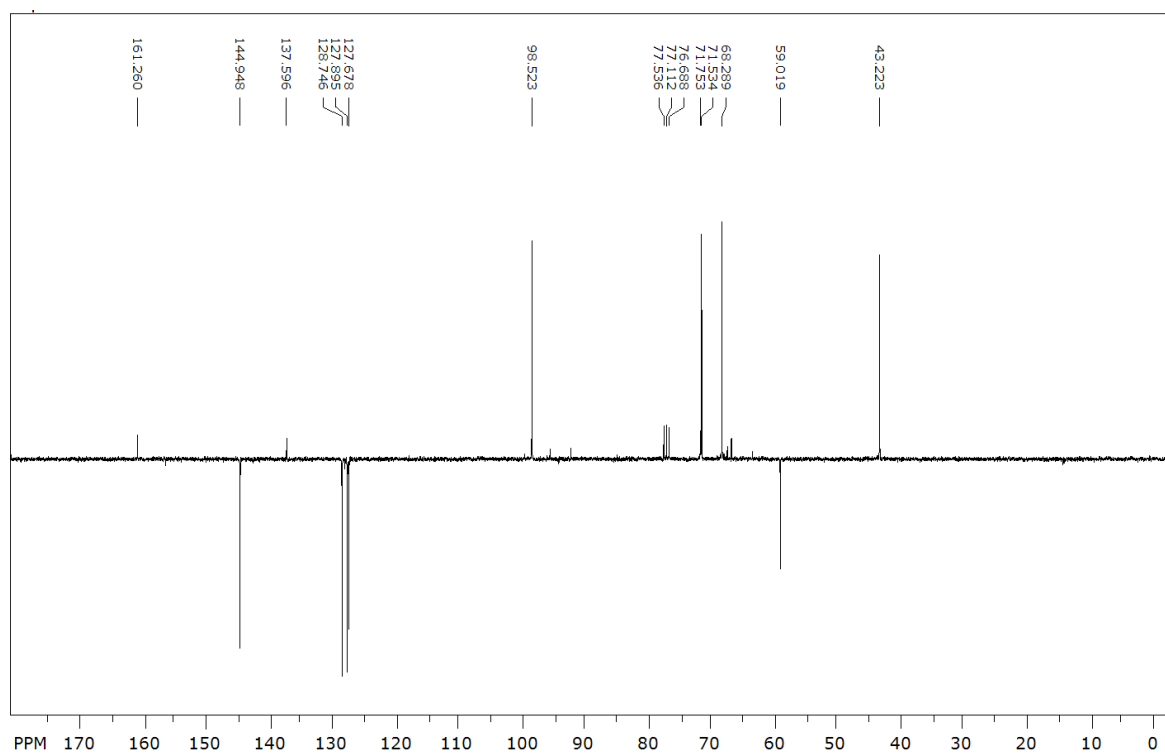
Slika D3.1. ^1H NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2-(hidroksiimino)acetamida **2**



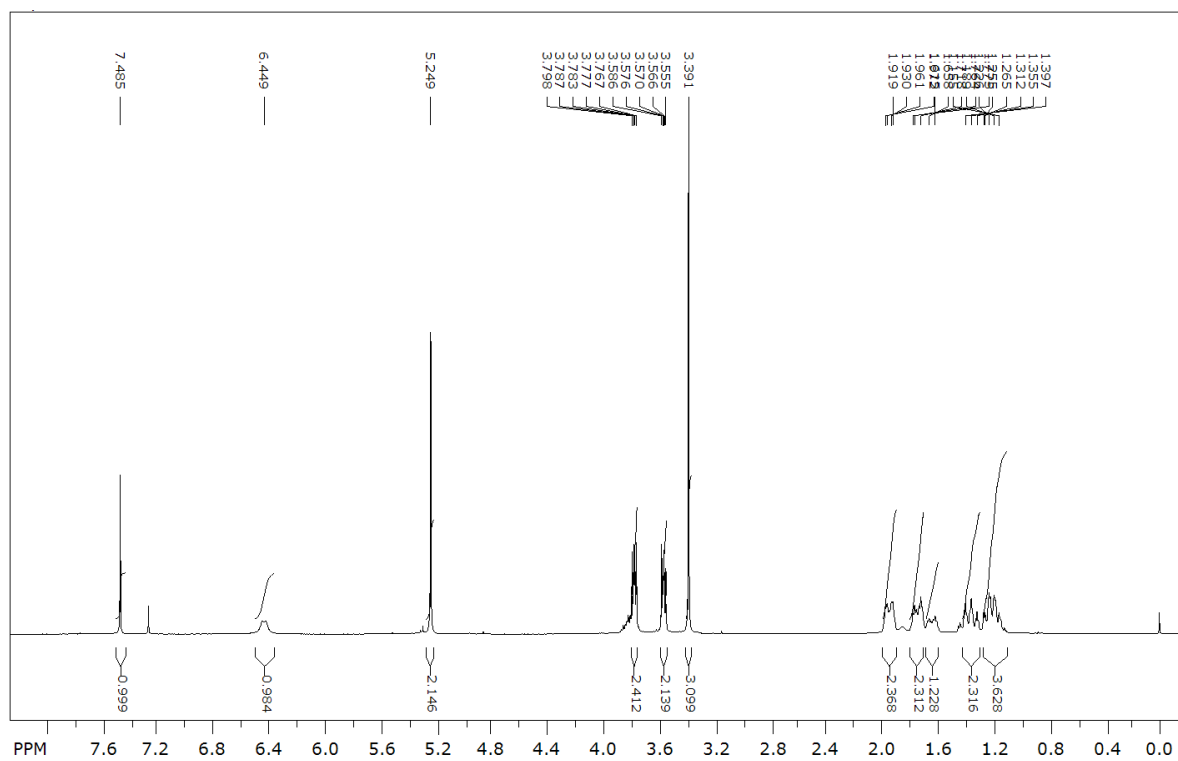
Slika D3.2. ^1H NMR spektar produkta amida *N*-butil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **5**



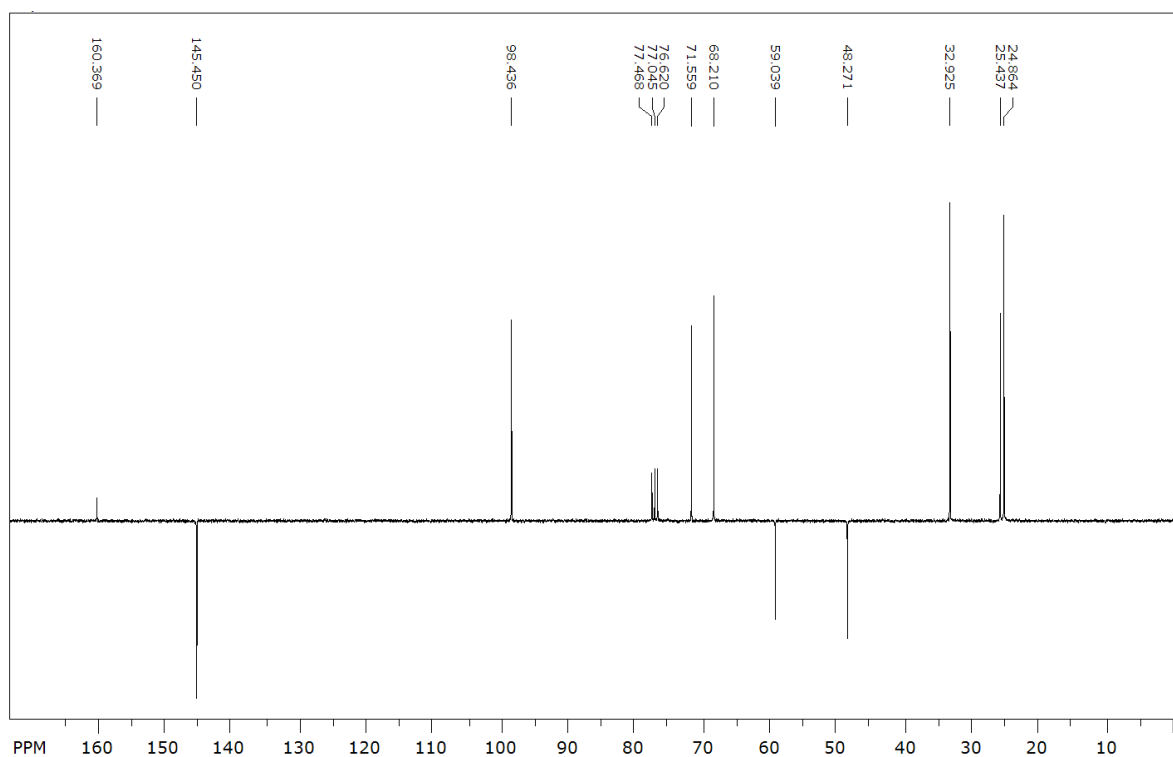
Slika D3.3. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **6**



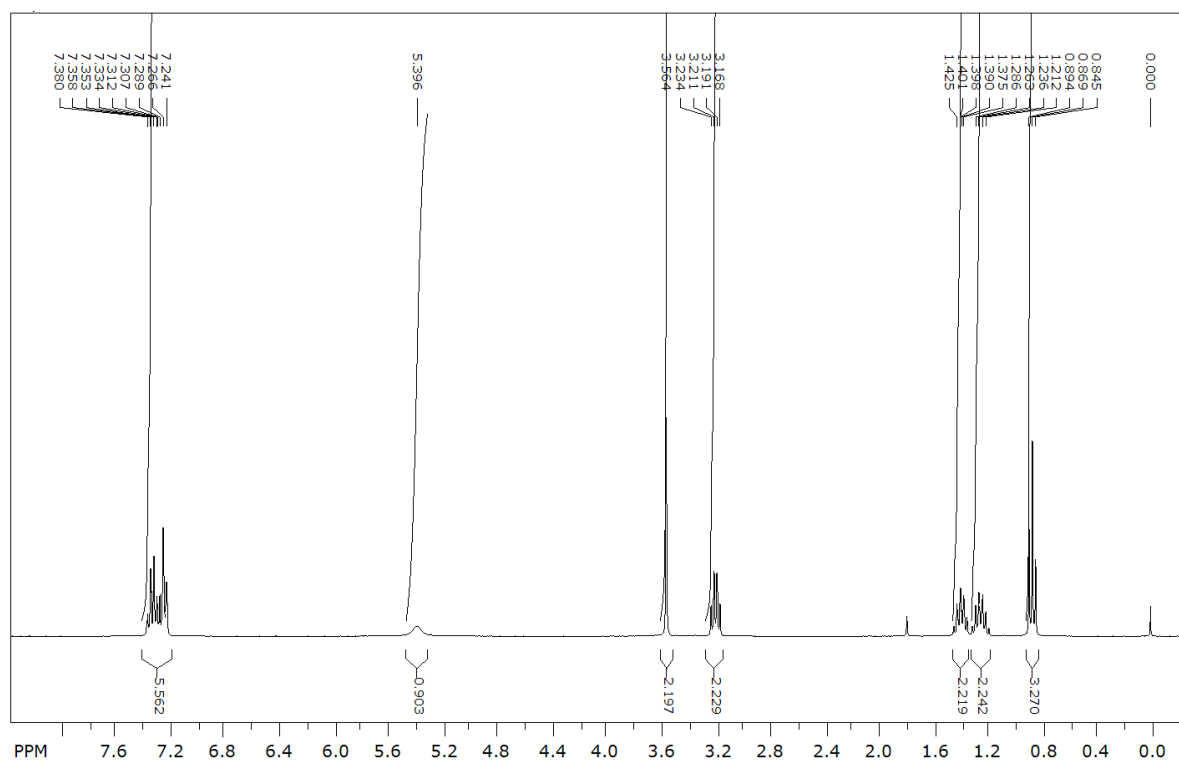
Slika D3.4. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **6**



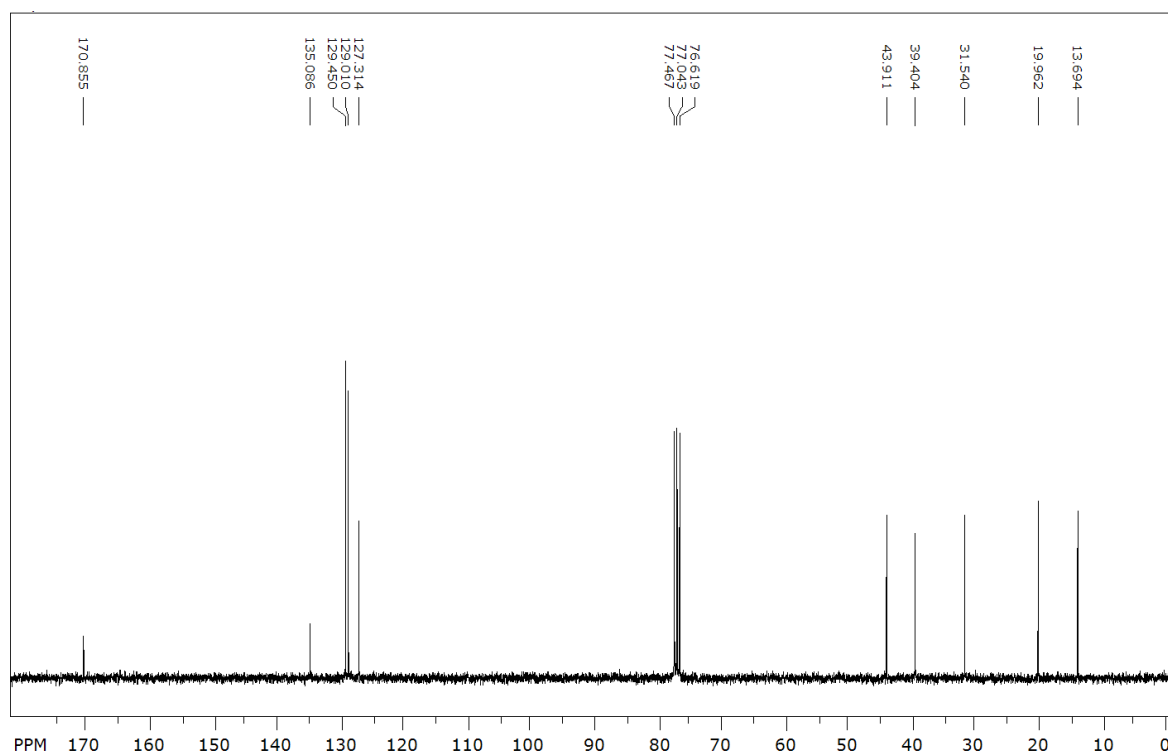
Slika D3.5. ^1H NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **8**



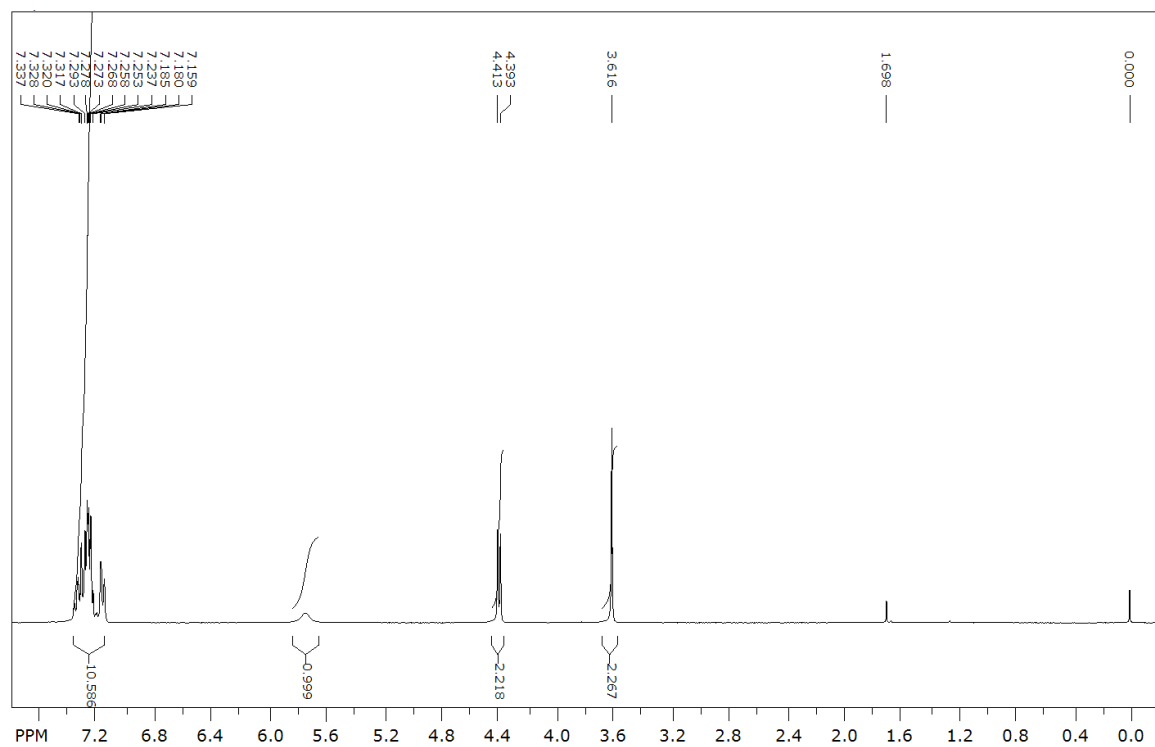
Slika D3.6. ^{13}C NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **8**



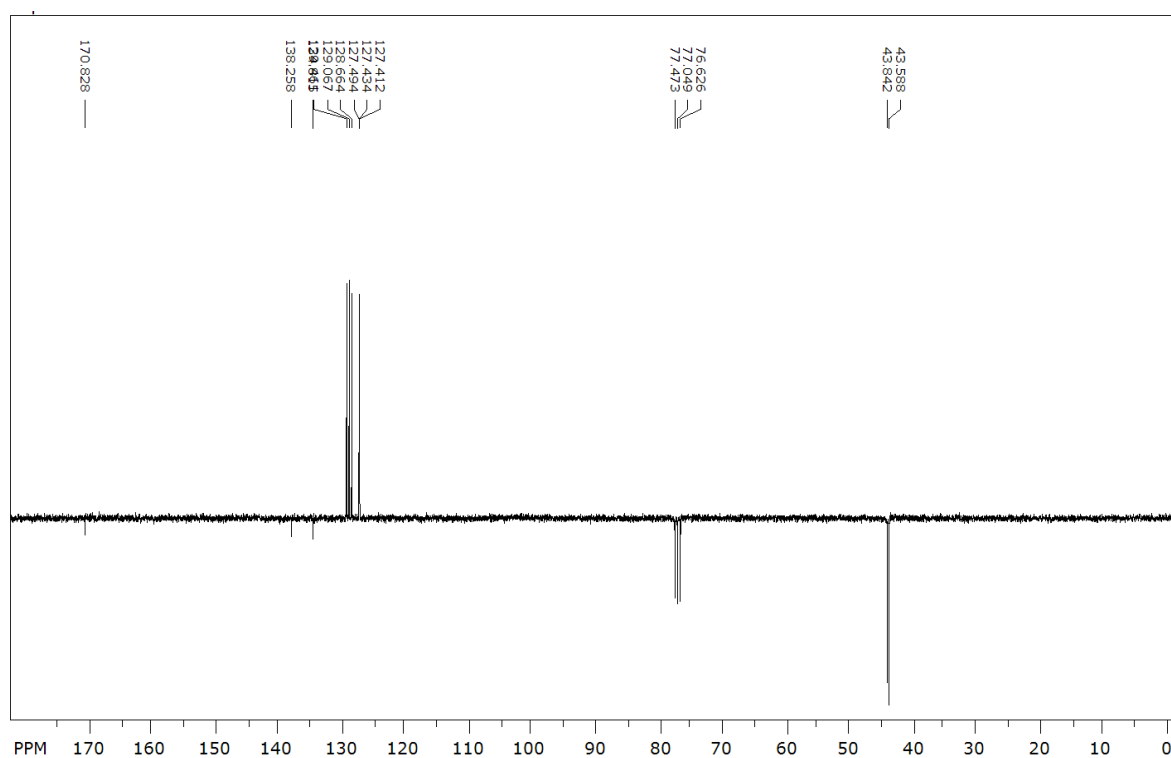
Slika D3.7. ^1H NMR spektar produkta amida *N*-butil-2-fenil acetamida **9**



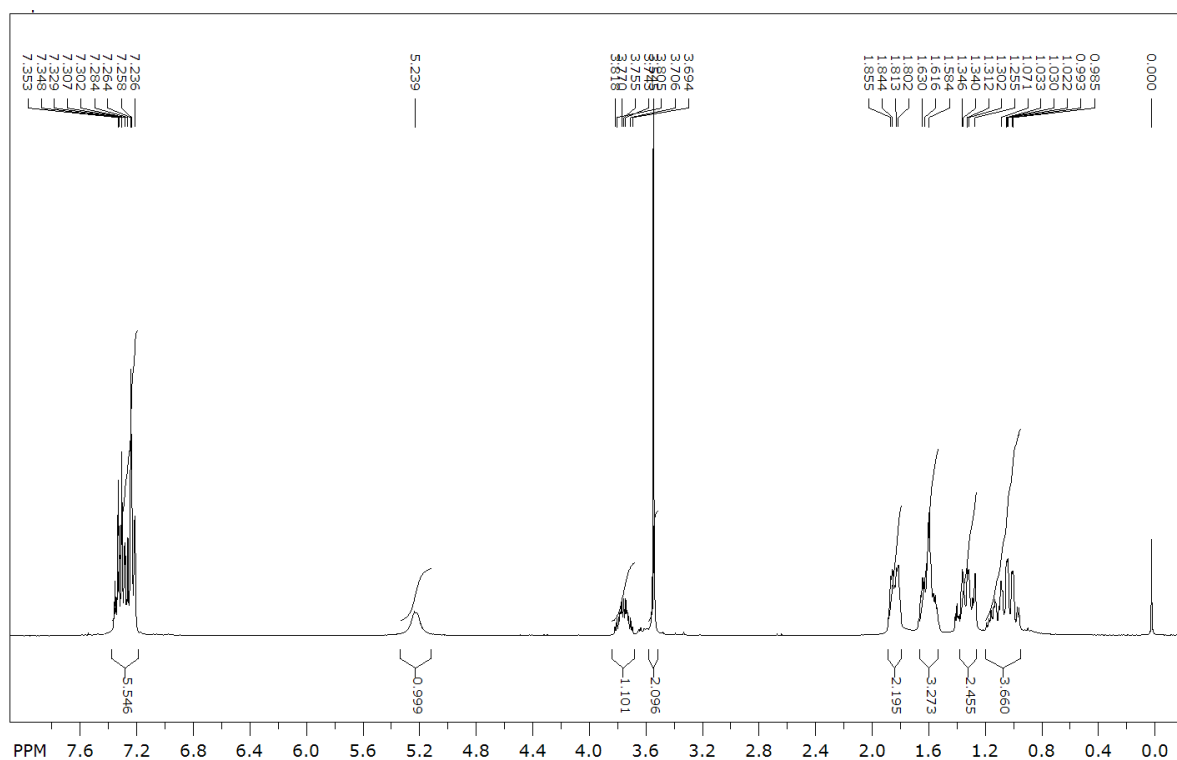
Slika D3.8. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-butil-2-fenil acetamida **9**



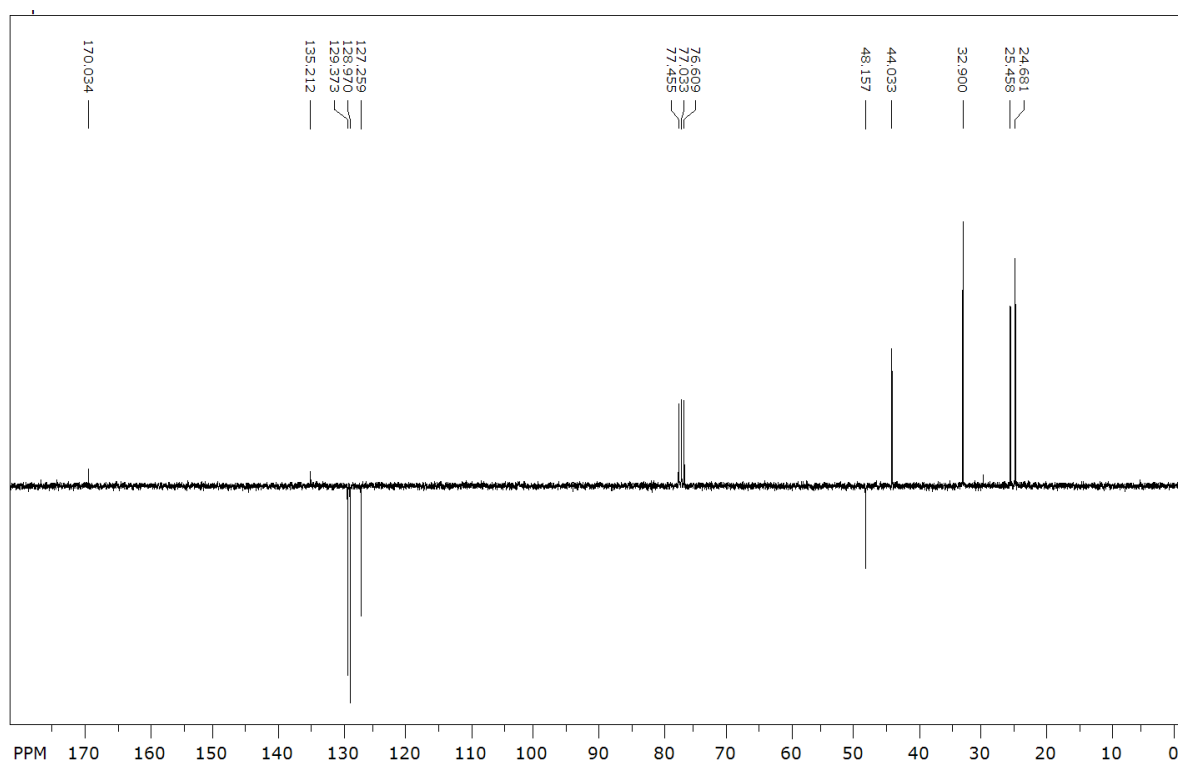
Slika D3.9. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2-fenil acetamida **10**



Slika D3.10. ^{13}C NMR spektar produkta amida *N*-benzil-2-fenil acetamida **10**

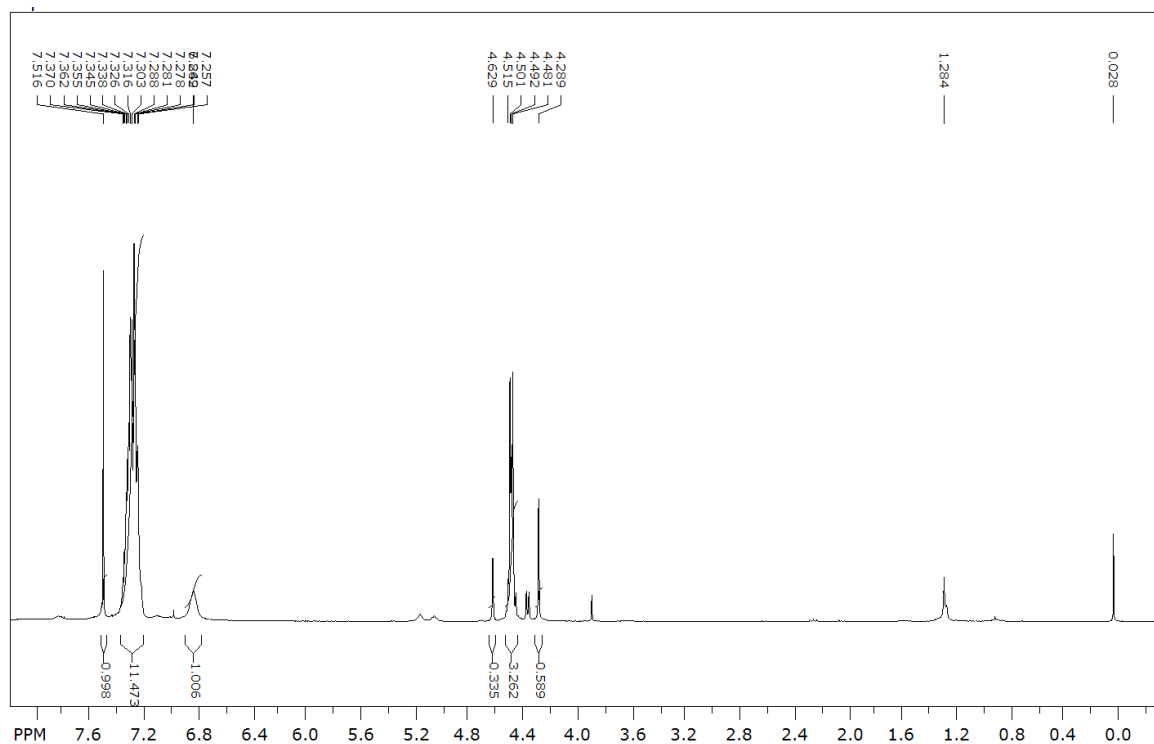


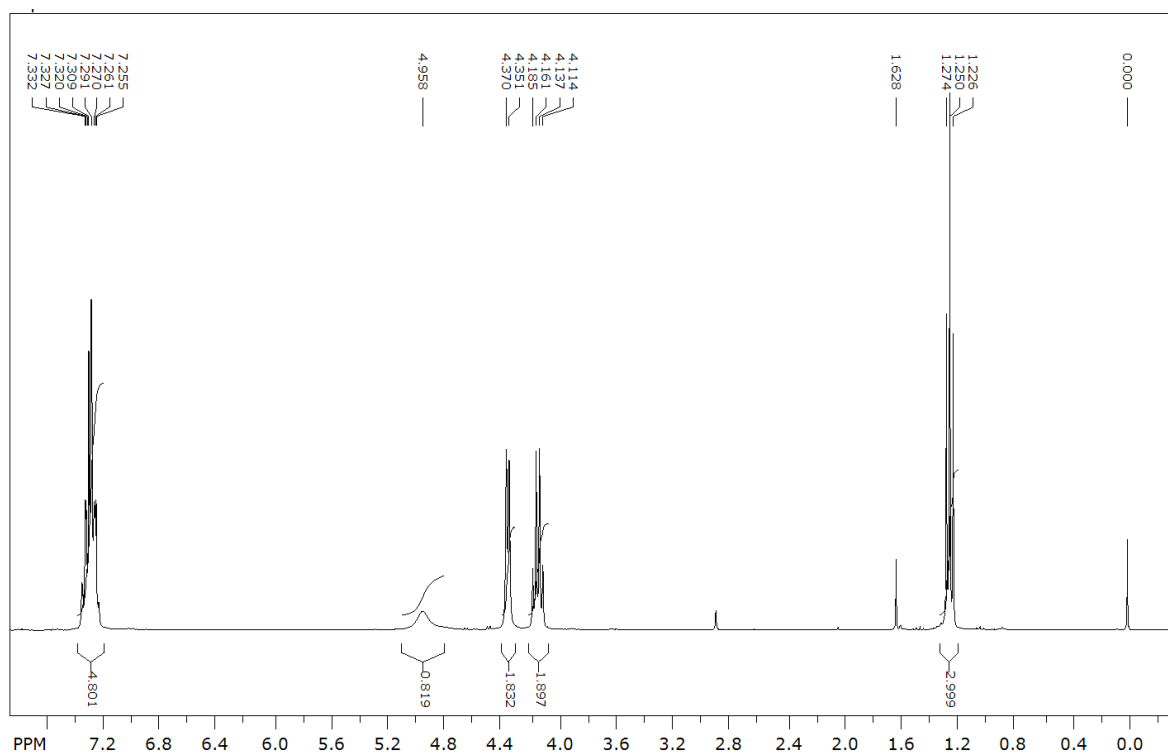
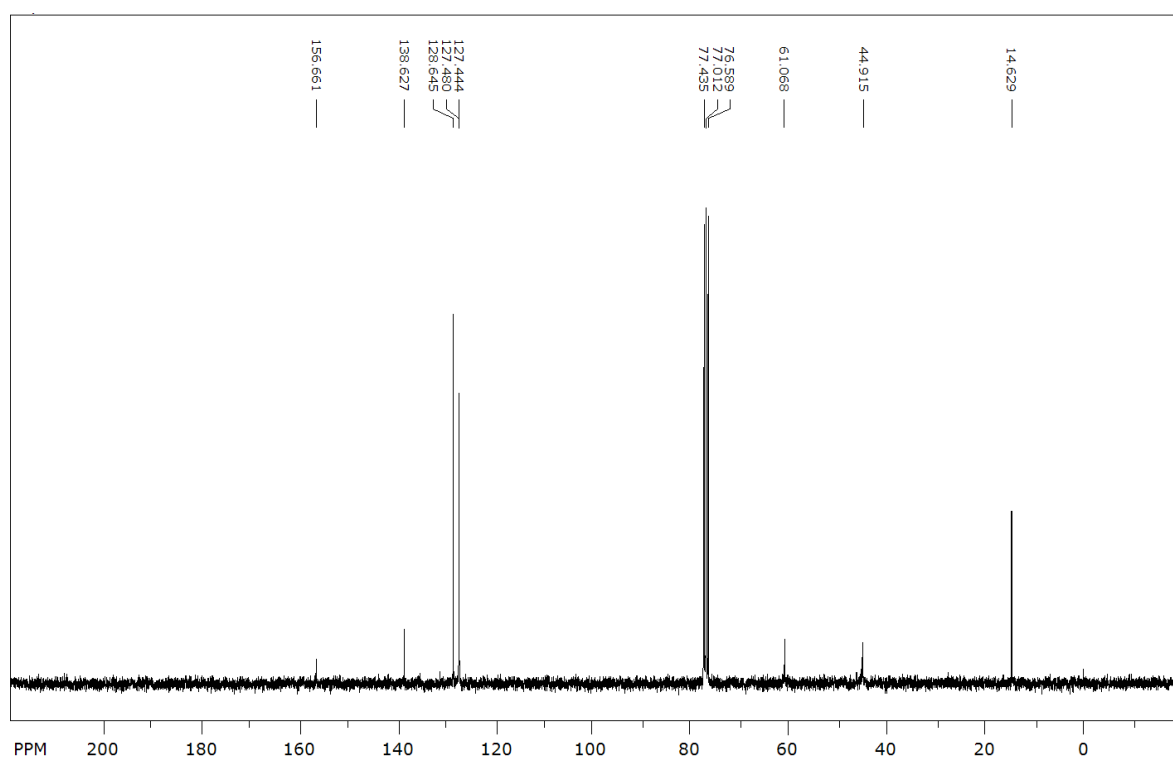
Slika D3.11. ^1H NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2-fenil acetamida **12**

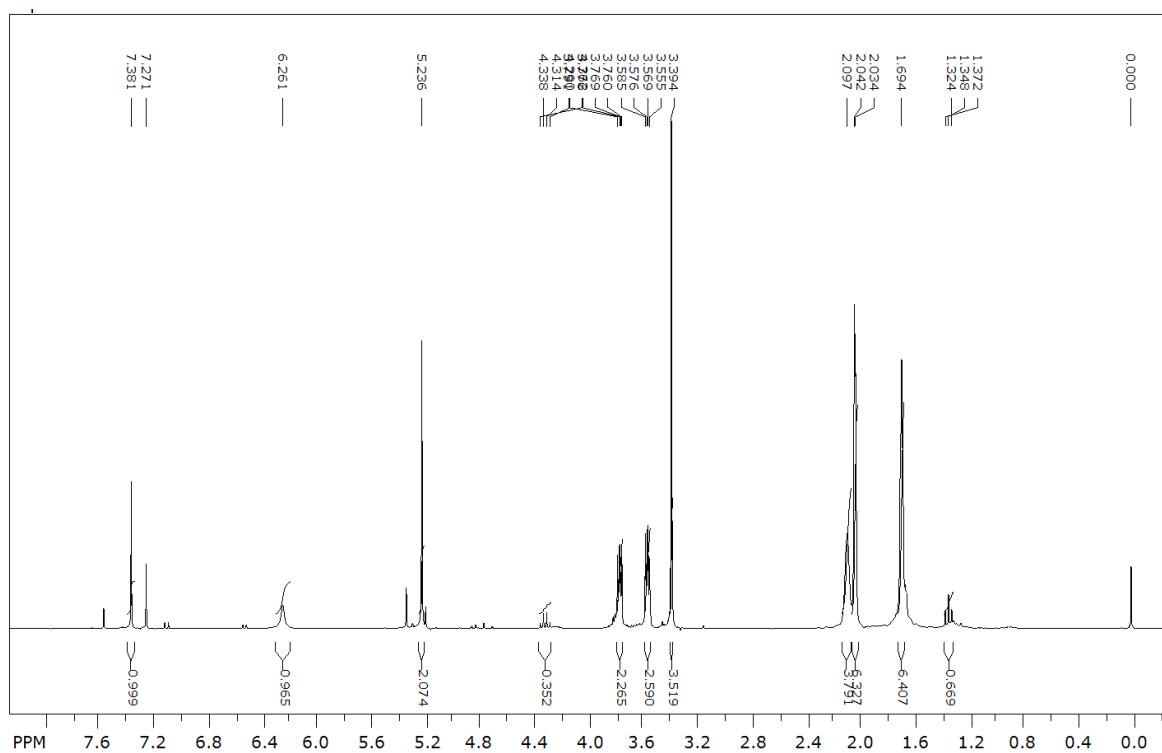


Slika D3.12. ^{13}C NMR spektar produkta amida *N*-cikloheksil-2-fenil acetamida **12**

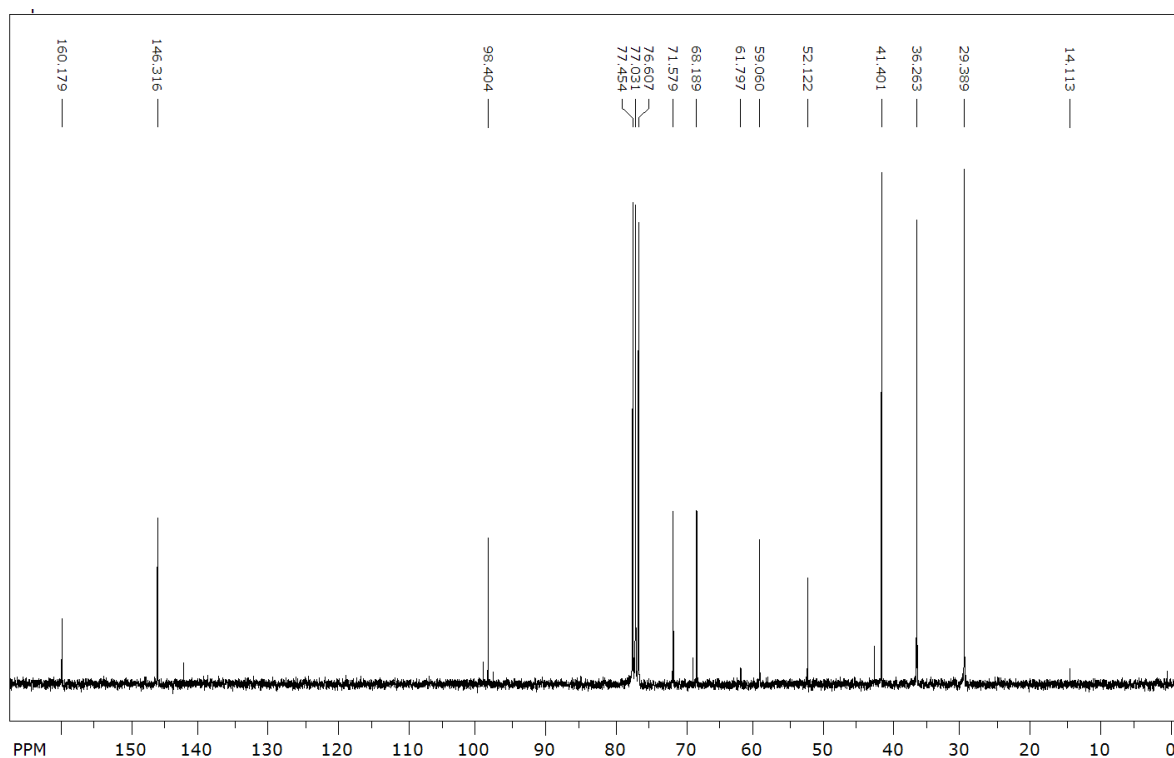
DODATAK 4: NMR spektri snimljeni u reakcijama CalB-BOP metode



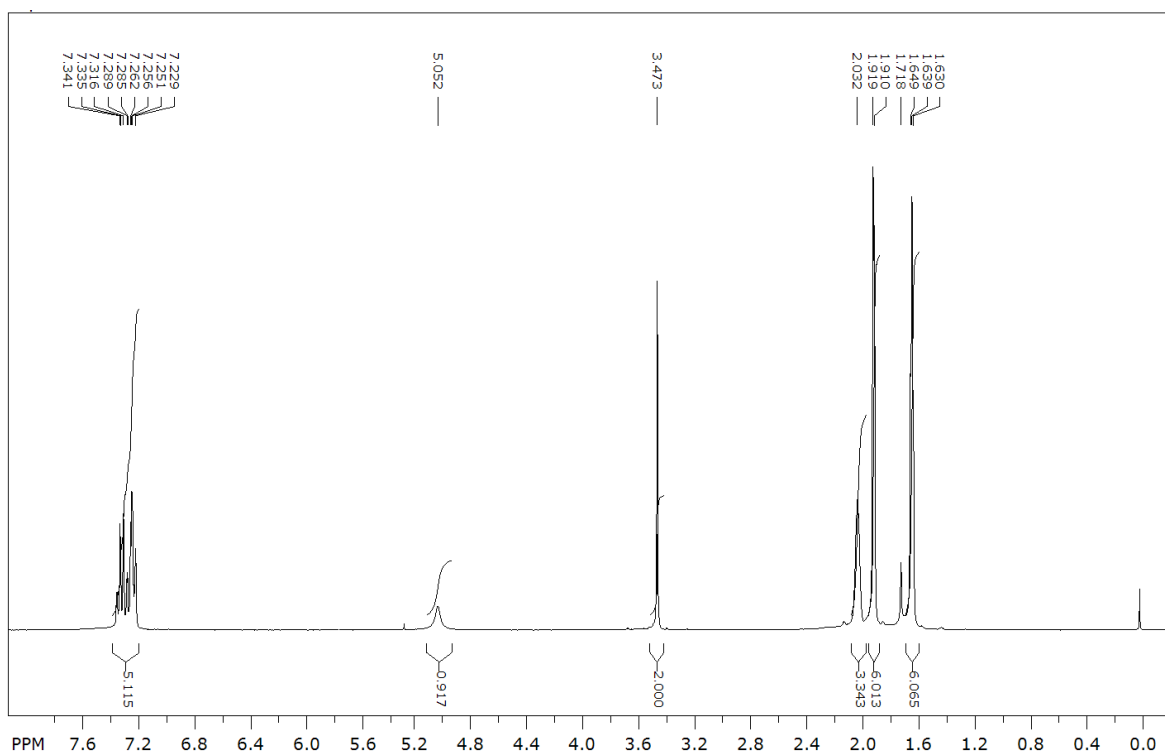
Slika D4.2. ¹H NMR spektar nusprodukta 2'Slika D4.2. ¹³C NMR spektar nusprodukta 2'



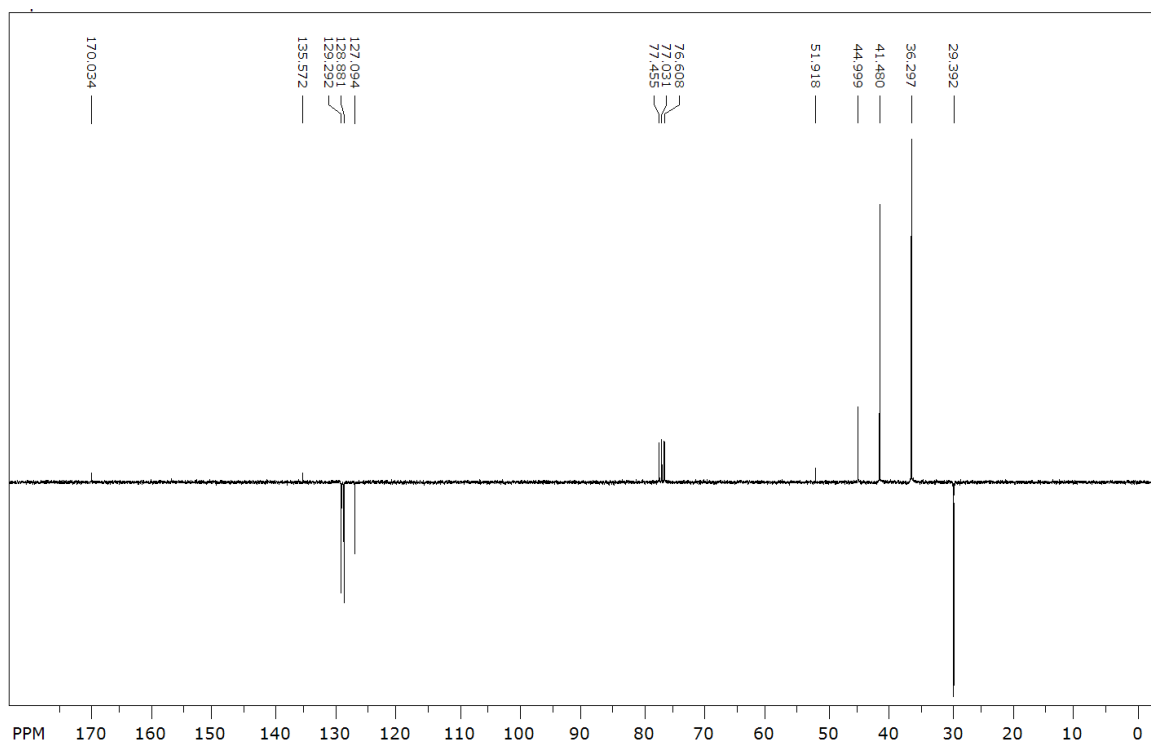
Slika D4.3. ¹H NMR spektar produkta amida *N*-1-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida 7



Slika D4.4. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-1-adamantil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida 7

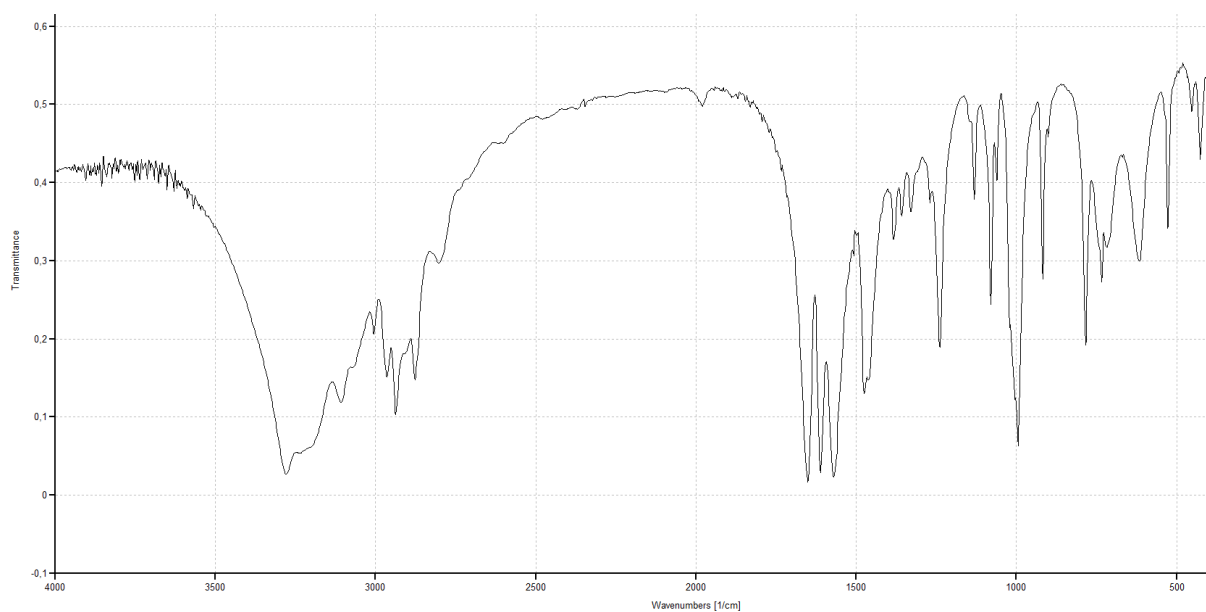


Slika D4.5 ¹H NMR spektar produkta amida *N*-adamantil-2-fenilacetamida **11**

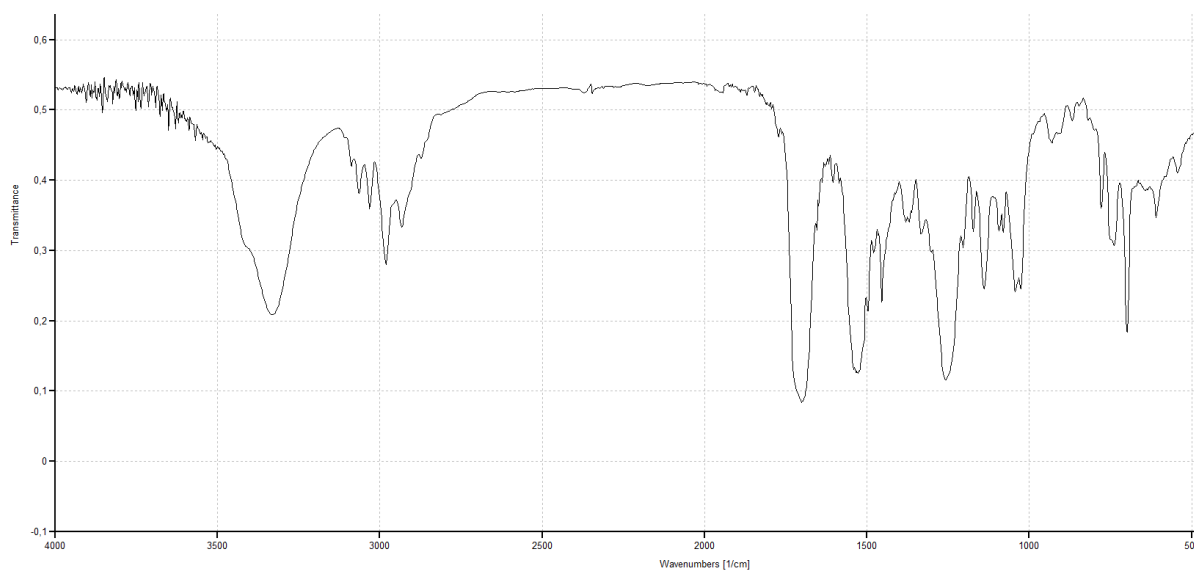


Slika D4.6. ¹³C NMR spektar produkta amida *N*-adamantil-2-fenilacetamida **11**

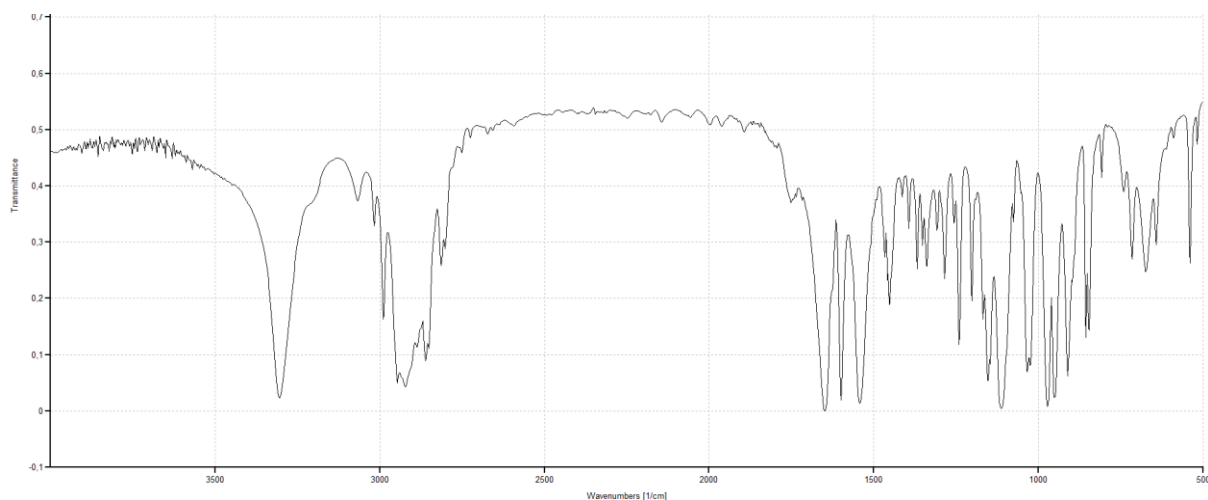
DODATAK 5: Snimljeni IR spektri



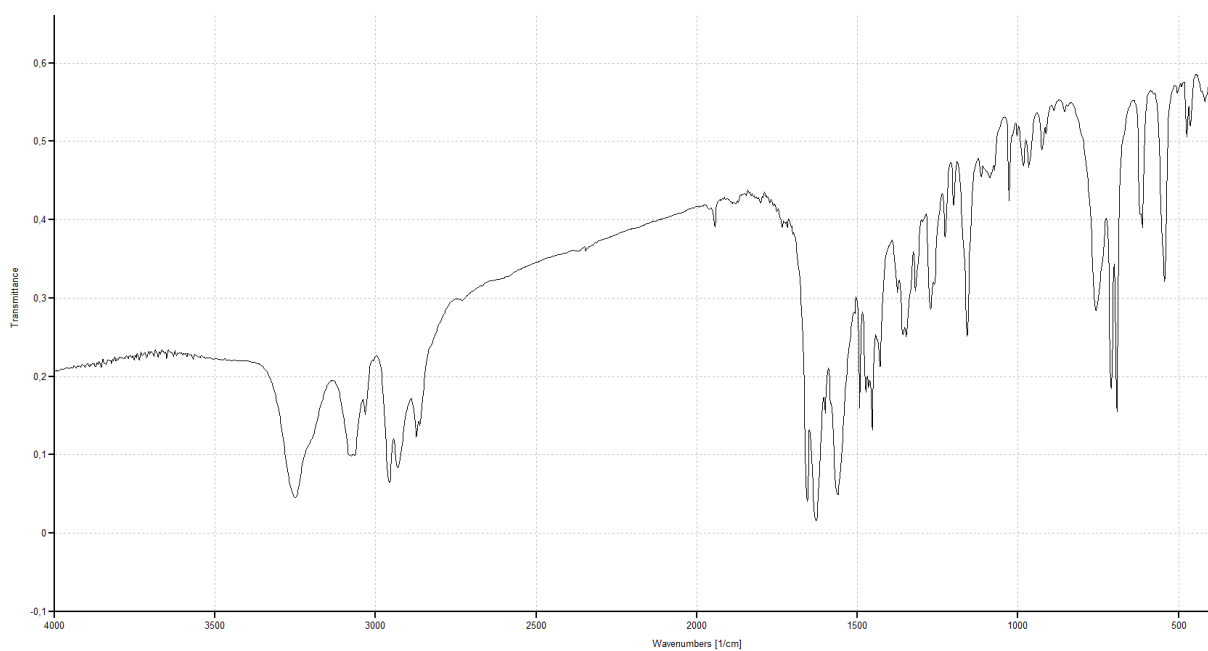
Slika D5.1. IR spektar produkta *N*-butil-2-(hidroksiimino)acetamida **1** pripravljenog bazno kataliziranom metodom



Slika D5.2. IR spektar nusprodukta **2'**



Slika D5.3. IR spektar produkta *N*-cikloheksil-2,5,7-trioksa-8-azadec-8-en-10-amida **8** pripravljanog CalB-BOP metodom



Slika D5.4. IR spektar produkta *N*-butil-2-fenilacetamida **9** pripravljenog CalB-BOP metodom

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Katarina Zlatić

Datum rođenja: 31. prosinca 1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2000.–2008. OŠ Markuševac, PŠ Vidovec, Zagreb

2008.–2012. III. gimnazija, Zagreb

2012.–2015. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu

2015.-2017. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu, istraživački smjer, grane: organska kemija i biokemija

Rad na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu uz suradnju s Institutom za medicinska istraživanja i medicinu rada u pripravi karbamata albuterola.