

# Identifikacija i strukturna karakterizacija 3-trifluormetoksifenil- i 3-(3-fenilpropil)-makrozona te njihovih dijastereomera pomoću sustava LC-SPE/krio-NMR

---

**Pranjić, Paula**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:217:214126>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Paula Pranjić

**Identifikacija i strukturna karakterizacija 3-  
trifluormetoksifenil- i 3-(3-fenilpropil)-  
makrozona te njihovih dijastereomera pomoću  
sustava LC-SPE/krio-NMR**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2022.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Ive Habinovec.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije“ (IP-2018-01-8098).



## Zahvale

*Prvenstveno zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici za rad na zanimljivoj temi. Hvala za svaki koristan savjet tijekom izrade rada i stečeno iskustvo koje ću uvijek pamtiti.*

*Jedno veliko i od srca hvala mojoj neposrednoj voditeljici mag. chem. Ivi Habinovec! Hvala na strpljenju i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada, te na ugodnoj radnoj atmosferi i brojnim savjetima. Osobi koja najbolje zna kako se nositi sa svim mogućim (i brojnim) errorima, zbog kojih je sve izgledalo tako nemoguće, ali nikada nije dopustila da odustanemo. I hvala ti na razgovorima u trenucima kada je bilo najteže.*

*Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene tijekom cijelog školovanja. Hvala na svakom ohrabrenju i motivaciji. Hvala svima koji su vjerovali u mene!*

*Jedno veliko hvala Maci i Miljenku koji su tijekom cijelog školovanja bili tako velika podrška. Hvala vam za svaki savjet, svaku dobronamjernu kritiku i za sve naše motivacijske razgovore. Hvala što vjerujete u mene!*

*Hvala i mom Tomislavu. Hvala ti na svim razgovorima i utjehama. Hvala ti za sve što činiš za mene i što si pun razumijevanja! Hvala ti na podršci kada je najpotrebnije. Hvala ti za sve!*

*Hvala mojoj obitelji. Hvala vam na razumijevanju i na svakoj podršci. Drage moje, Dora i Andreja, hvala vam što ste u mom životu. Hvala vam za svaki razgovor. Hvala mom Marku što je uvijek tu i hvala ti za sve što činiš za mene. Hvala i mom Denisu za sve, uvijek ćeš biti s nama. ♡*

*I na kraju, najveće hvala mojim roditeljima, bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Hvala vam na razumijevanju, na nesebičnoj podršci i vjeri u mene. Hvala na ljubavi koju mi pružate iz dana u dan i na svakoj utjehi u teškim trenucima. Hvala vam na svemu što ste mi pružili i omogućili tijekom cijelog školovanja. Hvala vam za svaki put kada ste moje „probleme“, ali i želje stavljali ispred svojih. Hvala vam što ste uvijek uz mene! ♡*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Makrolidni antibiotici.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Azitromicin.....</i>	<i>4</i>
<b>2.2. Tiosemikarbazoni.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Rezistencija bakterija na postojeće antibiotike.....</b>	<b>7</b>
2.3.1. <i>Mehanizmi bakterijske rezistencije na makrolidne antibiotike.....</i>	<i>8</i>
<b>2.4. Novi konjugati makrolidnih antibiotika – makrozoni.....</b>	<b>9</b>
2.4.1. <i>Sinteza makrozona.....</i>	<i>9</i>
<b>2.5. Farmaceutska analiza.....</b>	<b>10</b>
2.5.1. <i>Onečišćenja u lijekovima.....</i>	<i>11</i>
2.5.2. <i>Tehnike pročišćavanja i strukturne karakterizacije spojeva u farmaceutskoj analizi.....</i>	<i>12</i>
2.5.2.1. <i>Primjena spregnute tehnike LC-MS.....</i>	<i>13</i>
2.5.2.2. <i>Primjena spregnute tehnike LC-SPE-NMR.....</i>	<i>15</i>
2.5.2.3. <i>Analiza izomera i kiralnih spojeva.....</i>	<i>18</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Kemikalije i materijali.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Radni uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....</b>	<b>22</b>
3.2.1. <i>Priprava pokretne faze i uzoraka za analizu tehnikom HPLC.....</i>	<i>22</i>
<b>3.3. Radni uvjeti ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE).....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Snimanje spektara NMR.....</b>	<b>23</b>
3.4.1. <i>Spektri <sup>1</sup>H-NMR.....</i>	<i>24</i>
3.4.2. <i>Homonuklearni i heteronuklearni spektri 2D NMR.....</i>	<i>24</i>
<b>3.5. Snimanje spektara MS.....</b>	<b>25</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-8.....</b>	<b>26</b>
4.1.1. <i>Analiza spoja P2-8 spektroskopijom NMR.....</i>	<i>31</i>
<b>4.2. Strukturna karakterizacija izoliranih spojeva iz reakcijske smjese makrozona 3-8.....</b>	<b>34</b>
4.2.1. <i>Makrozon 3-8.....</i>	<i>34</i>
4.2.2. <i>Spoj 3-8-a.....</i>	<i>39</i>



4.2.3. Spoj 3-8-b.....	41
4.2.4. Spojevi 3-8-c i 3-8-d.....	43
4.2.5. Spojevi 3-8-e i 3-8-f.....	45
<b>4.3. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-9 .....</b>	<b>52</b>
4.3.1. Analiza spoja P2-9 spektroskopijom NMR .....	55
<b>4.4. Strukturna karakterizacija izoliranih spojeva iz reakcijske smjese makrozona 3-9.....</b>	<b>58</b>
4.4.1. Makrozon 3-9 .....	58
4.4.2. Spoj 3-9-a.....	63
4.4.3. Spoj 3-9-b.....	65
4.4.4. Spoj 3-9-c.....	68
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>72</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>73</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>75</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XL</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Identifikacija i strukturna karakterizacija 3-trifluormetoksifenil- i 3-(3-fenilpropil)-makrozona te njihovih dijastereomera pomoću sustava LC-SPE/krio-NMR

Paula Pranjić

Pojava sve veće otpornosti bakterija na postojeće antibiotike predstavlja ozbiljan zdravstveni problem pa se stoga u području farmaceutske i medicinske kemije ulažu veliki napor u razvoj novih antibiotika. Makrozoni predstavljaju nove konjugate azitromicina i derivata tiosemikarbazida koji pokazuju izvrsnu antibakterijsku aktivnost *in vitro* na susceptibilne i rezistentne bakterijske sojeve. Proces razvoja novih antibiotika sastoji se od mnogo koraka, pri čemu je izuzetno važna identifikacija farmaceutskih onečišćenja i nosintetiziranih spojeva – potencijalnih antibiotika. U tu svrhu vrlo često se koriste vezani analitički sustavi pomoću kojih se postiže učinkovitije i brže pročišćavanje te identifikacija spojeva u odnosu na klasične tehnike *off-line*. U ovom diplomskom radu provedena je izolacija i strukturna karakterizacija nosintetiziranih 3-trifluormetoksifenil- i 3-(3-fenilpropil)-makrozona te njihovih dijastereomera, kao i nekih onečišćenja iz reakcijskih smjesa pomoću sustava LC-SPE/krio-NMR. Za strukturnu karakterizaciju izoliranih komponenata korištene su jedno- i dvodimenzijske tehnike NMR te spektrometrija masa. Na temelju analize prikupljenih podataka predložene su strukture izoliranih spojeva.

(78 stranica, 58 slika, 12 tablica, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: azitromicin, LC-SPE/NMR, makrozoni, profil onečišćenja, tiosemikarbazoni, vezani sustavi

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Neposredni voditelj: mag. chem. Iva Habinovec

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
  2. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
  3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2022.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Identification and structural characterization of 3-trifluoromethoxyphenyl and 3-(3-phenylpropyl) macrozones and their diastereoisomers by LC-SPE/krio-NMR

Paula Pranjic

Increasing bacterial resistance to existing antibiotics is a serious health problem, and great efforts are being made to discover and develop new antibiotics to overcome this problem. Macrozones are novel conjugates of azithromycin and thiosemicarbazides that show very good *in vitro* activity against susceptible and resistant bacterial strains. Development of new antibiotics is a multistep process and one of the most important steps is the identification of pharmaceutical impurities and newly synthesized compounds – potential antibiotics. For this purpose, hyphenated systems are very oftenly used to achieve more efficient and faster purification and identification of compounds compared to *off-line* techniques. In this study, isolation and structural characterization of newly synthesized 3-trifluoromethoxyphenyl- and 3-(3-phenylpropyl)-macrozones and their diastereoisomers, as well as some impurities from reaction mixtures, have been performed using hyphenated system LC-SPE/cryo-NMR. One- and two-dimensional NMR techniques and mass spectrometry were used for structural characterization of isolated components. Based on the analysis of collected data, the structures of isolated compounds were proposed.

(78 pages, 58 figures, 12 tables, 79 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: azithromycin, hyphenated system, impurity profiling, LC-SPE/NMR, macrozone, thiosemicarbazone

Mentor: Dr. Predrag Novak, Professor  
Assistant mentor: Iva Habinovec, MChem

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Professor
  2. Dr. Mirta Rubčić, Professor
  3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: February 25<sup>th</sup>, 2022.



## § 1. UVOD

Makrolidni antibiotici predstavljaju veliku obitelj inhibitora sinteze proteina u bakterijskim stanicama. Sastoje se od makrocikličkog laktonskog prstena različitih veličina na kojeg su vezane jedna do tri molekule šećera. Najčešći su 14-, 15- i 16-eročlani makrolidi. Kao prirodni ili polusintetski ovi antibiotici djeluju tako što se selektivno vežu na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma, pri čemu ometaju sintezu proteina inhibiranjem aktivnosti peptidil-transferaznog centra. Najpoznatiji i najčešće korišteni makrolidni antibiotici su eritromicin, klaritromicin i azitromicin. Najčešće se koriste u liječenju akutnih i kroničnih infekcija dišnih puteva.

Prečesta i nepravilna upotreba makrolida dovela je do pojave rezistentnih bakterijskih vrsta na postojeće antibiotike. Mikroorganizmi su razvili nekoliko mehanizama otpornosti na makrolidne antibiotike. Primarni mehanizam otpornosti je mutacija nukleotida u veznom mjestu makrolida na ribosomu, ali su moguće i mutacije ribosomskih proteina kao i modifikacije samih makrolida. Također, jedan od razvijenih mehanizama otpornosti je i ekspresija *efflux*-pumpi u membrani bakterijske stanice. Danas otpornost bakterija na postojeće antibiotike predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, čije se rješenje nalazi u sintezi novih ili modifikaciji već postojećih antibiotika.

Tiosemikarbazoni su organosumporovi spojevi koji se također odlikuju vrlo dobrim farmakološkim svojstvima. Oni također posjeduju antibakterijsko i antiinfektivno djelovanje. Povezivanjem derivata azitromicina i tiosemikarbazona, nastaju novi bioaktivni konjugati koji se nazivaju makrozonima.

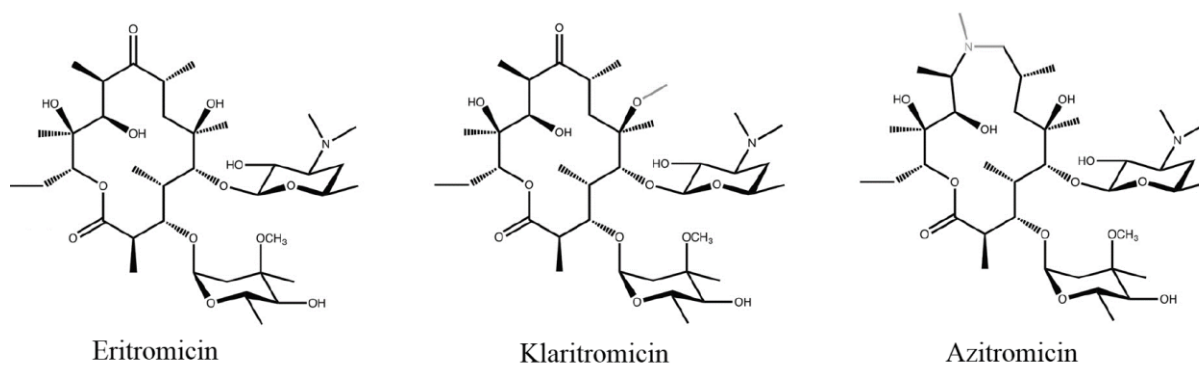
Proces razvoja novih antibiotika sastoji se od brojnih koraka, pri čemu je izuzetno važna izolacija i identifikacija farmaceutskih onečišćenja i novosintetiziranih spojeva, odnosno potencijalnih antibiotika. Istraživanjem profila onečišćenja (engl. *impurity profiling*) dobivaju se informacije o prisutnim onečišćenjima u farmaceutskom proizvodu, pri čemu je njihova količina u krajnjem produktu strogo propisana. Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu farmaceutskih tvari vrlo često se koriste vezani sustavi pomoću kojih se postiže učinkovitije i brže pročišćavanje spojeva u odnosu na klasične tehnike *off-line*. Zbog svoje osjetljivosti i niskih granica detekcije, najčešće korišteni vezani sustavi su LC-MS i LC-SPE-NMR.

Cilj ovog diplomskog rada je izolirati i strukturno okarakterizirati novosintetizirani 3-trifluormetoksifenil- (u daljnjem tekstu **3-8**) i 3-(3-fenilpropil)-makrozon (u daljnjem tekstu **3-9**) te njihove diastereomere, kao i neka onečišćenja iz reakcijskih smjesa pomoću vezanog sustava LC-SPE/krio-NMR. Za strukturnu karakterizaciju izoliranih komponenata koristit će se jedno- i dvodimenzijske tehnike NMR ( $^1\text{H}$ , COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, NOESY) te spektrometrija masa. Na temelju analize prikupljenih podataka predložit će se strukture izoliranih spojeva.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici predstavljaju veliku skupinu bioaktivnih spojeva sa širokom primjenom u medicini, veterini i agrikulturi. Sastoje se od makrocikličkog laktorskog prstena različitih veličina na kojeg su vezane jedna ili više molekula amino- i/ili neutralnih šećera putem glikozidne veze. Najzastupljeniji makrolidi su oni koji sadrže 12, 14, 15 ili 16 ugljikovih atoma u laktorskome prstenu, a najčešće vezani šećeri su kladinoza i desozamin (Slika 1.). Danas je poznato više od 2000 različitih makrolida<sup>1</sup> koje karakteriziraju slične kemijske strukture, antibakterijska aktivnost i mehanizmi djelovanja, ali značajno različita farmakokinetička svojstva, zbog čega vrlo mali dio makrolida zapravo pronalazi kliničku primjenu. Najpoznatiji makrolidi koji se nalaze u kliničkoj primjeni su eritromicin, klaritromicin i azitromicin (Slika 1.). Djeluju tako što se selektivno vežu na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma unutar izlaznog tunela polipeptida pri čemu ometaju sintezu proteina inhibiranjem aktivnosti peptidil-transferaznog centra koji je odgovoran za stvaranje peptidne veze između aminokiselina. Široki spektar djelovanja makrolidnih antibiotika omogućuje njihovo korištenje u liječenju raznih zaraznih bolesti, a najčešće se koriste za liječenje infekcija dišnog sustava uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*, te Gram-negativnim bakterijama *Neisseria gonorrhoea*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* i *Neisseria meningitis*, a također pokazuju djelovanje i na druge patogene kao što su *Chlamydia trachomatis* i *Mycoplasma pneumoniae*.<sup>2,3</sup>



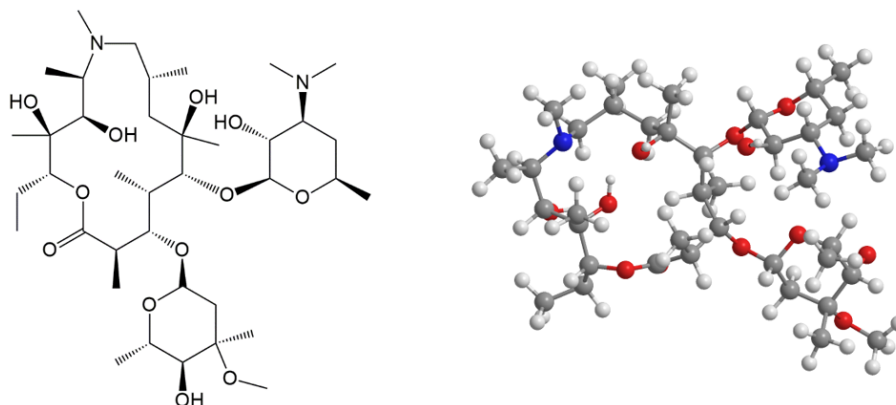
Slika 1. Najznačajniji predstavnici makrolidnih antibiotika.<sup>4</sup>



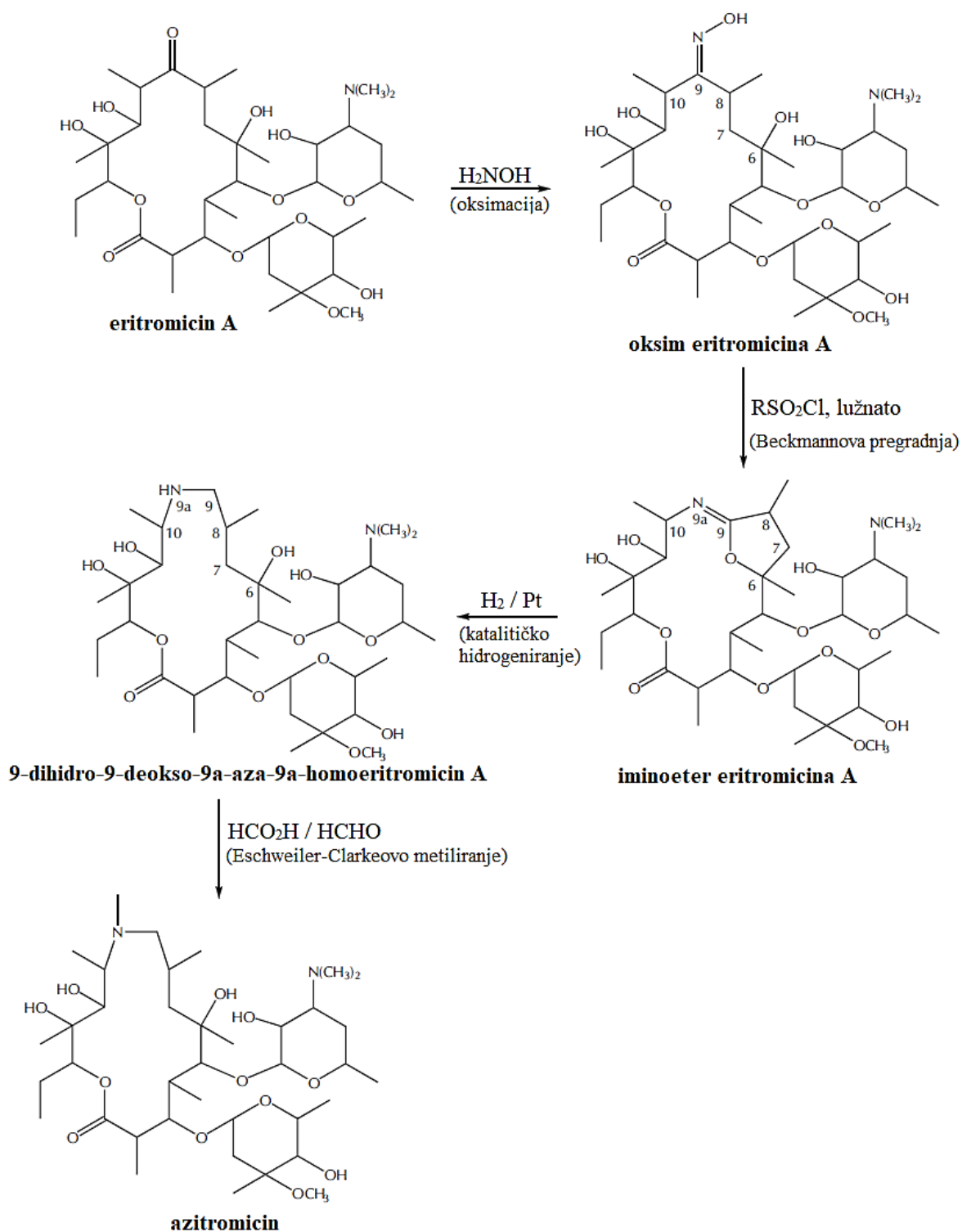
Makrolidni antibiotici dijele se na tri generacije. Prvu generaciju čine prirodni spojevi koje sintetiziraju poliketidne sintaze prisutne u raznim vrstama bakterija iz roda *Streptomyces*. Ovoj skupini pripada eritromicin A, prvi izolirani makrolid s kliničkom primjenom. Veliki nedostatak makrolida prve generacije je njihova nestabilnost u kiselom želučanom mediju. Eritromicin A se pri takvim uvjetima metabolizira u neaktivan anhidrohemiaketalni i spiroketalni oblik, a osim toga pokazuje brojne gastrointestinalne nuspojave. Radi poboljšanja farmakoloških svojstava, poput bolje stabilnosti u kiselom mediju, boljeg prodiranja u tkiva i smanjenja nuspojava, predstavljena je druga generacija makrolida, odnosno polusintetskih derivata eritromicina A, kao što su azitromicin i klaritomicin. Treću generaciju makrolidnih antibiotika predstavljaju ketolidi kao što su telitromicin i solitromicin, koji umjesto kladinoze sadrže karbonilnu skupinu vezanu za laktonski prsten, ali zbog velikog broja nuspojava nisu toliko prisutni u kliničkoj primjeni.<sup>5,6</sup>

### 2.1.1. Azitromicin

Uvođenjem dušikovog atoma u makrociklički laktonski prsten dobivena je nova potklasa makrolidnih antibiotika nazvana azalidima. Prvi i glavni predstavnik azalida, kao i 15-eročlanih makrolida, je azitromicin kojeg karakterizira metil-supstituirani dušikov atom na položaju 9a unutar laktonskog prstena (Slika 2.). Sintetiziran je 1980. godine od strane hrvatskog tima znanstvenika u tvornici lijekova PLIVA, a na tržištu je poznat pod nazivima *Sumamed*<sup>®</sup> (PLIVA) i *Zithromax*<sup>®</sup> (Pfizer). Azitromicin je dobiven Beckmannovom pregradnjom oksima eritromicina A, koji nastaje iz eritromicina pomoću hidroksilamin hidroklorida u prisutnosti slabe baze i pufera. Tretiranjem oksima eritromicina A s aromatskim sulfokloridom nastaje odgovarajući iminoeter, čijom reduktivnom metilacijom u konačnici nastaje azitromicin. Shematski prikaz sinteze azitromicina prikazan je na slici 3.<sup>6,7</sup>



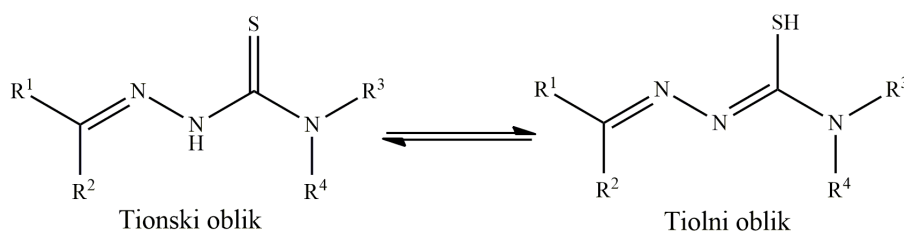
Slika 2. 2D i 3D strukture azitromicina.

Slika 3. Shematski prikaz sinteze azitromicina.<sup>7</sup>

Promjena u strukturi laktonskog prstena azitromicinu donosi brojne prednosti u odnosu na eritromicin – stabilnost u kiselom mediju, poboljšana farmakokinetička svojstva te širi spektar antibiotskog djelovanja koji uključuje Gram-negativne bakterije *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* na koje je eritromicin pokazivao slabu antibiotsku aktivnost. Osim toga, azitromicin pokazuje produljeno vrijeme poluživota i brže prodiranje u tkiva, što, naposljetku, rezultira većim koncentracijama i produljenom zadržavanju lijeka u tkivima. Visoka oralna bioraspoloživost omogućuje primjenu azitromicina u jednoj dozi ili jednoj dozi dnevno kroz 3 do 5 dana, ovisno o vrsti infekcije. Upravo zbog navedenih karakteristika, te mogućnosti primjene kod trudnica i djece, azitromicin je jedan od najprodavanijih lijekova u svijetu. Međutim, prečesta i nepravilna upotreba azitromicina i ostalih makrolida doveli su do pojave rezistentnih bakterijskih vrsta.<sup>5,8</sup>

## 2.2. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni su organosumporovi spojevi koji se dobivaju kondenzacijom tiosemikarbazida i karbonilnih spojeva (aldehida ili ketona). Tiosemikarbazoni, kao i njihovi derivati, te metalni kompleksi svoju primjenu pronalaze u analitičkoj kemiji, biologiji, medicini i farmakologiji. Opća formula tiosemikarbazona je  $R^1R^2C=N-NH-C(=S)-NR^3R^4$ , a zbog intramolekulskog prijenosa protona mogu postojati u dva tautomerna oblika – tionski i tiolni, čije su strukture prikazane na slici 4.<sup>9, 10, 11</sup>



Slika 4. Tautomerni oblici tiosemikarbazona.

Tiosemikarbazoni sadrže skup donorskih atoma u obliku amidnih, iminskih i tionskih skupina, te se zbog toga mogu ponašati kao polidentatni ligandi, odnosno imaju sposobnost keliranja metalnih iona. Stvaranjem kompleksa s metalnim ionom, tiosemikarbazonima se mogu promijeniti biološka svojstva. Koordinacija na metalni ion može utjecati na lipofilnost koja kontrolira brzinu ulaska tiosemikarbazona u stanicu. Također, kompleks s metalnim ionom može biti aktivniji od slobodnog tiosemikarbazona ili može čak pokazati neku bioaktivnost koju slobodan tiosemikarbazon ne pokazuje. Koordinacijski kapacitet tiosemikarbazona kao liganda

može se dodatno povećati dodatkom odgovarajućih funkcijskih skupina koje sadrže donorske atome.<sup>11-13</sup> Upravo ove karakteristike omogućuju tiosemikarbazonima i njihovim kompleksima s metalima široki spektar biološkog djelovanja, te zbog toga zauzimaju važno mjesto u medicinskoj kemiji. Oni, između ostaloga, pokazuju antitumorsko<sup>10,13,14</sup>, antibakterijsko<sup>13,15</sup>, antifungalno<sup>13,16</sup>, antivirusno<sup>13</sup> i antimalarijsko<sup>17,18</sup> djelovanje.

Svojstvo keliranja metalnih iona tiosemikarbazonima omogućuje i njihovu analitičku primjenu. Koriste se u anorganskim analizama za otkrivanje i određivanje različitih kationa i aniona prijelaznih metala. Za kvantitativno određivanje iona tiosemikarbazonima najčešće se koriste spektrofotometrijske metode zbog jednostavne primjene i malih troškova, ali primjenjuju se i gravimetrijske, fluorimetrijske te titrimetrijske metode.<sup>19</sup>

### 2.3. Rezistencija bakterija na postojeće antibiotike

Antimikrobna rezistencija (engl. *antimicrobial resistance*, AMR) predstavlja jedan od najvećih globalnih javnozdravstvenih problema moderne medicine koji uvelike prijeti učinkovitoj prevenciji i liječenju sve većeg niza raznih infekcija uzrokovanih bakterijama, parazitima, virusima i gljivicama pri čemu ti mikroorganizmi više nisu osjetljivi na lijekove koji se inače koriste u liječenju tih infekcija. Najveću pozornost privlači rezistencija bakterija na antibiotike pri čemu bakterijske infekcije postaju opasna prijetnja ljudskom životu. Broj rezistentnih, kao i multirezistentnih bakterijskih vrsta na postojeće antibiotike, sve je veći, a razlog tome je prekomjerna uporaba i zlouporaba antibiotika, nepotpuno doziranje lijeka od strane pacijenata, dodavanje velikih količina antibiotika u stočnu hranu i poljoprivredne usjeve, loša higijena unutar bolnica, te, s druge strane, nedostatak proizvodnje novih, učinkovitih antibiotika.<sup>20,21</sup>

Posljedice pojave rezistentnih bakterijskih sojeva su brojne. Infekcija uzrokovana rezistentnom bakterijom većinom zahtijeva dulje vrijeme liječenja, stoga pacijent duže ostaje u nezdravom stanju, pri čemu je rizik od smrtnog ishoda bolesti povećan. Duži vremenski period liječenja takve infekcije također povećava mogućnost njezina širenja na zdrave osobe, a samim time i širenje rezistentnih sojeva, zbog čega su bolnice i klinički centri "legla" rezistentnih bakterija. Uslijed produljenog liječenja također dolazi i do povećanja nepotrebnih troškova za dodatne lijekove, hospitalizaciju, kliničke pretrage i općenito zdravstvenu zaštitu. Druga važna posljedica pojave antibiotske rezistencije je razmjena i prijenos rezistencije između različitih bakterijskih sojeva, što dodatno otežava liječenje.<sup>21,22</sup>

### 2.3.1. Mehanizmi bakterijske rezistencije na makrolidne antibiotike

Danas postoji mnoštvo različitih rezistentnih bakterijskih sojeva među kojima postoje vrste koje su razvile rezistenciju na makrolidne antibiotike. Prvi slučaj rezistencije na makrolidne antibiotike primijećen je kod eritromicina vrlo brzo nakon njegovog uvođenja u kliničku primjenu.<sup>23</sup> Način na koji bakterije ostvaraju rezistenciju na određeni antibiotik nije ograničen na samo jedan mehanizam, već ih je uočeno nekoliko, a isto vrijedi i za makrolidne antibiotike. Dva najčešća mehanizma rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike su: (1) smanjeni afinitet vezanja makrolida na bakterijski ribosom uzrokovan modifikacijama ribosoma ili makrolida te (2) posljedica smanjenja koncentracije makrolida u bakterijskoj stanici ekspresijom *efflux*-pumpi koje su kodirane genima *mef* i *msr*, odnosno promjenama u permeabilnosti membrane.<sup>2</sup>

Modifikacije na ribosomu odgovorne za pojavu rezistencije su one koje se zbivaju u veznom mjestu makrolida, a to su posttranslacijska dorada te mutacije 23S rRNA i ribosomskih proteina L4 i L22. Makrolidi za svoje djelovanje koriste isti dio ribosoma kao i nekoliko drugih antibiotika, posebno linkozamida i streptogramina B. Stoga, jedna od modifikacija na ribosomu u bakterijama može istovremeno uzrokovati otpornost te bakterije na makrolide, linkozamide i streptogramine B. Ovaj se fenotip naziva  $MLS_B$  rezistencija (engl. *Macrolide-Lincosamide-Streptogramine B*). Najčešći mehanizam modifikacije veznog mjesta makrolida je metilacija adenina 2058 na 23S rRNA pomoću metil-transferaza Erm (engl. *erythromycin resistance methylase*), pri čemu je vezanje makrolida sterički onemogućeno.<sup>2,24</sup>

Poznate su dvije klase enzima u bakterijama odgovorne za modifikacije na makrolidima koje za posljedicu imaju gubitak antibiotskog djelovanja jer takvi makrolidi nisu više sposobni vezati se za 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma. Radi se o makrolidnim fosfotransferazama i esterazama. Fosfotransferaze kataliziraju reakciju fosforilacije makrolidnih antibiotika pri čemu dolazi do narušavanja ključnih interakcija prilikom vezanja takvog makrolida na ribosom. Esteraze hidroliziraju estersku vezu koja se nalazi unutar makrocikličkog laktonskog prstena, nakon čega makrolid prelazi iz cikličke u linearnu formu te više nema mogućnosti vezati se na ribosom u bakterijskoj stanici.<sup>4</sup>

## 2.4. Novi konjugati makrolidnih antibiotika – makrozoni

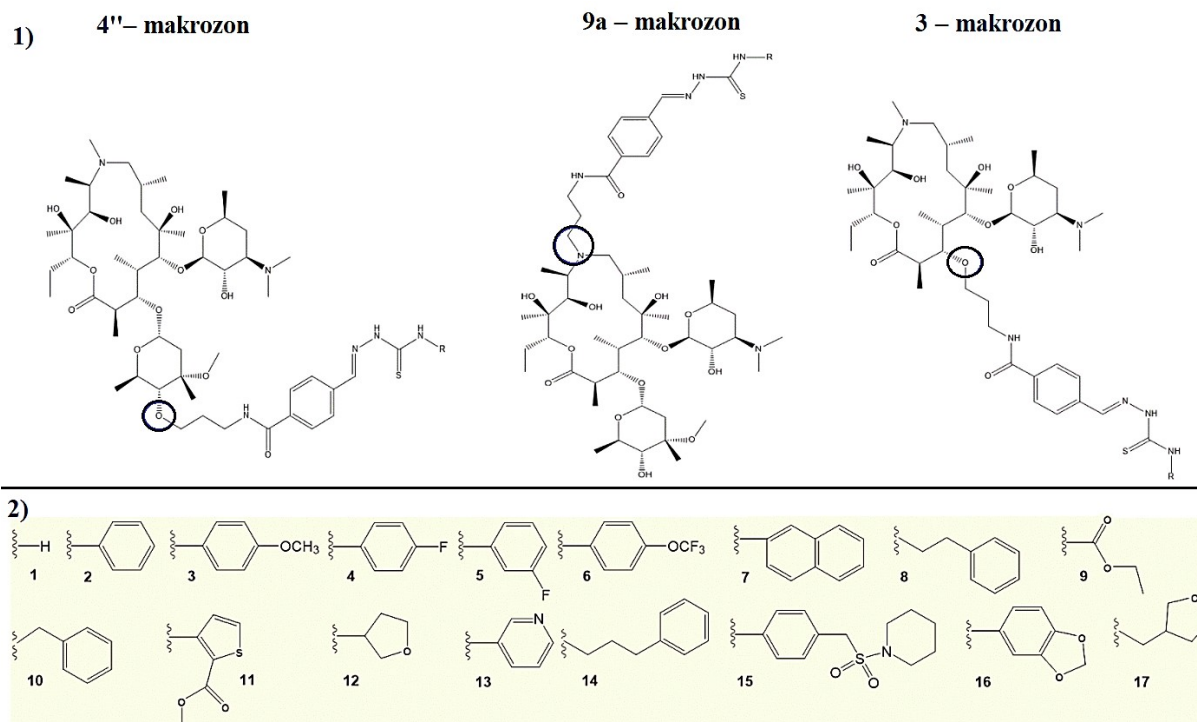
Iako su makrolidi izvrsni antibiotici, njihov široki spektar antibakterijskog djelovanja ugrožen je pojavom bakterijske rezistencije. Stoga je pred znanstvenicima zahtjevan zadatak u pogledu (polu)sinteze nove generacije makrolida, kao i antibiotika općenito, koji bi se mogli koristiti u liječenju infekcija uzrokovanih rezistentnim vrstama. Do sada su objavljena istraživanja koja su se bavila modifikacijama postojećih makrolida, odnosno sintezom makrolidnih konjugata, ponajprije azitromicina zbog njegovih prethodno opisanih povoljnih karakteristika. Konjugati makrolida rezultat su promijenjene strukture makrolida dodatkom jednog ili više farmakofora i, kao takvi, pokazuju različita biološka svojstva u odnosu na pojedine farmakofore. Tako su predstavljeni konjugati makrolida i nukleobaza ili nukleozida<sup>25,26</sup>, konjugati makrolida i raznih heteroaromatskih skupina<sup>27,28</sup>, te konjugati makrolida i urea, odnosno tiourea<sup>29,30</sup>. Opisani konjugati pokazuju veći afinitet vezanja na bakterijski ribosom kao i bolju aktivnost *in vitro* na određene sojeve bakterija u odnosu na postojeće makrolidne antibiotike.

Prilikom sinteze novih konjugata makrolidnih antibiotika važnu ulogu ima odabir odgovarajućih farmakofora, odnosno funkcijskih skupina. Ono što se želi postići su povoljne interakcije nove molekule s ribosomom, poboljšana farmakokinetika, sprječavanje neželjenih nuspojava i, naravno, dobivanje spojeva koji će biti aktivni protiv rezistentnih i osjetljivih bakterijskih sojeva. Zbog širokog antibakterijskog djelovanja tiosemikarbazona i svih povoljnih karakteristika azitromicina, upravo su oni odabrani za sintezu novih konjugata makrolidnih antibiotika, koje nazivamo makrozonima.<sup>31</sup> Tiosemikarbazona skupina predstavlja interaktivnu skupinu koja može ostvariti interakciju s okosnicom makrocikličkog laktonskog prstena azitromicina i na taj način poboljšati njegovu aktivnost. Također se očekuje sinergijski učinak povezivanja tiosemikarbazona i azitromicina na njihov ukupan biološki profil, ponajprije na aktivnost prema rezistentnim bakterijskim sojevima.

### 2.4.1. Sinteza makrozona

Sinteza makrozona uključuje povezivanje azitromicina s derivatima tiosemikarbazona na odabranim ključnim mjestima makrolida, a to su položaji 9a-, 4"- i 3- (Slika 5.). Ključni međuprodukt u sintezi makrozona je aminopropil derivat azitromicina koji se dobiva u dva koraka: prvi korak je Michaelova adicija akrilonitrila na posljednji međuprodukt u sintezi azitromicina, a drugi korak je katalitičko hidrogeniranje s PtO<sub>2</sub>. Sljedeći korak je sinteza tiosemikarbazida reakcijom odgovarajućih izotiocijanata i hidrazin hidrata, nakon čega slijedi

njihova reakcija sa 4-formilbenzojevom kiselinom i dobivanje odgovarajućih tiosemikarbazona. Posljednji korak je reakcija amidacije aminopropil derivata azitromicina s odgovarajućim derivatom tiosemikarbazona. Reakcija se odvija u prisutnosti reagensa HATU i DIPEA u diklormetanu pri sobnoj temperaturi.<sup>31,32</sup>



Slika 5. 1) Shematski prikaz strukture makrozona iz klase 4"-, 9a- i 3-. 2) Primjeri različitih supstituenata R za sintezu odgovarajućih tiosemikarbazona.<sup>32</sup>

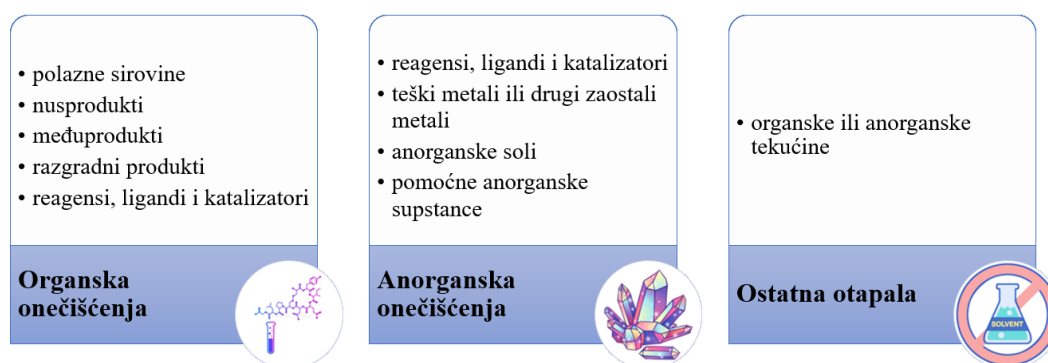
## 2.5. Farmaceutska analiza

Farmaceutska analiza jedan je od vrlo važnih koraka u procesu razvoja novih lijekova, a uključuje čitav niz postupaka koji se koriste za identifikaciju, određivanje, odjeljivanje, pročišćavanje i pojašnjenje strukture nosintetiziranih spojeva – potencijalnih antibiotika. U tu svrhu koriste se razne klasične metode kao što su gravimetrija, titrimetrija i volumetrija, te instrumentne metode – optičke, kromatografske, elektrokemijske, radiokemijske i termokemijske.<sup>33</sup> Analiza nije usmjerena samo na djelatnu tvar, odnosno aktivni farmaceutski pripravak (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API), već i na ostale moguće sastavnice lijeka kao što su farmaceutske pomoćne tvari, onečišćenja i razgradni produkti lijekova. Primarni cilj farmaceutske analize je osigurati kvalitetu lijeka, stoga se analitičke metode primjenjuju već u prvim koracima sinteze potencijalnog antibiotika kako bi se identificirale i strukturno okarakterizirale komponente reakcijske smjese.

### 2.5.1. Onečišćenja u lijekovima

Do danas je razvijen velik broj različitih nacionalnih farmakopeja i agencija koje su imale različite definicije, standarde i pravilnike o prisutnosti onečišćenja u lijekovima sve do 1990. godine kada je utemeljena Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH), koja okuplja regulatorna tijela za lijekove i farmaceutske industrije s područja Europe, Japana i Sjedinjenih Američkih Država.<sup>34</sup> Misija djelovanja organizacije ICH je usklađivanje standarda i pravne regulative na navedenim područjima kako bi se osigurao razvoj sigurnih, učinkovitih i visokokvalitetnih lijekova te njihova registracija i održavanje u skladu s visokim standardima.

Prema smjernicama ICH<sup>35,36</sup> onečišćenje se definira kao svaka komponenta novog lijeka koja sama po sebi nije ljekovita tvar ili pomoćna tvar u farmaceutskom proizvodu, odnosno svaka komponenta ljekovite tvari koja nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar, dok je profil onečišćenja definiran kao opis identificiranih i neidentificiranih onečišćenja prisutnih u lijeku, odnosno u novoj ljekovitoj tvari. Onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala (Slika 6.). Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnje ili skladištenja ljekovite tvari ili gotovog lijeka. Ona mogu biti (ne)identificirana i (ne)hlapljiva, a uključuju polazne sirovine, nusprodukte, međuproducte, razgradne produkte, te, rjeđe, organske reagense, ligande i katalizatore. Anorganska onečišćenja uglavnom nastaju tijekom procesa proizvodnje i u većini slučajeva su poznata te identificirana. To mogu biti anorganski reagensi, ligandi i katalizatori, zatim teški metali ili drugi zaostali metali, anorganske soli i ostale pomoćne anorganske supstance. Ostatna otapala su anorganske ili organske tekućine koje se koriste tijekom sinteze lijeka.



Slika 6. Skupine onečišćenja farmaceutskih proizvoda i ljekovitih tvari.



Sigurnost korištenja lijekova usko je povezana s njihovom kvalitetom i danas se provodi stroga kontrola kvalitete od strane proizvođača i regulatornih tijela. Ukoliko su prisutna u lijeku, onečišćenja i neidentificirane tvari mogu biti potencijalno toksične i samim time opasne za zdravlje. Stoga, ključan korak u istraživanju i proizvodnji lijekova je istraživanje profila onečišćenja lijeka (engl. *impurity profiling*) koji obuhvaća analitičke postupke s ciljem detekcije, identifikacije, strukturne karakterizacije i kvantitativnog određivanja organskih i anorganskih onečišćenja, te ostalih otapala u farmaceutskom proizvodu ili ljekovitoj tvari.<sup>37</sup> U svrhu istraživanja profila onečišćenja najčešće se koriste analitičke tehnike poput kromatografije, spektroskopije i spregnute tehnike koje će biti opisane u nastavku.

### 2.5.2. Tehnike pročišćavanja i strukturne karakterizacije spojeva u farmaceutskoj analizi

Istraživanje profila onečišćenja obično započinje identifikacijom onečišćenja, nakon čega slijedi njihova izolacija i karakterizacija. Za odjeljivanje pojedinih sastojaka ljekovite tvari i prisutnih onečišćenja koriste se separacijske tehnike kao što su razne vrste kromatografija i kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE). Od kromatografskih tehnika najčešće se primjenjuju tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) i plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC). Osim za odjeljivanje pojedinih onečišćenja, navedene tehnike mogu se koristiti i za njihovu izolaciju, a u tu svrhu često se primjenjuju i klasične metode poput ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) i ekstrakcija tekuće-tekuće. Nakon odjeljivanja te izolacije onečišćenja slijedi njihova strukturna karakterizacija za što se najčešće koriste spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, NMR) i spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS). Iako su navedene tehnike i metode vrlo učinkovite, moderna farmaceutska analiza više je usmjerena prema korištenju spregnutih tehnika (engl. *hyphenated techniques*) u kojima se spektroskopske tehnike kombiniraju sa separacijskim tehnikama radi postizanja učinkovitijeg i bržeg pročišćavanja te identifikacije spojeva u odnosu na klasične tehnike *off-line*. Tako se koriste spregnute tehnike LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, LC-NMR i spregnuti sustavi LC-SPE-NMR, LC-NMR-MS te LC-SPE-NMR-MS. Odabir spregnute tehnike ovisi o prirodi onečišćenja i o vrsti informacija koje se žele dobiti iz analize.

### 2.5.2.1. Primjena spregnute tehnike LC-MS

Spregnuta tehnika LC-MS analitička je tehnika koja povezuje učinkovitost odjeljivanja tekućinskom kromatografijom s vrlo osjetljivim i specifičnim analizatorima masa. Razvoj i unaprjeđenje navedene tehnike vrlo je složen proces, ponajviše zbog pronalaženja zadovoljavajućeg međuspoja (engl. *interface*) koji povezuje ove dvije tehnike, a čija je uloga otparavanje tekućine, ionizacija neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. Nakon odjeljivanja na kromatografskoj koloni pojedine komponente se putem međuspoja usmjeruju u ionizator spektrometra masa gdje dolazi do njihove ionizacije. Nastali molekulski ioni sklone su fragmentaciji i kao takvi se u analizatoru masa razdvajaju na temelju njihova omjera mase i naboja ( $m/z$ ) te detektiraju. Od ionizacijskih tehnika uglavnom se koriste blaže tehnike ionizacije koje su manje energije pa se stvara manje fragmentnih iona. U blage ionizacijske tehnike pripadaju ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Razvoj tehnologije doveo je do unaprjeđivanja tehnike LC-MS uvođenjem tandemne spektrometrije masa (MS/MS). Spregnuti sustav LC-MS/MS pruža mogućnost bolje separacije i dodatne fragmentacije iona u vremenu ili prostoru.<sup>38,39</sup>

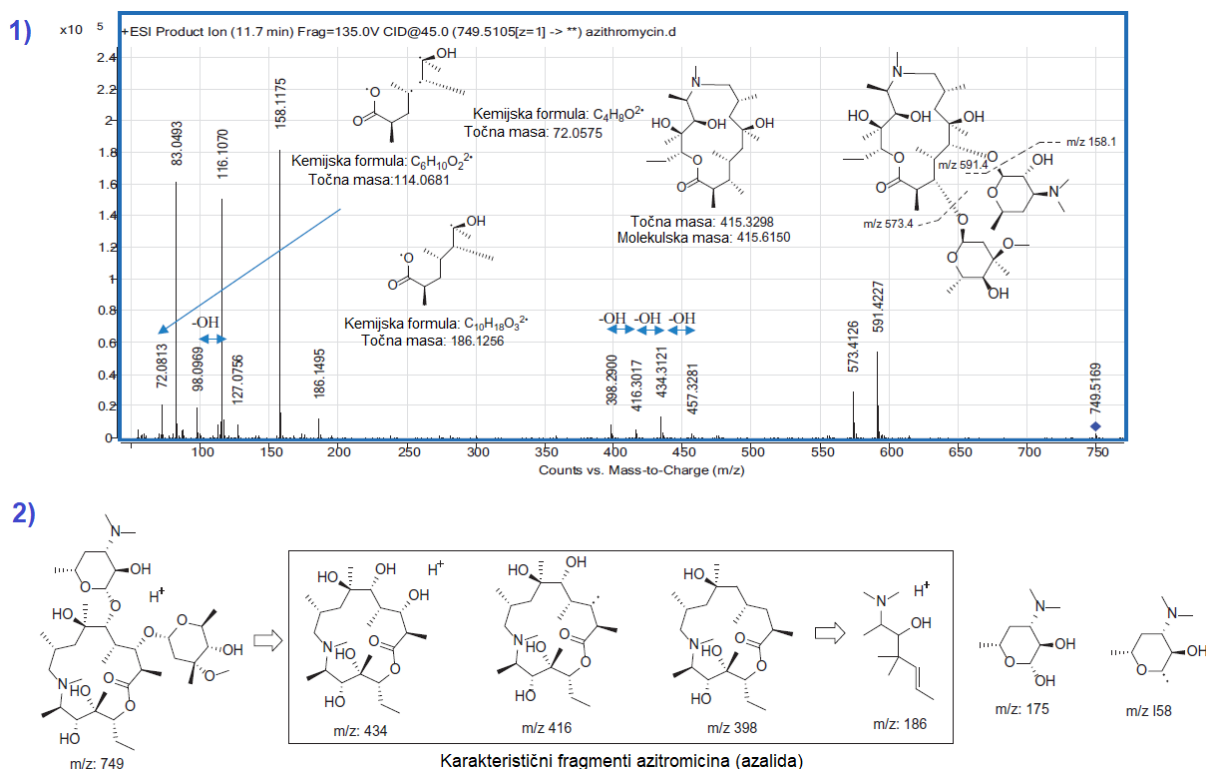
U farmaceutskoj analizi tehnika LC-MS koristi se u istraživanju metabolizma lijekova, analizi i identifikaciji onečišćenja i razgradnih produkata u farmaceutskim proizvodima, te izolaciji i karakterizaciji potencijalnih ljekovitih tvari iz prirodnih ili sintetskih izvora.<sup>40</sup>

S obzirom da LC-MS koristi blage tehnike ionizacije, većinom nastaju jednostruko nabijeni molekulski ioni kod kojih je  $z = 1$ , pa omjer  $m/z$  zapravo odgovara masi analita. Ovo ne vrijedi za velike molekule poput proteina, već za molekule do 1000 Da kao što su brojni antibiotici,<sup>40</sup> a među njima i makrolidi (Tablica 1.). Stoga je metoda LC-MS, odnosno LC-MS/MS vrlo raširena za kvantitativnu analizu i potvrdu prisutnosti makrolida kao i njihovih derivata u različitim uzorcima. Makrolidni antibiotici i njihovi derivati ne nalaze samo medicinsku primjenu, već se naširoko koriste u veterini i agrikulturni, pri čemu često dolazi do njihova ispuštanja u okoliš različitim putevima. Koriste se za suzbijanje i prevenciju bolesti životinja, ali i za poticanje rasta kod uzgoja životinja u prehrambene svrhe. Prekomjerna ili pogrešna upotreba antibiotika može dovesti do njihova zaostajanja u hrani, dok se kod potrošača mogu pojaviti razne nuspojave poput alergijskih reakcija. Stoga je vrlo bitna njihova analiza u prehrambenim, biološkim i ekološkim uzorcima radi provjere sigurnosti hrane i očuvanja okoliša te se u tu svrhu vrlo često koristi tehnika LC-MS.<sup>41-51</sup>

Tablica 1. Rezultati analize makrolidnih antibiotika u uzorcima mlijeka tehnikom HPLC-MS/MS uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom ionizacijskom modu.<sup>42</sup>

Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	Molekulska masa (Da)	Ion prekursor ( $m/z$ )	Fragmenti ( $m/z$ )
Azitromicin	6,3	748,98	749,5	591,4 158,1
Eritromicin A	9,11	733,93	734,5	576,4 158,1
Josamicin	12,95	828,00	828,5	174,1 600,3
Klaritromicin	11,64	747,95	748,5	158,1 590,4
Roksitromicin	11,91	837,05	837,3	158,1 679,4
Spiramicin I	5,48	843,05	843,6	174,1 540,4
Tilmikozin	7,88	869,15	869,5	696,5 174,1
Tilozin	9,92	916,11	916,5	174,1 772,5

Metodom LC-MS/MS provedena je analiza azitromicina i srodnih spojeva (engl. *azithromycin related compounds*, ARCs) u komercijalno dostupnim tabletama.<sup>52</sup> Pretpostavljene strukture onečišćenja najprije su potvrđene spektrometrijom masa visoke razlučivosti, nakon čega su karakteristični ioni prekursori i fragmenti identificirani pomoću tandemne spektrometrije masa, pri čemu je u oba slučaja korištena tehnika ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom ionizacijskom modu. Dobiveni spektar MS/MS azitromicina (Slika 7.) prikazuje glavne signale  $m/z$  591 i  $m/z$  573 koji odgovaraju gubitku šećernih jedinica ( $m/z$  158 i 175), kao i signale fragmenata koji su karakteristični za makrolaktonski prsten azitromicina, stoga se mogu koristiti za potvrdu prisutnosti onečišćenja koja su strukturno slična azitromicinu.



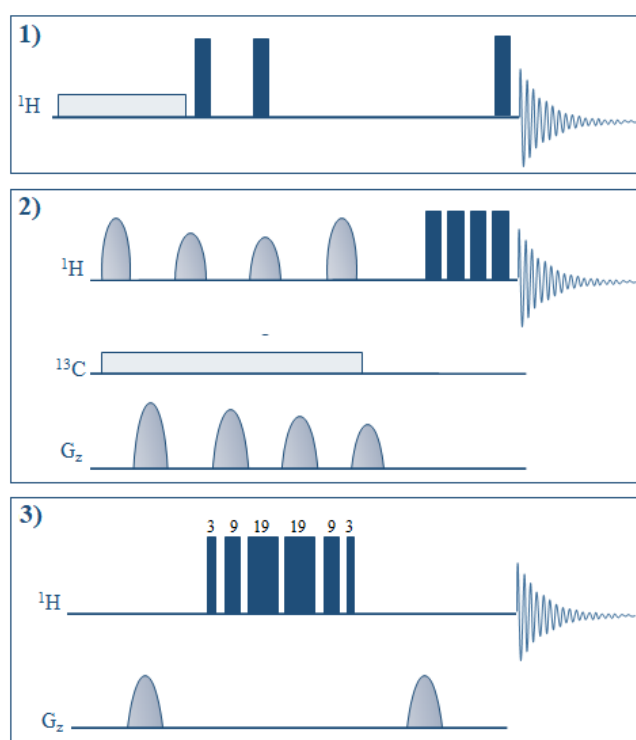
Slika 7. 1) Spektar MS/MS azitromicina i glavnih fragmenata. 2) Strukture fragmenata karakterističnih za azitromicin.<sup>52</sup>

### 2.5.2.2. Primjena spregnute tehnike LC-SPE-NMR

Osim spektrometrije masa, često se za identifikaciju molekula spregnutim tehnikama koristi spektroskopija NMR pomoću koje se mogu određivati strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. U odnosu na LC-MS, sprega tekućinske kromatografije i spektroskopije NMR (LC-NMR) pruža detaljniji uvid u strukturu molekule zbog mogućnosti analize izomera i kiralnih spojeva. Također, LC-NMR nije destruktivna metoda pa se uzorak može upotrijebiti za daljnje analize. Danas postoje brojne jednodimenzijske ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{19}F$ ,  $^{31}P$ ) i dvodimenzijske tehnike NMR (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY), pomoću kojih se dobivaju detaljne informacije o strukturi, dinamici, konformaciji i kemijskom okruženju analizirane molekule. Spektroskopijom NMR mogu se analizirati otopine te uzorci u čvrstom stanju, a primjenjuje se u raznim područjima gdje se, između ostaloga, koristi za razjašnjavanje nepoznatih i potvrđivanje poznatih struktura, za karakterizaciju onečišćenja i razgradnih produkata u farmaceutskim pripravcima i gotovim proizvodima, za analizu prirodnih proizvoda, istraživanje metabolizma i proučavanje biomolekula.<sup>53,54</sup>

U početku je nedostatak tehnike LC-NMR bila niska osjetljivost. Osjetljivost tehnike znatno je povećana razvojem supravodljivih magneta, krio-tehnologije, kao i tehnika za supresiju signala otapala. Još jedan napredak u pogledu poboljšanja kvalitete tehnike LC-NMR bilo je uvođenje sustava LC-SPE-NMR koji će biti opisan u nastavku.<sup>53,54</sup>

Tehnike supresije signala otapala predstavljaju pulsni sljedovi NMR koji omogućuju otklanjanje ili smanjenje intenziteta signala otapala kako bi se mogli opaziti signali analita niske koncentracije. Ove tehnike omogućuju dobivanje vrlo reprezentativnih jedno- i dvodimenzijskih spektara LC-NMR što olakšava potpunu strukturnu karakterizaciju pojedinih komponenata u smjesi. Najčešće korištene tehnike supresije signala otapala su tehnika prezasićenja (NOESY tip), tehnika WET (engl. *water suppression enhanced through  $T_1$  effects*) i tehnika WATERGATE (engl. *water suppression by gradient-tailored excitation*) čiji su pulsni sljedovi prikazani na slici 8.<sup>53</sup>



Slika 8. Pulsni sljedovi NMR najčešće korištenih tehnika supresije signala otapala u analizi LC-NMR: 1) Tehnika prezasićenja (NOESY tip), 2) tehnika WET i 3) tehnika WATERGATE.<sup>53</sup>

Postoji nekoliko načina izvođenja tehnike LC-NMR ovisno o načinu prijenosa eluata s kromatografske kolone do sonde NMR koji može biti izravan ili neizravan. Kod izravnog prijenosa koriste se tehnika neprekinutog protoka (engl. *on-flow mode*), tehnika prekinutog protoka (engl. *stop-flow mode*) i tehnika prekinutog protoka u kratkim vremenskim intervalima (engl. *time-sliced mode*). Najjednostavniji način rada tehnike LC-NMR je tehnika neprekinutog protoka, koja s druge strane ima najviše mana. Ona zahtijeva veće količine uzoraka za kromatografsku analizu kako bi se dobio zadovoljavajući omjer signala prema šumu (engl. *signal to noise ratio*, S/N) u spektru NMR, a vrijeme zadržavanja analita u protočnoj ćeliji NMR ograničeno je brzinom protoka eluata sa kromatografske kolone. Iz tog je razloga ova tehnika prikladna za snimanje samo jednodimenzijskih  $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$  spektara glavnih komponenata analizirane smjese. Još jedan problem tehnike neprekinutog protoka je potreba za korištenjem deuteriranih otapala za kromatografsko odjeljivanje što navedenu tehniku čini preskupom i neekonomičnom. Bolja osjetljivost i dodatne informacije o strukturi pojedine komponente mogu se dobiti korištenjem tehnika zaustavljenog protoka, odnosno tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim intervalima. Međutim, kod ovih tehnika može doći do neželjenih promjena u kromatografskom odjeljivanju, primjerice širenja pikova na kromatografskoj koloni uslijed zaustavljanja protoka. Kako bi se izbjegao navedeni problem, koriste se načini izvedbe tehnike LC-NMR sa neizravnim prijenosom eluata, kao što su tehnika sakupljanja pikova u kapilarne petlje (engl. *loop collection mode*) ili tehnika sakupljanja pikova na čvrstoj fazi (LC-SPE-NMR).<sup>53,55</sup>

Vezani sustav LC-SPE-NMR omogućuje odjeljivanje komponenata smjese tekućinskom kromatografijom, zatim ekstrakciju svake pojedine komponente na SPE-sorbens (engl. *SPE-cartridge*), te identifikaciju izoliranih spojeva spektroskopijom NMR. Ugradnja jedinice SPE donosi brojna poboljšanja tehnike LC-NMR. Jedno od bitnih je neovisnost izbora otapala za kromatografsko odjeljivanje i snimanje spektara NMR. Otapala korištena za kromatografsko odjeljivanje uklanjaju se sušenjem SPE-sorbensa u struji dušika. Nakon toga se analit može ukloniti sa SPE-sorbensa bilo kojim deuteriranim otapalom. Time se u protočnu ćeliju NMR uvode manje količine otapala i samim time se povećava omjer S/N, odnosno intenzitet signala analita u spektru NMR. Zbog mogućnosti korištenja protoniranih otapala u kromatografskom odjeljivanju, analiza je jeftinija, osjetljivija i preciznija. Također, s obzirom da se za snimanje spektara NMR koriste deuterirana otapala, nema potrebe za korištenjem tehnika za supresiju signala otapala, što pojednostavljuje i ubrzava analizu. U usporedbi s

tehnikom zaustavljenog protoka, gdje se javlja problem širenja kromatografskih krivulja, ovdje se analit ispire malom količinom deuteriranog otapala izravno u protočnu ćeliju ili cjevčicu NMR, stoga je širenje zone analita minimalno. Još jedna prednost vezanog sustava LC-SPE-NMR je mogućnost ukoncentriravanja analita višestrukim (engl. *multitrapping*) izdvajanjem na SPE-sorbens, čime se značajno povećava osjetljivost snimanja spektara NMR, kao i poboljšanja omjera S/N u odnosu na konvencionalnu tehniku LC-NMR, a samim time omogućeno je snimanje kvalitetnih jednodimenzijskih i dvodimenzijskih spektara NMR.

Zahvaljujući brojnim poboljšanjima tehnika LC-NMR pronalazi svoju primjenu u različitim znanstvenim istraživanjima i industriji, ponajprije farmaceutskoj. Primjenjuje se u analizi onečišćenja i/ili razgradnih produkata farmaceutskih proizvoda<sup>56-61</sup>, analizi metabolita lijekova<sup>56,62,63</sup> i prirodnih produkata<sup>64-66</sup>, te u području zaštite okoliša<sup>67,68</sup>. Pravilnom interpretacijom snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR moguće je odrediti i strukture većih molekula, primjerice makrolida i njihovih derivata. Također je moguće tehnikom LC-NMR odrediti razgradne produkte makrolida i njihovih onečišćenja.<sup>61,69</sup> Međutim, veći je broj objavljenih znanstvenih i istraživačkih radova čija je tematika usmjerena na analizu makrolidnih antibiotika vezanom tehnikom LC-MS u odnosu na analizu tehnikom LC-NMR. Jedan od mogućih razloga takvog odnosa je činjenica da je spektroskopija NMR neselektivna metoda za otkrivanje i identifikaciju nepoznatih analita, jer se uvijek detektiraju bilo koji spojevi koji sadrže protone te se u većini slučajeva spektroskopija NMR koristi nakon analize tehnikom LC-MS i to za potvrdu strukture analita, ukoliko prethodno nije dobiven dovoljno ponovljiv odgovor, kao i za potvrdu mogućih izomera i kiralnih spojeva. Iz tog razloga jednu od danas najmoćnijih analitičkih tehnika za temeljito razrješavanje struktura spojeva u smjesama predstavlja tehnika LC-SPE-NMR-MS, pomoću koje je proces određivanja strukture značajno ubrzan i olakšan.<sup>70</sup>

### 2.5.2.3. Analiza izomera i kiralnih spojeva

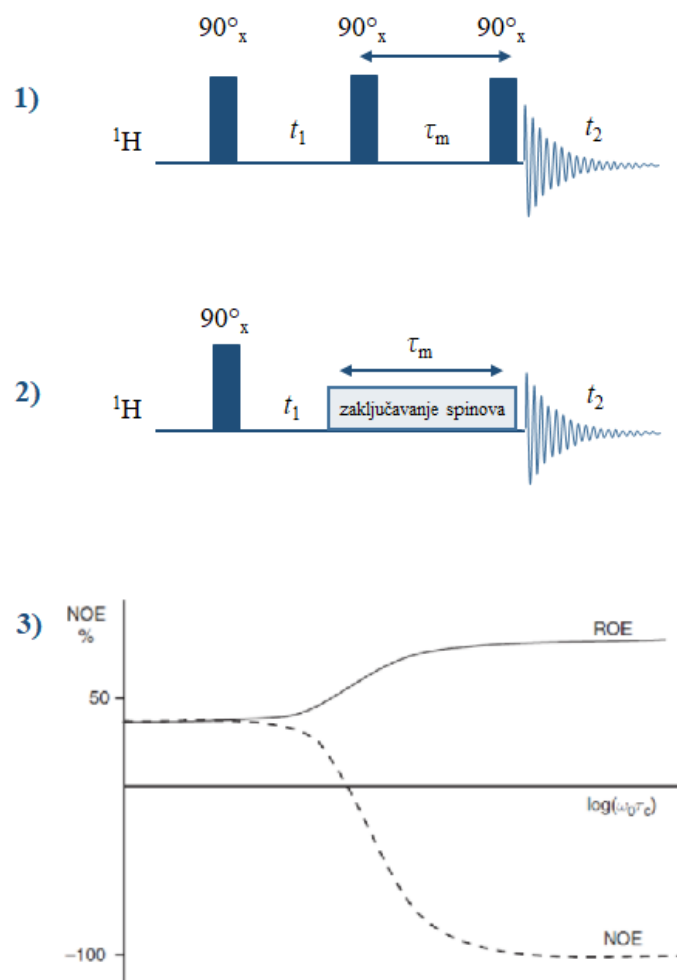
U pripravi farmaceutskih proizvoda, ali i u farmaceutskoj industriji općenito, vrlo je važno provoditi analizu izomera i kiralnih spojeva, odnosno većinom je potrebno odrediti stereostrukture promatranih analita, pogotovo farmaceutski aktivnih tvari. Razlog tome je taj što enantiomeri pojedinih bioaktivnih molekula vrlo često mogu imati različite biološke učinke, odnosno samo jedan od njih može imati povoljnu farmakološku aktivnost, dok primjerice onaj drugi čak može biti i potencijalno otrovan. Primjer je talidomid, sedativ i lijek za poticanje sna,

koji je u početku uveden u uporabu u svom racemičnom obliku, što je ostavilo tragične posljedice jer se naknadno uspostavilo da njegov (*S*)-enantiomer posjeduje teratogena svojstva.<sup>71</sup> U svrhu određivanja stereostrukture u otopini uglavnom se koristi spektroskopija NMR, pomoću koje se mogu dobiti informacije o prostornom rasporedu atoma ili skupina, odnosno konfiguraciji ili konformaciji analita. Osim toga, spektroskopija NMR pruža informacije o unutarnjoj dinamici molekula i interakcijama s drugim molekulama.

Za objašnjenje stereostrukture analita koristi se nekoliko različitih parametara spektroskopije NMR među kojima je najvažniji nuklearni Overhauserov efekt (engl. *nuclear Overhauser effect*, NOE) koji daje izravne informacije o prostornoj udaljenosti između promatranih atoma, najčešće vodikovih. NOE je proces u kojem se dva spina međusobno relaksiraju kroz interakcije dipol-dipol, takozvanom križnom relaksacijom. Efekt NOE može biti pozitivan ili negativan, što ovisi o korelacijskom vremenu  $\tau_c$ , udaljenosti između promatranih jezgri, pri čemu je ograničen na udaljenost jezgri od 5 Å, te o veličini molekule, temperaturi, otapalu i jakosti magnetnog polja. Tehnike koje se temelje na efektu NOE i često se koriste u strukturnoj karakterizaciji su dvodimenzijske tehnike NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i ROESY (engl. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*), čiji su pulsni slijedovi prikazani na slici 9. Kod tehnike NOESY, za molekule srednje veličine, vrijednost efekta NOE vrlo je mala ili jednaka nuli, te se iz tog razloga za molekule mase oko 1000 Da preporuča detekcija efekta NOE u rotirajućem okviru (ROE), odnosno snimanje spektara tehnikom ROESY kod koje je NOE uvijek pozitivan (Slika 9.).<sup>72,73</sup>

Navedene dvodimenzijske tehnike NOESY i ROESY također se koriste i u određivanju stereokemije makrolida i njihovih derivata koji su složene molekule te posjeduju velik broj kiralnih centara. Bilo kakva promjena u stereokemiji makrolida može utjecati na njihovu bioaktivnost i fizikalno-kemijska svojstva.<sup>61,74-78</sup>





Slika 9. 1) Pulsni slijed za tehniku NOESY. 2) Pulsni slijed za tehniku ROESY. 3) Ovisnost inteziteta signala NOESY i ROESY o umnošku frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena  $(\omega_0\tau_c)$ .<sup>73</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije i materijali

- Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ),  $\geq 99,9\%$ , *Fisher Chemical*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Acetonitril- $\text{d}_3$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $99,80\%$  D, *Eurisotop*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Amonijak ( $\text{NH}_3$ ), otopina min.  $25\%$  p.a., *Alkaloid*, Makedonija
- Amonijev hidrogenkarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ),  $\geq 99,0\%$ , *Sigma Aldrich*, Njemačka
- *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA),  $> 99,5\%$ , *Acros Organics*, SAD
- HATU,  $97\%$ , *Acros Organics*, SAD
- 4-((2-((3-fenilpropil)karbamotioil)hidraziniliden)metil)benzojeva kiselina (**P2-9**), *Zavod za analitičku kemiju*, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Hrvatska
- 3-(3-fenilpropil)-makrozon (**3-9**), *Zavod za analitičku kemiju*, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Hrvatska
- 4-((2-((4-(trifluormetoksi)fenil)karbamotioil)hidraziniliden)metil)benzojeva kiselina (**P2-8**), *Zavod za analitičku kemiju*, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Hrvatska
- 3-trifluormetoksifenil-makrozon (**3-8**), *Zavod za analitičku kemiju*, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Hrvatska
- Ultračista voda ( $m\text{q-H}_2\text{O}$ ), pročišćena korištenjem uređaja Mili-q Integral Water Purification System, *Merck*, SAD
- Filtri za špicu s promjerom pora  $0,45\ \mu\text{m}$ , *Cromafil Xtra PTFE-45/25*, *Macherey-Nagel*, Njemačka
- Kromatografska kolona Waters XBridge® Phenyl  $3,5\ \mu\text{m}$ ,  $4,6 \times 150\ \text{mm}$
- Najlonski membranski filtri s promjerom pora  $0,45\ \mu\text{m}$ , *Membrane Solutions*, SAD

### 3.2. Radni uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Za odjeljivanje komponenata reakcijskih smjesa makrozona **3-8** i **3-9** korišten je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, model *Agilent Technologies 1260 Infinity*. Kromatograf je sastavljen od kvaterne pumpe, automatskog uzorkivača, termostatiranog prostora za kromatografsku kolonu te detektora UV-DAD. Uzorci su analizirani na kromatografskoj koloni Waters XBridge® Phenyl dimenzija 4,6 mm × 150 mm i promjera čestica punila 3,5 μm, uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila (A) i amonijačnog pufera (B) množinske koncentracije 10 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 10 (Tablica 2.), pri čemu je protok pokretne faze bio 1 mL min<sup>-1</sup>. Volumen injektiranja za uzorak **3-8** bio je 15 μL, odnosno 8 μL za uzorak **3-9**. Temperatura kolone bila je 25 °C, a valna duljina detekcije iznosila je 210 nm. Dobiveni kromatogrami analizirani su pomoću programskih paketa *Agilent OpenLab ChemStation* (SAD) i *Bruker HyStar 3.2.* (SAD).

Tablica 2. Sastav pokretne faze za analizu reakcijskih smjesa makrozona **3-8** i **3-9**.

<i>t</i> / min	$\varphi$ (eluens A) / %	$\varphi$ (eluens B) / %
0	50	50
20	68	32
21	100	0
25	100	0
25,1	50	50
30	50	50

#### 3.2.1. Priprava pokretne faze i uzoraka za analizu tehnikom HPLC

Amonijačni pufer pripremljen je otapanjem 1,58 g amonijeva hidrogenkarbonata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 2000 mL. Pripremljenoj otopini podešen je pH na vrijednost 10 pomoću pH-metra, uz postupno dodavanje 25%-tne otopine amonijaka. Nakon toga otopina je profiltrirana pri sniženom tlaku kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm. Dobiveni pufer je skladišten u hladnjaku.

U svrhu izrade ovog diplomskog rada korištene su reakcijske smjese makrozona **3-8** i **3-9** sintetizirane u *Zavodu za analitičku kemiju* Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za analizu makrozona **3-8** korištene su dvije različite šarže reakcijskih smjesa. Otopina prve reakcijske smjese makrozona **3-8** pripravljena

je otapanjem 50 mg reakcijske smjese **3-8 (1)** u 5 mL acetonitrila, pri čemu je konačna koncentracija otopine uzorka **3-8 (1)** iznosila 10 mg mL<sup>-1</sup>. Otopina druge reakcijske smjese makrozona **3-8 (2)** pripravljena je otapanjem 90,99 mg reakcijske smjese **3-8 (2)** u 5 mL acetonitrila, pri čemu je konačna koncentracija otopine uzorka **3-8 (2)** iznosila 18,20 mg mL<sup>-1</sup>. Za pripremu otopine reakcijske smjese makrozona **3-9** izvagano je 232,58 mg reakcijske smjese **3-9** i otopljeno u 10 mL acetonitrila, te je konačna koncentracija uzorka **3-9** iznosila 23,26 mg mL<sup>-1</sup>. Kako bi se ubrzalo otapanje uzoraka, tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj sve dok otopine nisu postale potpuno bistre. Tako pripremljeni uzorci profiltrirani su u viala od 2 mL i analizirani.

### 3.3. Radni uvjeti ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE)

Za ekstrakciju na čvrstoj fazi korišten je instrument *Prospekt 2*, proizvođača *SparkHolland*, Nizozemska. Instrument se sastoji od pumpe Knauer-120 koja omogućuje dodatni protok vodene faze (tzv. *make-up* protok), te jedinice SPE na kojoj se nalaze visokotlačni raspršivač (engl. *High Pressure Dispenser*, HPD) s dvije injekcijske igle i automatski izmjenjivač SPE-sorbensa (engl. *Automatic Cartridge Exchanger*, ACE). Korišteni programski paket bio je *Bruker HyStar 3.2*. (SAD). U svrhu izrade ovog diplomskog rada korišteni su SPE-sorbensi C18 na koje su višestruko skladištene odabrane komponente reakcijskih smjesa makrozona **3-8** i **3-9**. Prije analize SPE-sorbensi su kondicionirani ispiranjem s 500 µL acetonitrila i ekvilibrirani s 500 µL ultračiste vode, za što služi lijeva injekcijska igla visokotlačnog raspršivača. Tijekom ekstrakcije pojedine komponente na SPE-sorbens, dodatni protok pokretne faze iznosio je 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Nakon ekstrakcije SPE-sorbensi su posušeni u struji dušika 30 min. Ekstrahirani analiti su zatim eluirani sa SPE-sorbensa u cjevčice NMR pomoću desne injekcijske igle visokotlačnog raspršivača pri čemu je korišteno 200 µL acetonitrila-d<sub>3</sub>.

### 3.4. Snimanje spektara NMR

Za potrebe identifikacije i određivanja struktura izoliranih komponenata reakcijskih smjesa makrozona **3-8** i **3-9** snimljeni su sljedeći spektri NMR: <sup>1</sup>H, COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC i NOESY. Spektri su snimljeni na spektrometru *Bruker Avance NEO 600 MHz* s 5 mm BBO (engl. *Broadband*) indirektnom *Prodigy* krio-probom i z-gradijentnom zavojnicom pri 298 K, pri čemu su korišteni pulsni programi sa supresijom signala otapala unutar programskog

paketa *TopSpin* 3.6.3. Kao referentni signal korišten je tetrametilsilan (TMS), a kao otapalo acetonitril- $d_3$ . Spektri NMR analizirani su i obrađeni unutar programskog paketa *TopSpin* 3.6.3.

#### 3.4.1. Spektri $^1H$ -NMR

Za snimanje spektara  $^1H$ -NMR izoliranih komponenata reakcijskih smjesa makrozona **3-8** i **3-9** korišten je pulsni slijed *lc1pncwgpps* sa supresijom signala otapala. Spektri su snimljeni uz sljedeće uvjete: broj snimaka iznosio je 128 – 256 (ovisno o koncentraciji analita), spektralna širina 19,84 ppm i digitalno razlučivanje 1,45 Hz.

#### 3.4.2. Homonuklearni i heteronuklearni spektari 2D NMR

Spektari COSY za izolirane komponente reakcijskih smjesa snimljeni su korištenjem pulsno slijeda *cosycwgppsaf*. Broj snimaka, kao i prilikom snimanja ostalih dvodimenzijskih spektara NMR, ovisio je o koncentraciji spoja, odnosno o omjeru signala i šuma u spektru  $^1H$ , izračunatog u području od 9,0 ppm do 5,5 ppm. Za snimanje spektara COSY primijenjeni su sljedeći parametri: 2048 točaka u F2 dimenziji, 256 inkremenata u F1 dimenziji, spektralno područje od 9615,39 Hz i relaksacijsko vrijeme odgode od 2 s. Digitalna rezolucija bila je 9,39 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 75,12 Hz u F1 dimenziji.

Za snimanje spektara HSQC korišten je pulsni slijed *hsqcedetgpsp*, pri čemu su primijenjeni sljedeći parametri: 4096 točaka u F2 dimenziji, 256 inkremenata u F1 dimenziji, relaksacijsko vrijeme odgode od 1,5 s, 64 – 100 snimaka po inkrementu, spektralna širina od 9615,39 Hz u F2 dimenziji, odnosno 27166,35 Hz u F1 dimenziji, te digitalna rezolucija od 4,70 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 212,24 Hz u F1 dimenziji.

Za snimanje spektara HMBC korišten je pulsni slijed *hmbcgplpndqf*, uz sljedeće parametre: 4096 točaka u F2 dimenziji, 256 inkremenata u F1 dimenziji, relaksacijsko vrijeme odgode od 1,5 s, 80 – 160 snimaka po inkrementu, spektralna širina od 9090,91 Hz u F2 dimenziji, odnosno 33204,15 Hz u F1 dimenziji, te digitalna rezolucija od 4,44 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 259,41 Hz u F1 dimenziji.

Za snimanje spektara NOESY odabranih izoliranih komponenata reakcijskih smjesa korišten je pulsni slijed *noesygpphzs*, pri čemu su primijenjeni sljedeći parametri: 2048 točaka u F2 dimenziji, 512 inkremenata u F1 dimenziji, relaksacijsko vrijeme odgode od 2 s uz vrijeme miješanja 400 ms, 72 - 144 snimaka po inkrementu, spektralna širina od 6578,95 Hz u F2 i F1 dimenziji, te digitalna rezolucija od 6,42 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 25,70 Hz u F1 dimenziji.

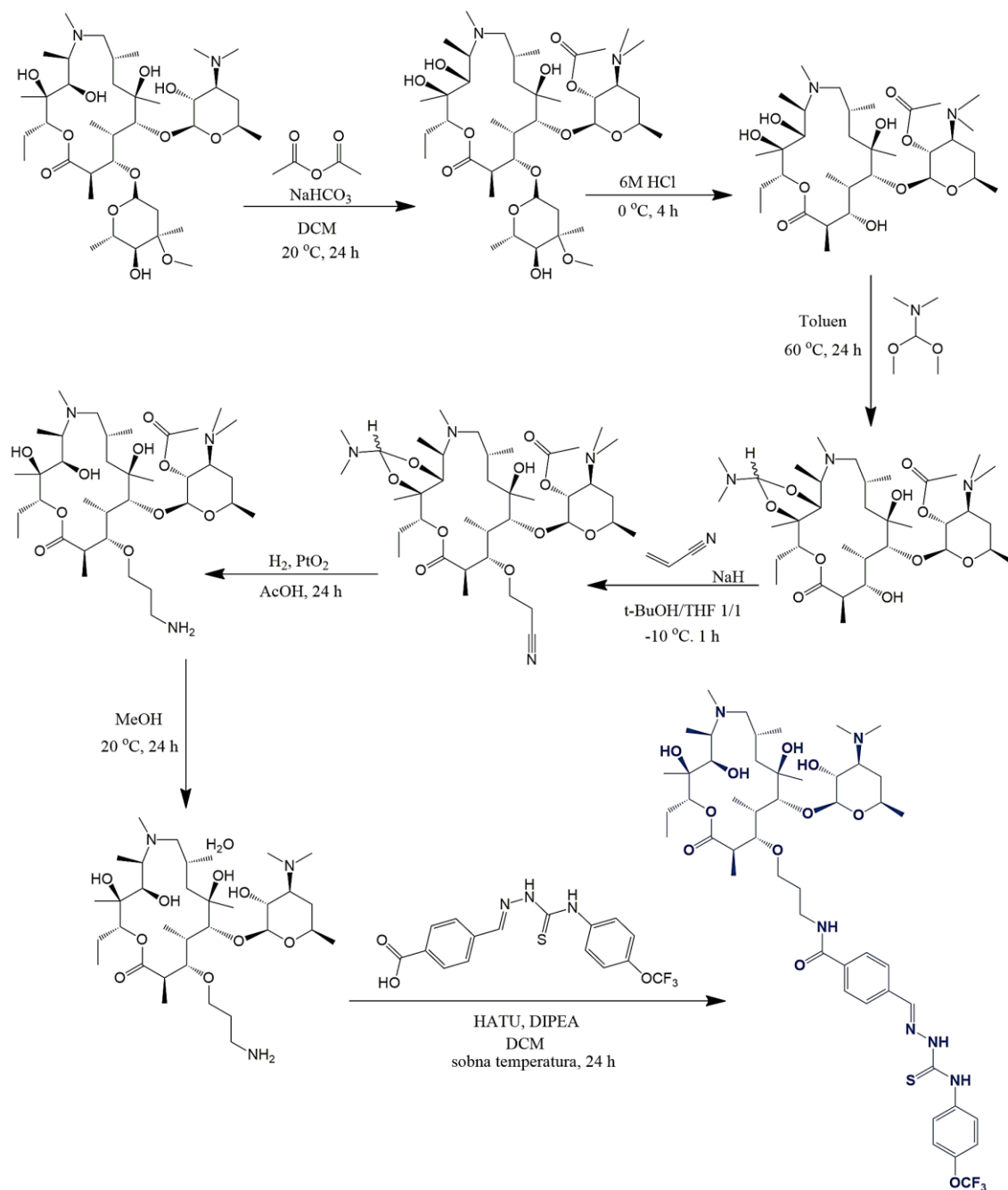
### 3.5. Snimanje spektara MS

Spektri masa izoliranih komponenata reakcijskih smjesa makrozona **3-8** i **3-9** snimljeni su na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu na instrumentu *Bruker amaZon ETD* s ionskom stupicom, uz ionizaciju elektroaspršenjem u pozitivnom ionizacijskom modu. Spektri masa snimljeni su u rasponu vrijednosti  $m/z$  od 100 do 1500.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

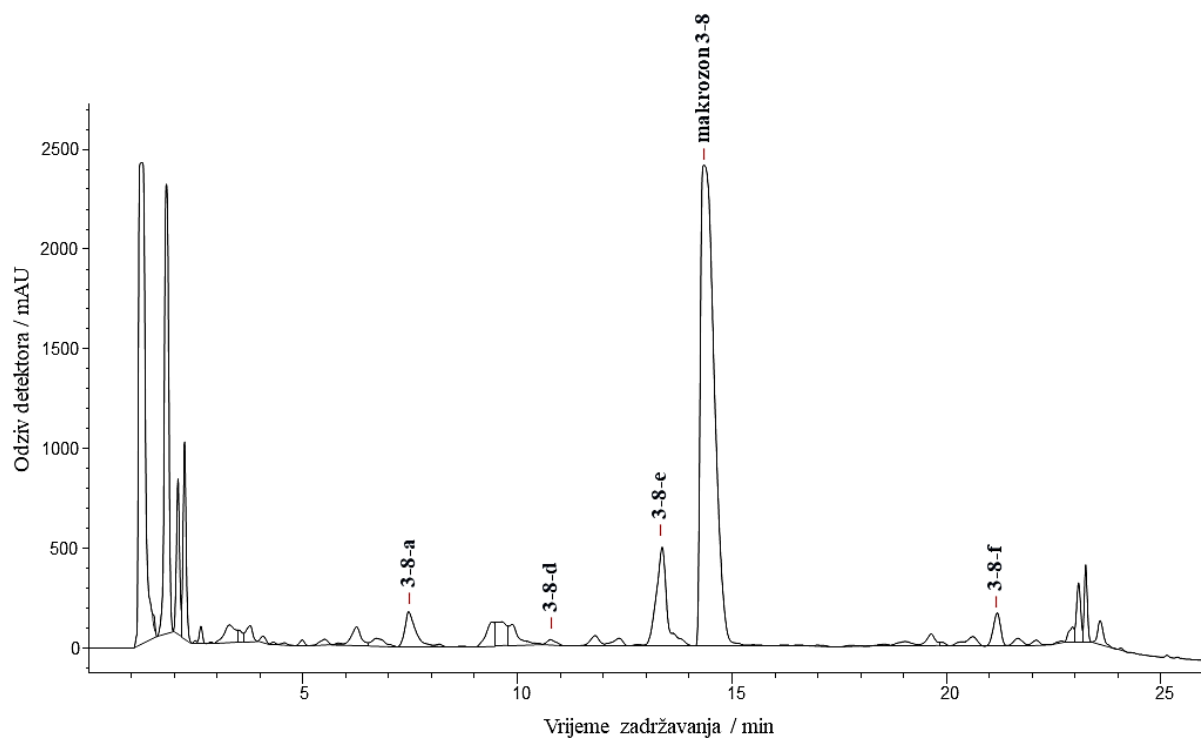
### 4.1. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-8

Makrozon 3-8 sintetiziran je prema shemi na slici 10.



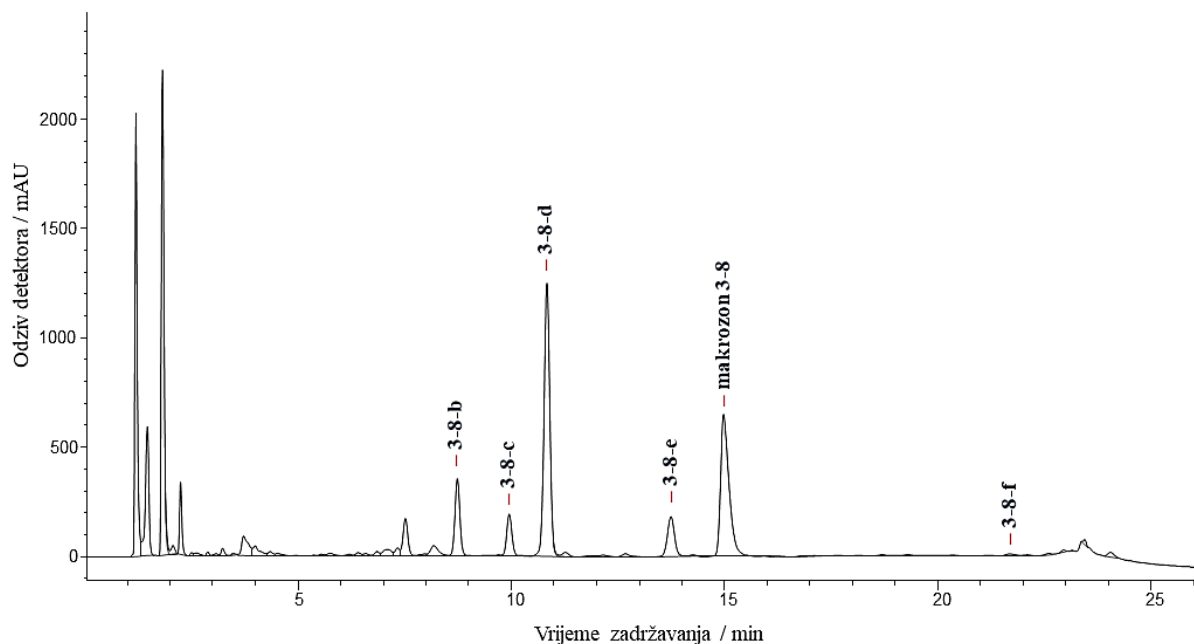
Slika 10. Shematski prikaz sinteze makrozona 3-8.

Reakcijske smjese makrozona **3-8** analizirane su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, pri čemu je kromatografsko odjeljivanje postignuto na kromatografskoj koloni Waters XBridge® Phenyl dimenzija 4,6 mm × 150 mm i promjera čestica punila 3,5 μm, uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila i amonijačnog pufera množinske koncentracije 10 mmol dm<sup>-3</sup> pri pH 10 (Tablica 2.). Reprezentativni kromatogrami reakcijskih smjesa makrozona **3-8 (1)** i **3-8 (2)** prikazani su na slikama 11 i 12.



Slika 11. Reprezentativni kromatogram reakcijske smjese makrozona **3-8 (1)** masene koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup>.





Slika 12. Reprezentativni kromatogram reakcijske smjese makrozona **3-8** (2) masene koncentracije  $18,20 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Kvantitativna analiza reakcijskih smjesa makrozona **3-8** provedena je metodom normalizacije pikova<sup>79</sup> u kromatogramima reakcijskih smjesa uz pomoć programskog paketa *Agilent OpenLab CDS ChemStation*. Ovom metodom moguće je odrediti sadržaj pojedine komponente u smjesi, koji se računa iz omjera površine kromatografske krivulje određivane komponente i ukupne površine svih kromatografskih krivulja u kromatogramu. Međutim, jedan od nedostataka metode normalizacije pikova je taj što ona ne uzima u obzir nedetektirane komponente smjese te pretpostavlja da je odziv za sve komponente smjese jednak. Točnost rezultata može se poboljšati korištenjem metode vanjskog standarda. U tablici 3. prikazani su rezultati primjene metode normalizacije pikova u kromatogramima reakcijskih smjesa makrozona **3-8** za izolirane komponente nepoznate strukture. Osim novosintetiziranog makrozona **3-8**, iz reakcijskih smjesa izolirane su odabrane komponente nepoznate strukture, koje su imenovane kombinacijom oznake **3-8** i malog slova abecede (**a – f**) prema redu eluiranja s kromatografske kolone (Slike 11. i 12.). Udio istih komponenata u dvjema reakcijskim smjesama razlikovao se zbog upotrebe međuprodukata različitog stupnja čistoće tijekom sinteze dviju različitih šarži reakcijskih smjesa makrozona **3-8**. Vrijeme zadržavanja,  $t_R$ , makrozona **3-8** u reakcijskoj smjesi (1) iznosi  $14,343 \text{ min}$ , a njegov udio je  $37,76 \%$ . U reakcijskoj smjesi (2) makrozon **3-8** eluira pri  $14,974 \text{ min}$ , te njegov udio u toj smjesi iznosi  $15,77 \%$ . Spoj **3-8-a** izoliran je iz reakcijske smjese (1) i ima vrijeme zadržavanja,  $t_R$ ,  $7,458$

min, a njegov udio u toj reakcijskoj smjesi iznosi 2,11 %. Spoj **3-8-b** izoliran je iz reakcijske smjese (2), a eluira s kolone pri  $t_R$  8,727 min i njegov udio u toj reakcijskoj smjesi iznosi 4,91 %. Spoj **3-8-c** također je izoliran iz reakcijske smjese (2), pri čemu njegovo vrijeme zadržavanja iznosi 9,936 min te je njegov udio u toj reakcijskoj smjesi 2,76 %. Spoj **3-8-d** izoliran je iz obje reakcijske smjese, a njegova vremena zadržavanja iznose 10,776 min u reakcijskoj smjesi (1) i 10,821 min u reakcijskoj smjesi (2). Udio spoja **3-8-d** u reakcijskim smjesama (1) i (2) iznosi 0,25 %, odnosno 20,57 %. Spoj **3-8-e** izoliran je iz obje reakcijske smjese. U reakcijskoj smjesi (1) eluira pri  $t_R$  13,372 min, a njegov udio iznosi 6,08 %. U reakcijskoj smjesi (2) eluira pri  $t_R$  13,735 min, a njegov udio iznosi 3,77 %. Spoj **3-8-f** izoliran je također iz obje reakcijske smjese, te njegova vremena zadržavanja iznose 21,181 min u reakcijskoj smjesi (1), odnosno 21,664 min u reakcijskoj smjesi (2). Udjeli spoja **3-8-f** u reakcijskim smjesama iznose 1,36 % i 0,24 %.

Tablica 3. Udio komponenata u reakcijskim smjesama makrozona **3-8** korištenjem metode normalizacije pikova.

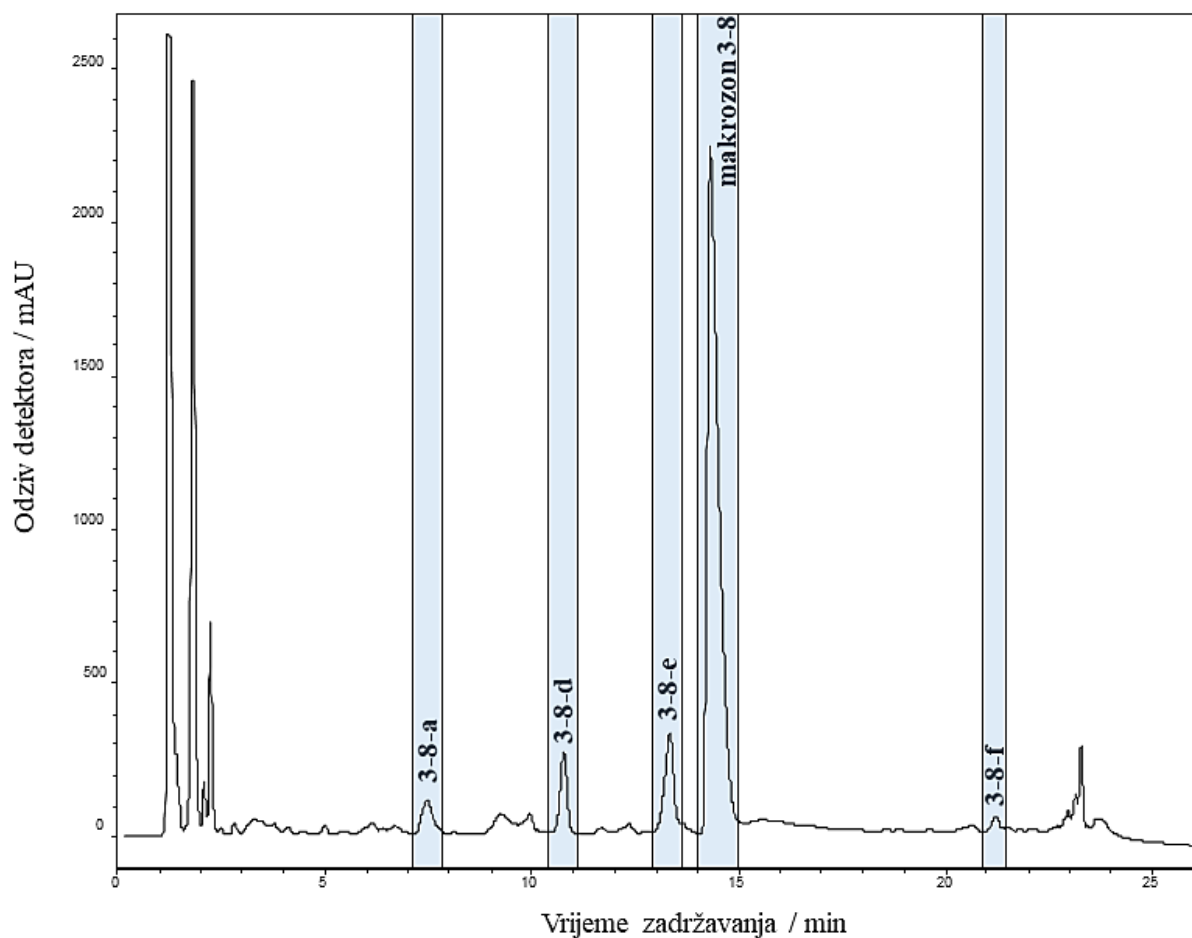
	Spoj	Vrijeme zadržavanja / min	Površina ispod kromatografske krivulje / mAU s	% Površine
3-8 (1)	3-8-a	7,458	3022,9	2,11
	3-8-d	10,776	359,5	0,25
	3-8-e	13,372	8709,8	6,08
	makrozon 3-8	14,343	54095,9	37,76
	3-8-f	21,181	1947,8	1,36
3-8 (2)	3-8-b	8,727	2813,9	4,91
	3-8-c	9,936	1581,6	2,76
	3-8-d	10,821	11791,3	20,57
	3-8-e	13,735	2160,3	3,77
	makrozon 3-8	14,974	9039,3	15,77
	3-8-f	21,664	135,2	0,24

Iz reakcijske smjese **3-8 (1)** uspješno su ekstrahirani makrozon **3-8** i komponente **3-8-(a, d – f)** (Slika 13.), dok su iz reakcijske smjese **3-8 (2)** uz makrozon **3-8** uspješno ekstrahirane komponente **3-8-(b – f)** (Slika 14.). Navedeni spojevi ekstrahirani su višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbense punjene nepokretnom fazom C18, pri čemu je broj ukoncentriravanja iznosio 100 do 150 puta. Mase ekstrahiranih spojeva prikazane su u tablici 4. Nakon ekstrakcije odabranih komponenata pomoću tehnike HPLC-SPE, spojevi su eluirani

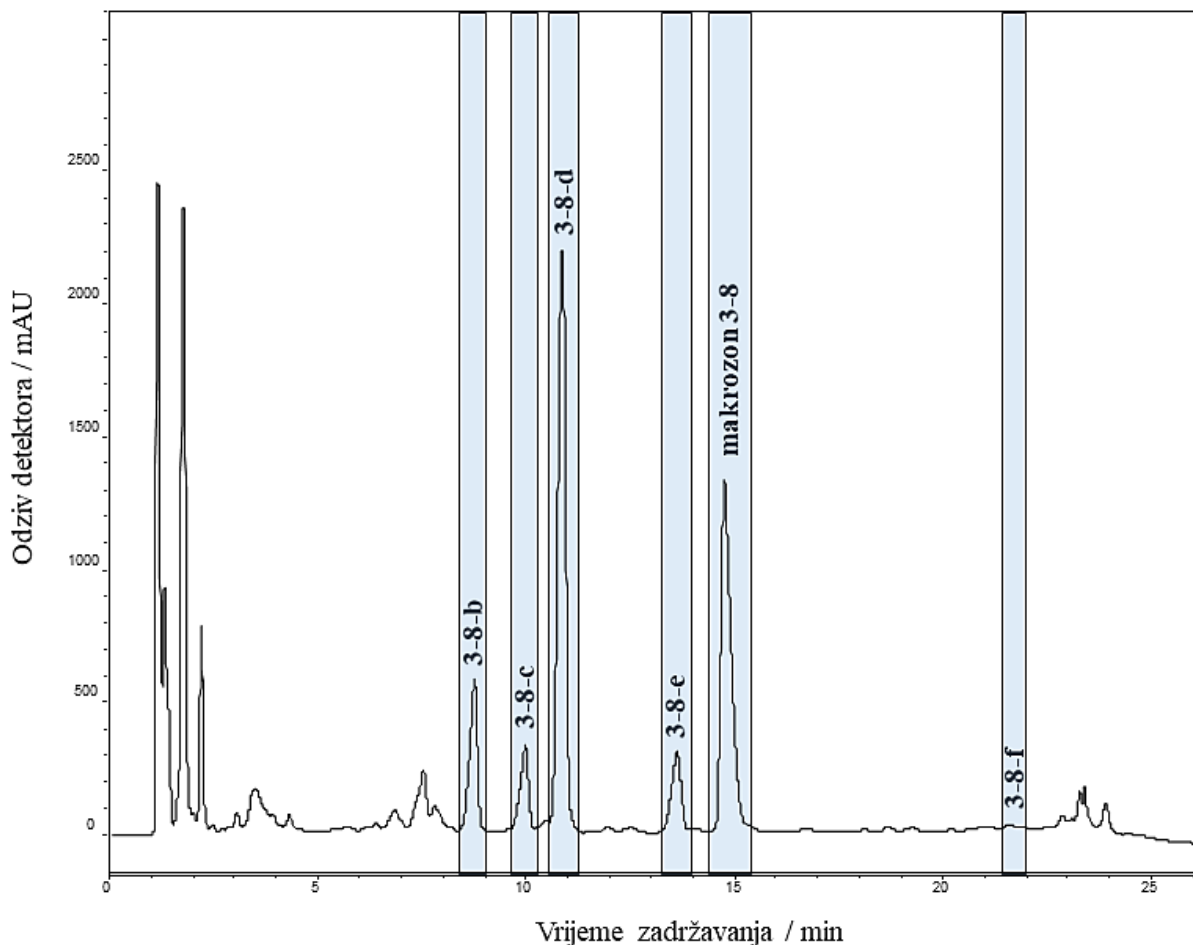
u 3 mm cjevčice NMR korištenjem acetonitrila- $d_3$  te su snimljeni sljedeći spektri:  $^1H$ , COSY,  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC i HMBC za svaki spoj, a za neke su spojeve snimljeni i spektri NOESY. Također su snimljeni i spektri masa.

Tablica 4. Mase ekstrahiranih spojeva iz reakcijskih smjesa makrozona 3-8.

Spoj	<i>m</i> / mg
makrozon 3-8	2,29
3-8-a	0,23
3-8-b	0,28
3-8-c	0,21
3-8-d	0,24
3-8-e	1,63
3-8-f	0,18



Slika 13. Kromatogram LC-SPE s izoliranim komponentama iz reakcijske smjese 3-8 (1).

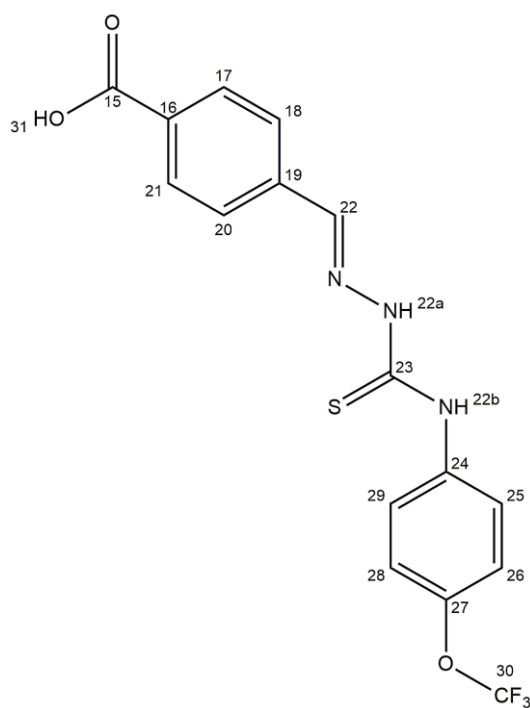


Slika 14. Kromatogram LC-SPE s izoliranim komponentama iz reakcijske smjese **3-8** (2).

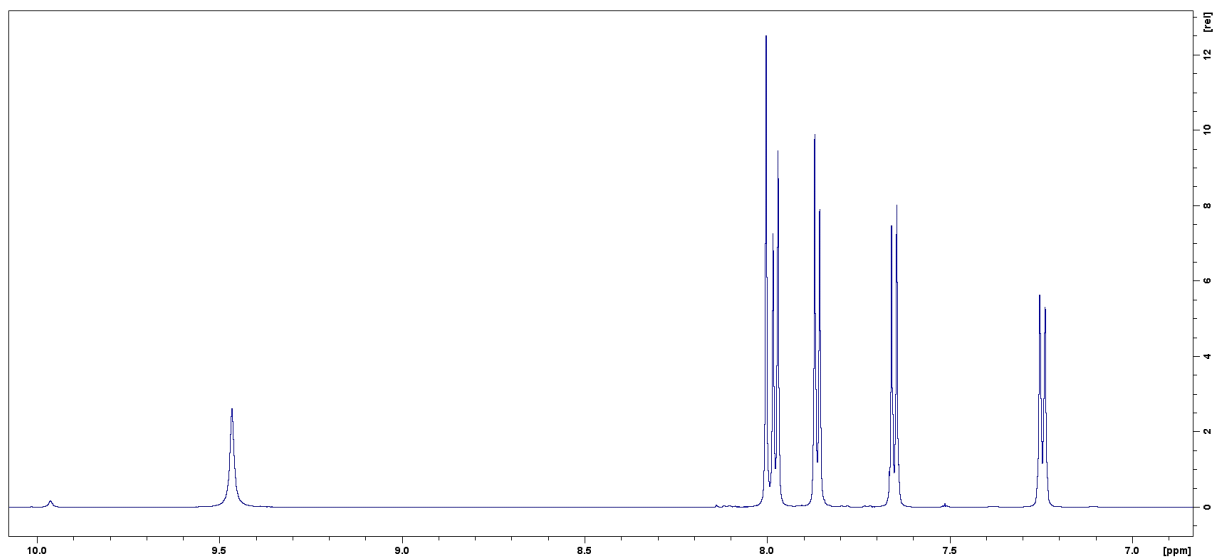
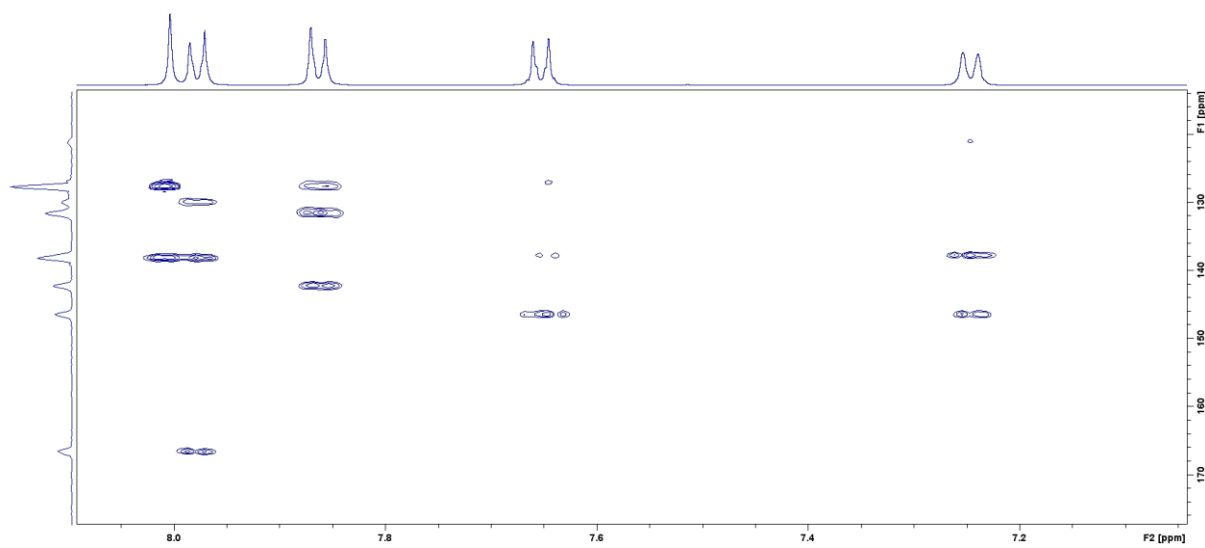
#### 4.1.1. Analiza spoja **P2-8** spektroskopijom NMR

U zadnjem koraku tijekom sinteze makrozona **3-8** korišten je odgovarajući derivat tiosemikarbazida **P2-8** (Slika 15.) koji je također pripremljen u laboratoriju *Zavoda za analitičku kemiju*. Kako bi se potvrdila struktura navedenog spoja, snimljeni su sljedeći spektri NMR:  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC i HMBC. Analizom spektra  $^1\text{H}$  NMR (Slika 16.) mogu se vidjeti signali u području od 7,25 ppm do 7,98 ppm koji odgovaraju protonima iz dvaju benzenskih prstena. Iz spektara COSY (Slika D1.) i HSQC (Slika D2.) mogu se jednoznačno odrediti kemijski pomaci aromatskih protona i odgovarajućih ugljikovih atoma. Signal pri 7,98 ppm odgovara protonima H17 i H21 (Slika 15), dok signal pri 7,86 ppm odgovara protonima H18 i H20, a njima odgovarajući signali ugljikovih atoma su pri 130,06 ppm za C17 i C21, te pri 127,50 ppm za atome ugljika C18 i C20. Signali protona drugog benzenskog prstena nalaze se pri 7,65 ppm za atome H25 i H29, odnosno pri 7,25 ppm za atome H26 i H28. Odgovarajući signali ugljikovih atoma nalaze se pri 127,20 ppm za C25 i C29, odnosno pri 121,03 ppm za atome ugljika C26 i

C28. U spektru  $^1\text{H}$  NMR također je prisutan izraženi singlet pri 8,00 ppm koji odgovara protonu iz imino veze (H22), koji u spektru HSQC ima korelaciju sa odgovarajućim ugljikovim atomom C22 pri 142,15 ppm. Osim toga, u spektru HMBC (Slika 17.) prisutna je korelacija protona H22 s atomima ugljika iz jednog od benzenskih prstena (C18 i C20), čiji se signal nalazi pri 127,50 ppm, te korelacija protona H22 i kvaternog ugljikovog atoma C19 čiji je signal pri 138,14 ppm. Signali protona sekundarnih amino skupina (H22a i H22b) nisu opaženi zbog izmjene s deuterijem iz acetonitrila- $\text{d}_3$  korištenog prilikom snimanja spektara NMR. U spektru  $^1\text{H}$  NMR prisutan je i singlet pri 9,47 ppm koji odgovara protonu iz karboksilne skupine (H31). Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **P2-8** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$  prikazani su u tablici 5.



Slika 15. Struktura spoja **P2-8**.

Slika 16. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$  NMR spoja **P2-8**.Slika 17. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **P2-8**.

Tablica 5. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **P2-8** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ .

P2-8		
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
15	–	166,39
16	–	131,50
17;21	7,98	130,06
18;20	7,86	127,50
19	–	138,14
22	8,00	142,15
22a	–*	–
22b	–*	–
23	–	–*
24	–	137,67
25;29	7,65	127,20
26;28	7,25	121,03
27	–	146,43
30	–	121,15
31	9,47	–

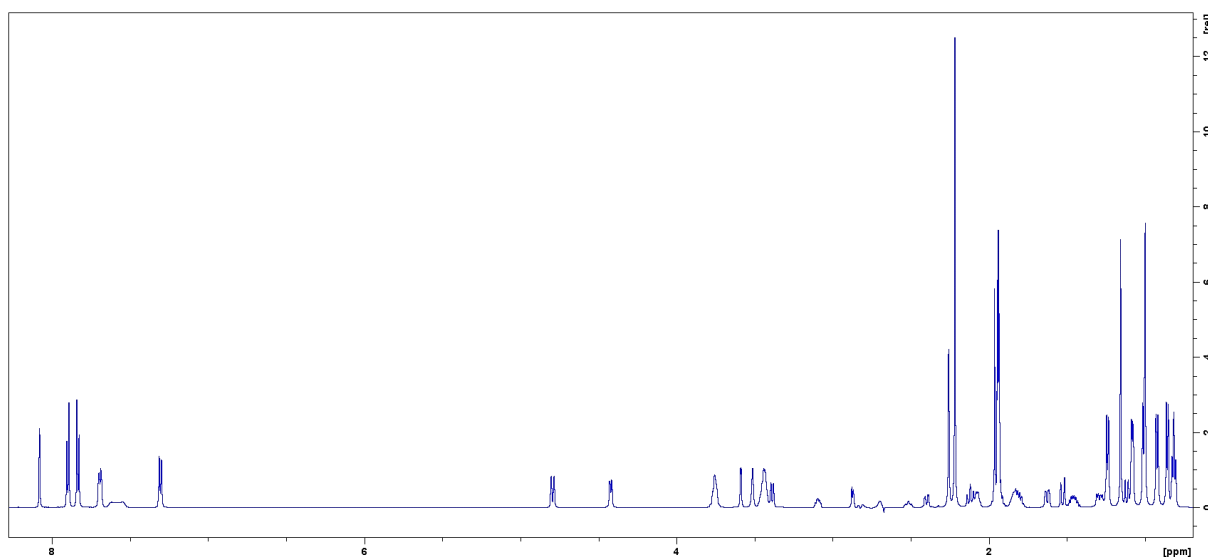
\*signal nije opažen

## 4.2. Strukturna karakterizacija izoliranih spojeva iz reakcijske smjese makrozona 3-8

### 4.2.1. Makrozon 3-8

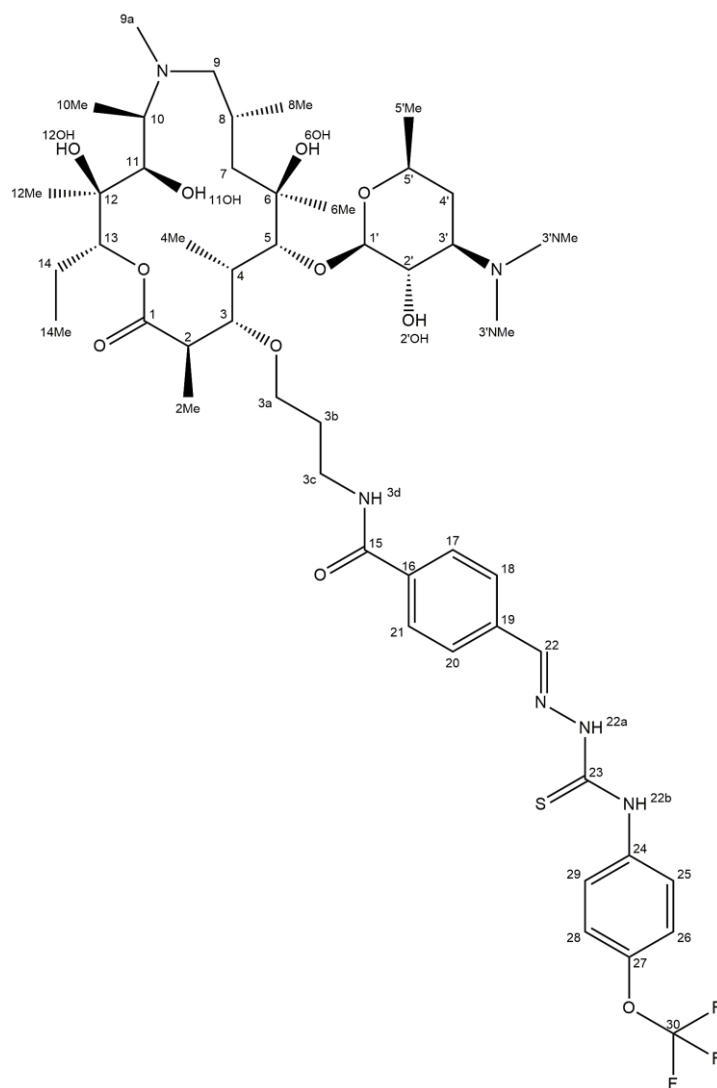
U spektru  $^1\text{H}$  NMR makrozona **3-8** (Slika 18.) prisutan je široki signal pri 7,57 ppm koji odgovara protonu iz amidne veze tiosemikarbazonskog dijela makrozona (H3d, Slika 19.), što potvrđuje uspješnost reakcije amidacije u zadnjem koraku sinteze navedenog makrozona. U spektru COSY (Slika D3.) proton H3d ima korelaciju sa metilenskim protonom H3c, čiji kemijski pomak iznosi 3,44 ppm. Analizom spektra HMBC (Slika 20.) dobiva se dodatna potvrda novosintetiziranog makrozona. U njemu je prisutna korelacija amidnog protona H3d s karbonilnim atomom ugljika C15 pri 166,86 ppm te korelacija s atomom ugljika C3c pri 37,39 ppm. Osim toga, u spektru HMBC prisutna je i korelacija metilenskog protona H3c s kvaternim atomom ugljika C15 (166,86 ppm) i metilenskim atomima ugljika C3a (72,72 ppm) i C3b (30,06 ppm). Signali protona iz benzenskih prstena tiosemikarbazonskog dijela makrozona prisutni su u području od 7,30 ppm do 7,90 ppm, te se analizom spektra HSQC (Slika D4.) mogu pripisati njima odgovarajući atomi ugljika. U spektru  $^1\text{H}$  NMR pri 8,08 ppm prisutan je izraženi singlet koji odgovara protonu iz imino veze (H22, Slika 19.), a njemu odgovarajući

signal atoma ugljika C22 se u spektru HSQC nalazi pri 142,71 ppm. U spektru HMBC prisutna je korelacija protona H22 s atomima ugljika C18 i C20 iz jednog od benzenskih prstena, čiji se signali nalaze pri 127,58 ppm, te korelacija s kvaternim atomom ugljika C19 pri 136,58 ppm. Signali protona iz hidroksilnih skupina koje su vezane na makrolaktonski prsten (6OH, 11OH i 12OH) i šećernoj jedinici desozaminu (2'OH) te signali protona iz amino skupina tiosemikarbazonskog dijela (H22a, H22b) nisu opaženi zbog izmjene s deuterijem iz acetonitrila-d<sub>3</sub> korištenog za snimanje spektara NMR. U tablici 6. prikazani su kemijski pomaci <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR za makrozon **3-8** asignirani u acetonitrilu-d<sub>3</sub>. U spektru MS makrozona **3-8** (Slika D5.), koji je snimljen u pozitivnom ionizacijskom modu, prisutan je signal **molekulskog iona**, [M+H]<sup>+</sup>, pri vrijednosti *m/z* 1013,52 koji potvrđuje novosintetizirani makrozon **3-8**, čija molekulska masa iznosi 1012,52 Da. Navedeni signal molekulskog iona makrozona **3-8** podvrgnut je fragmentaciji, pri čemu su u spektru MS/MS (Slika 21.) detektirani fragmentni ioni spoja na temelju čega je predložen fragmentacijski put makrozona **3-8** (Slika 22.). Analizom snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR te spektara MS potvrđena je struktura makrozona **3-8** prikazana na slici 19.

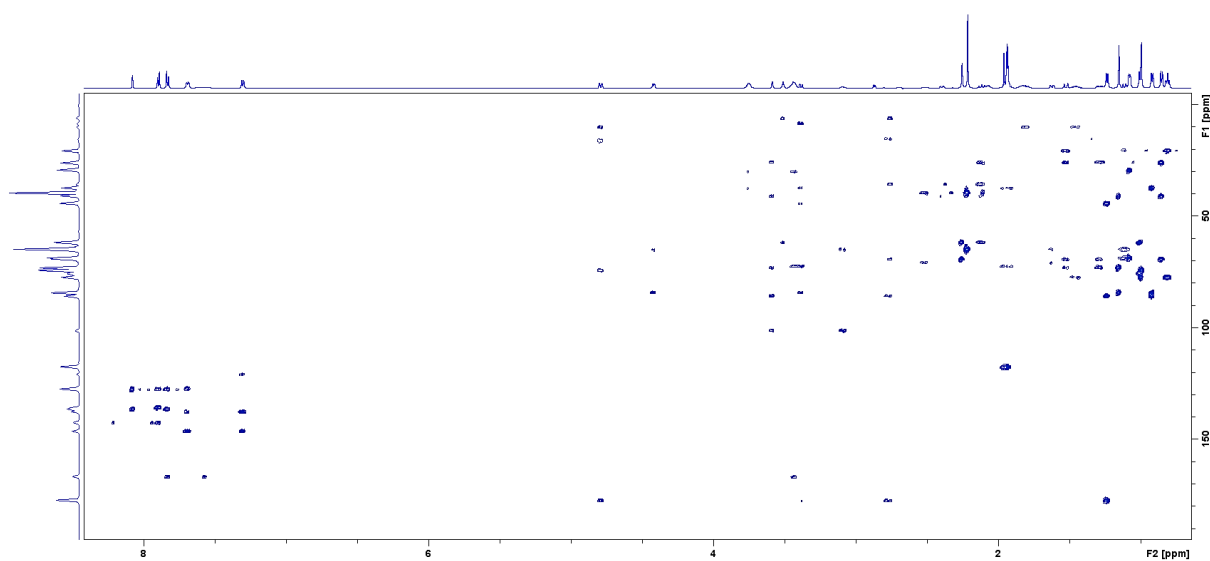


Slika 18. Spektar <sup>1</sup>H NMR makrozona **3-8**.





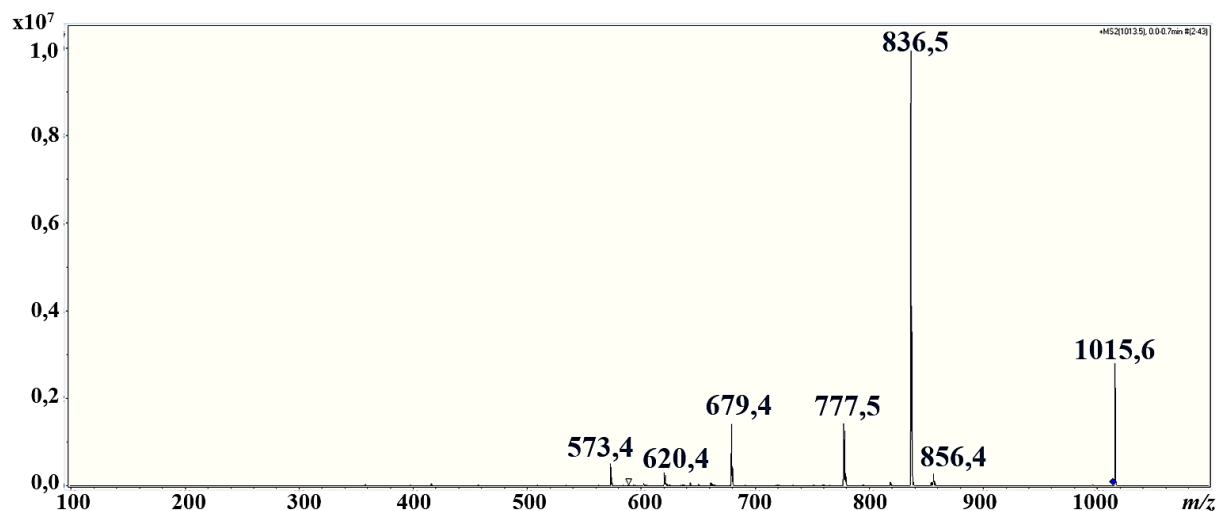
Slika 19. Struktura makrozona 3-8.

Slika 20. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC makrozona 3-8.

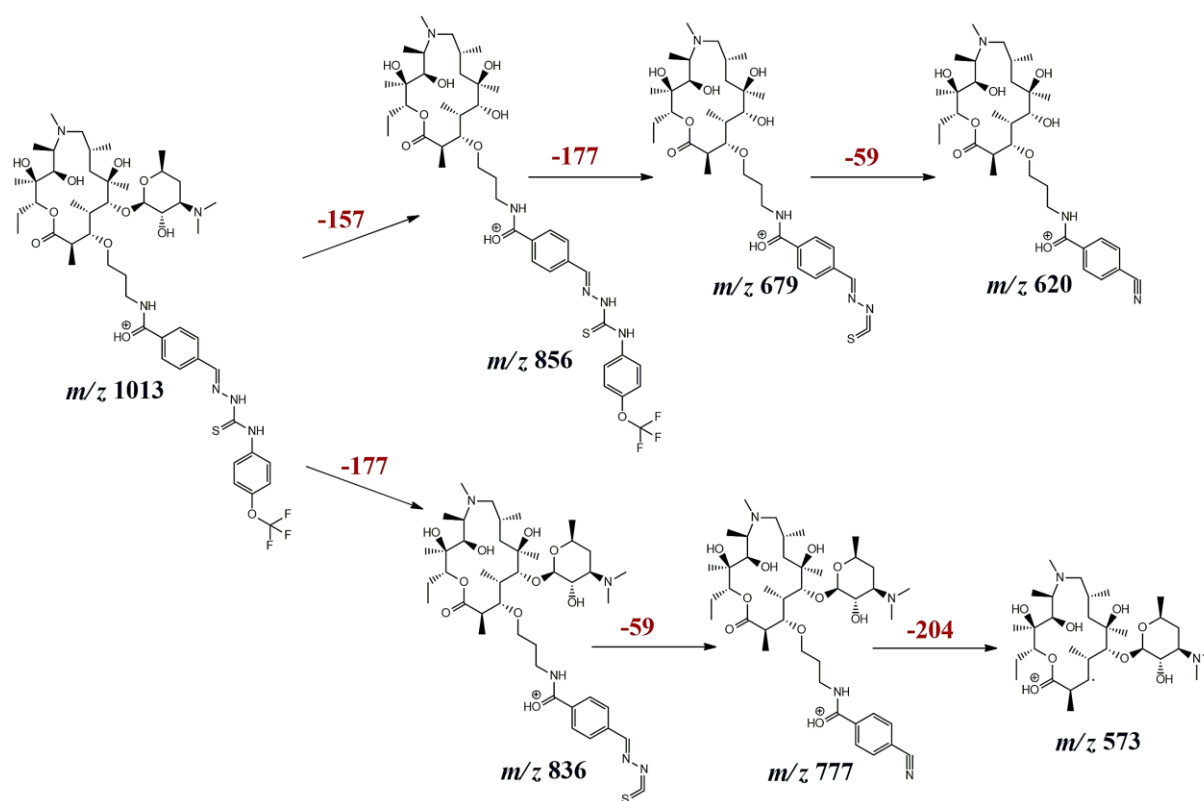
Tablica 6. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za makrozon 3-8 assignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

makrozon 3-8					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	–	177,3	1'	4,42	101,39
2	2,77	44,46	2'	3,09	71,01
2Me	1,24	15,54	2'OH	–*	–
3	3,39	85,93	3'	2,52	64,87
4	2,07	37,38	3'NMe <sub>2</sub>	2,22	39,68
4Me	0,92	8,58	4'eq; 4'ax	1,62; 1,12	29,48
5	3,59	84,28	5'	3,46	68,85
6	–	73,22	5'Me	1,08	20,47
6Me	1,16	26,04	3a	3,76	72,72
6OH	–*	–	3b	1,94	30,06
7eq; 7ax	1,53; 1,29	40,98	3c	3,44	37,39
8	1,84	26,19	3d	7,57	–
8Me	0,85	20,73	15	–	166,86
9eq; 9ax	2,40; 2,12	69,33	16	–	136,01
9a-N	2,26	35,75	17;21	7,83	127,58
10	2,76	61,82	18;20	7,90	127,58
10Me	1,01	6,19	19	–	136,58
11	3,51	75,73	22	8,08	142,71
11OH	–*	–	22a	–*	–
12	–	74,4	22b	–*	–
12Me	0,99	16,31	23	–	–*
12OH	–*	–	24	–	137,82
13	4,79	77,46	25;29	7,69	127,26
14eq; 14ax	1,82; 1,46	20,78	26;28	7,30	121,04
14Me	0,81	10,09	27	–	146,54
			30	–	121,09

\*signal nije opažen



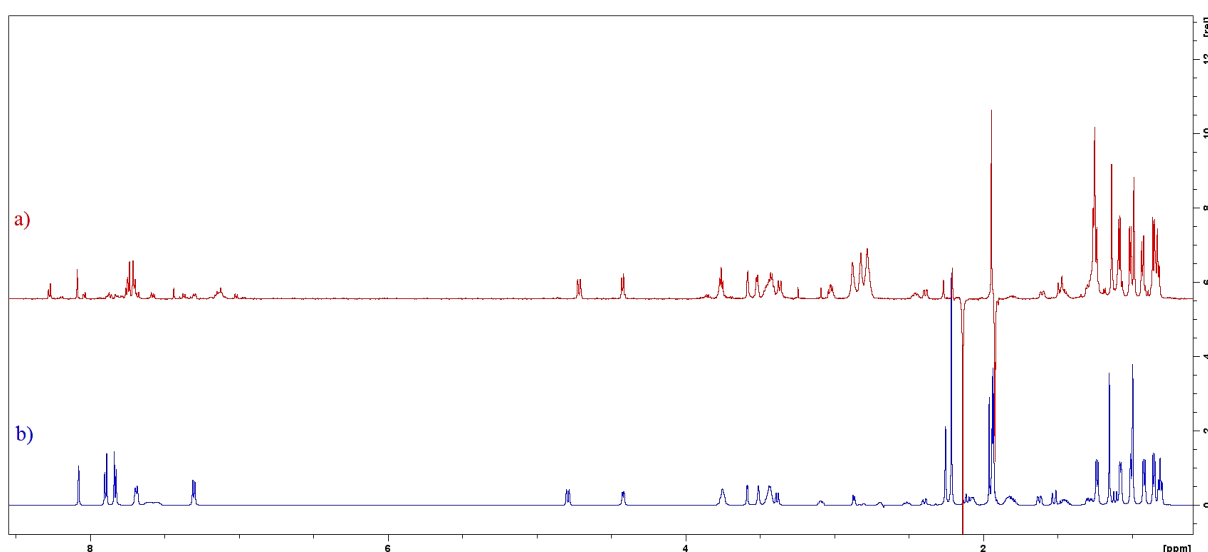
Slika 21. Spektar MS/MS makrozona 3-8.

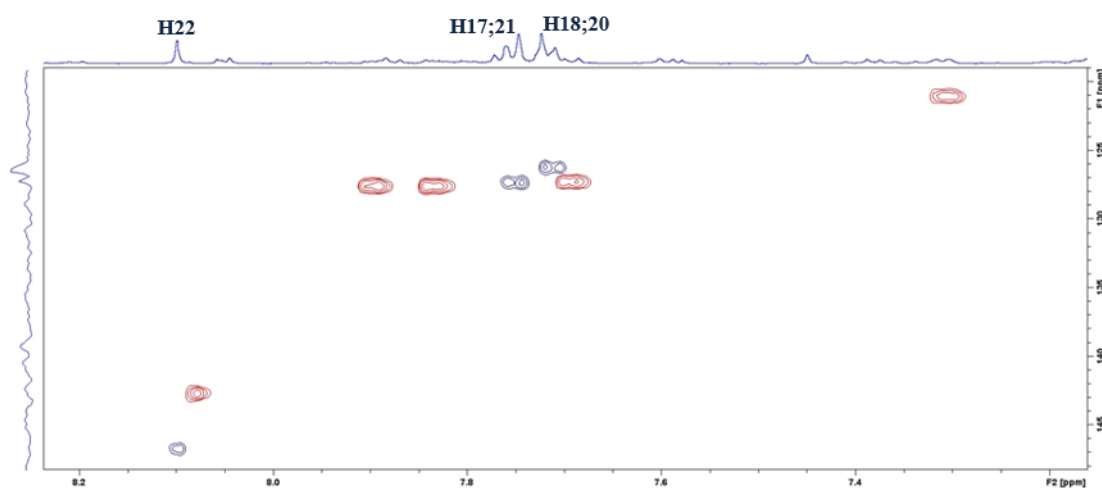


Slika 22. Predloženi fragmentacijski put makrozona 3-8.

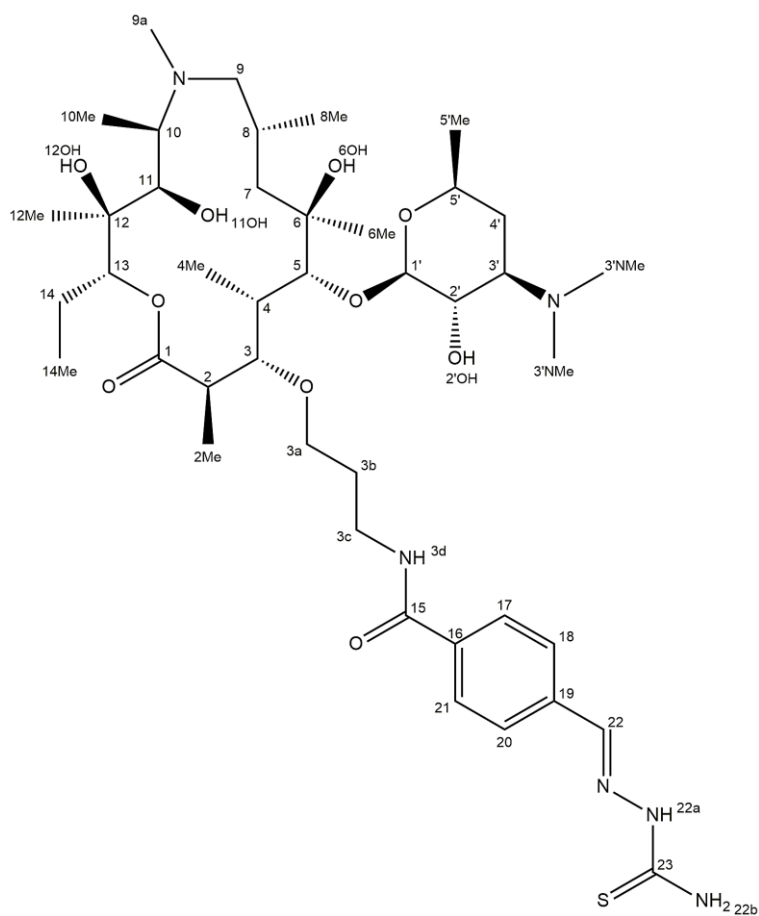
## 4.2.2. Spoj 3-8-a

Usporedbom spektara  $^1\text{H}$  NMR spoja 3-8-a i makrozona 3-8 (Slika 23.) vidljivo je kako se oni ne preklapaju u potpunosti, pri čemu u spektru spoja 3-8-a nisu prisutni signali protona metinskih skupina H25 i H29 te protona H26 i H28 iz jednog od benzenskih prstena tiosemikarbazonskog dijela molekule makrozona 3-8. Osim toga, signal protona iz imino veze (H22, Slika 22.) je odsjenjen u spektru spoja 3-8-a, pri čemu njegov kemijski pomak iznosi 8,10 ppm, dok su signali protona metinskih skupina H17 i H21 te H18 i H20 iz drugog benzenskog prstena u ovom slučaju zasjenjeniji. Usporedbom spektara HSQC spoja 3-8-a i makrozona 3-8 (Slika 24.) vidljivo je da je došlo do odsjenjenja ugljikovog atoma C22, te njegov kemijski pomak iznosi 146,7 ppm u spektru spoja 3-8-a. Kemijski pomak atoma ugljika C17 i C21 iz jednog od benzenskih prstena nije značajno promijenjen u spektru spoja 3-8-a, dok je, s druge strane, kemijski pomak atoma C18 i C20 blago zasjenjen. Analizom spektra HMBC spoja 3-8-a (Slika D6.) nisu uočeni signali kvaternih atoma ugljika C24 (137,8 ppm), C27 (146,5 ppm) i C30 (121,1 ppm). U spektru masa spoja 3-8-a (Slika D7.) vidljivi su signali pri vrijednostima  $m/z$  446,8 i  $m/z$  892,8, za koje se pretpostavlja da odgovaraju aduktu molekule spoja 3-8-a s kalijem, odnosno dvostruko nabijenom ionu s kalijem  $[\text{M}/2+\text{K}]^{2+}$ . Na temelju analize snimljenih spektara NMR i MS spoja 3-8-a može se pretpostaviti da navedeni spoj ne sadrži (trifluormetoksi)benzen u svojoj strukturi, te je predložena struktura prikazana na slici 25. U dodatku se nalazi tablica s kemijskim pomacima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj 3-8-a (Tablica D1.).

Slika 23. Spektar  $^1\text{H}$  NMR a) spoja 3-8-a i b) makrozona 3-8.



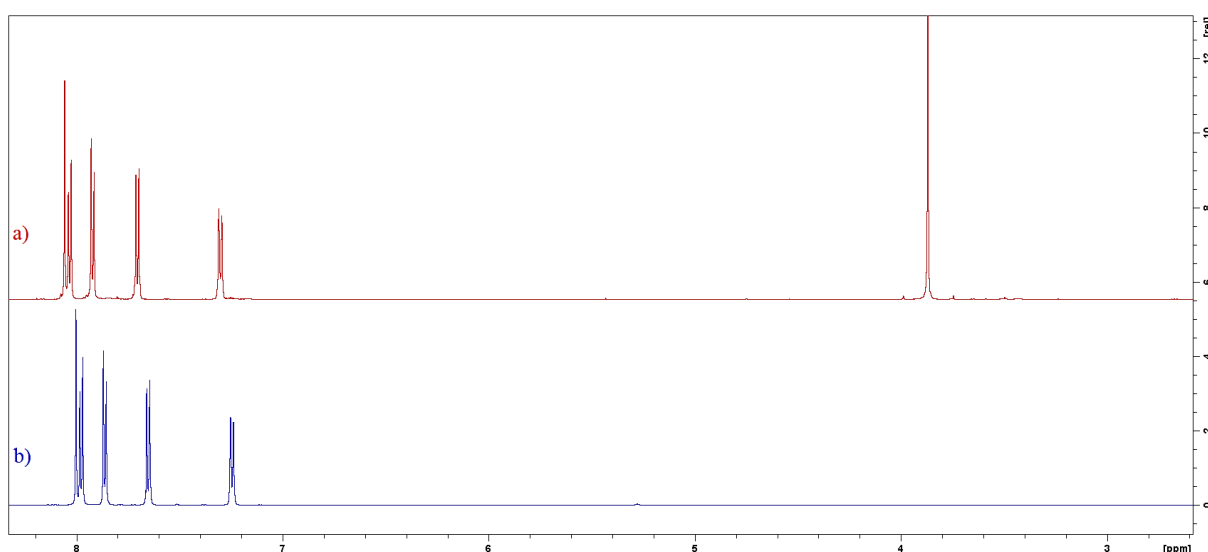
Slika 24. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja **3-8-a** (plave konture) i makrozona **3-8** (crvene konture).

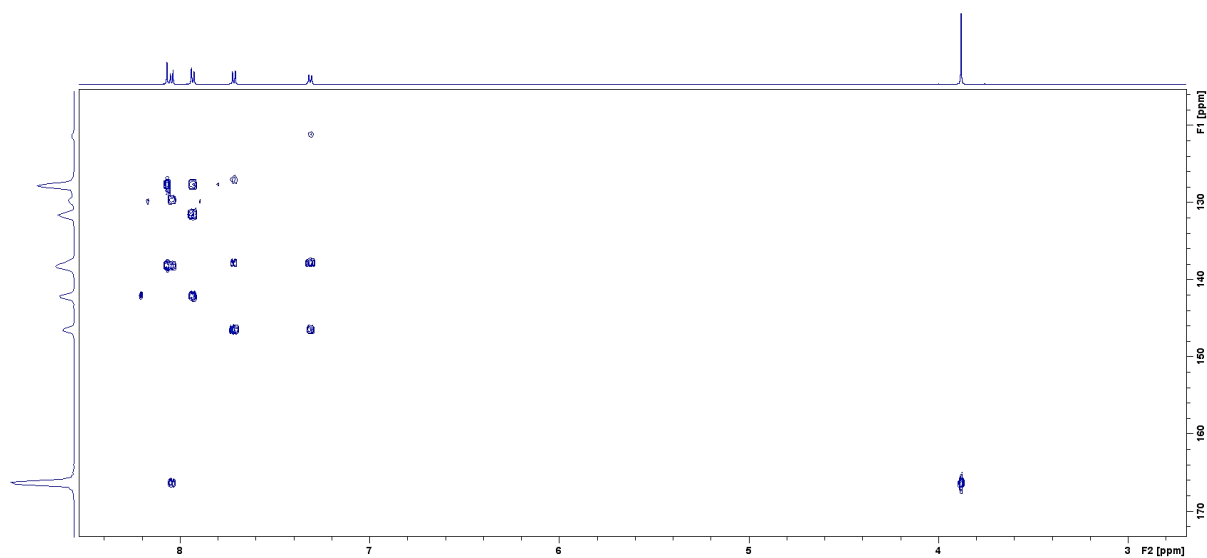
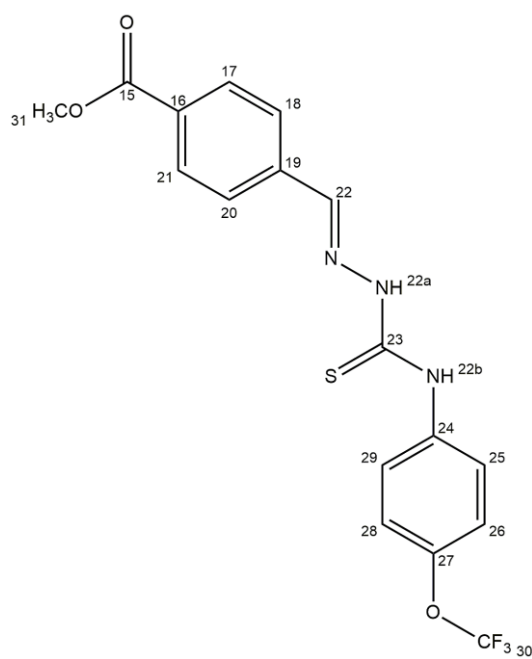


Slika 25. Predložena struktura spoja **3-8-a**.

4.2.3. Spoj **3-8-b**

Analizom spektra  $^1\text{H}$  NMR spoja **3-8-b** vidljivo je da su prisutni signali usporedivi sa signalima derivata tiosemikarbazida **P2-8** (Slika 26.). U spektru su, dakle, prisutni signali protona benzenskih prstena, čiji se kemijski pomaci mogu odrediti analizom spektara COSY (Slika D8.) i HSQC (Slika D9.). Signal pri 8,04 ppm odgovara protonima H17 i H21, dok signal pri 7,93 ppm pripada protonima H18 i H20 iz jednog benzenskog prstena, odnosno signal pri 7,71 ppm pripada protonima H25 i H29, te signal od 7,31 ppm odgovara protonima H26 i H28 iz drugog benzenskog prstena. Kemijski pomaci ugljikovih atoma u benzenskim prstenima iznose 129,83 za C17 i C21, te 127,64 ppm za C18 i C20, odnosno 127,14 za C25 i C29, te 121,03 za C26 i C28. U spektru spoja **3-8-b** dodatno je prisutan izražen singlet pri 3,88 ppm, za koji je moguće da odgovara metoksi skupini (H31, Slika 28.). U spektru HSQC vidljiva je korelacija protona H31 s odgovarajućim ugljikovim atomom C31 pri 51,87 ppm, a u spektru HMBC (Slika 27.) prisutna je korelacija navedenog protona s karbonilnim ugljikovim atomom C15, čiji je signal prisutan pri 166,30 ppm. Protoni sekundarnih amino skupina (H22a i H22b) također nisu opaženi zbog izmjene s deuterijem iz acetonitrila- $\text{d}_3$  korištenog prilikom snimanja spektara NMR. U tablici D2. prikazani su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-b** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ . U spektru masa (Slika D10.) prisutan je signal molekulskog iona pri  $m/z$  398,9 što odgovara masi metilnog estera, odnosno spoja **3-8-b**. Na temelju analize snimljenih spektara NMR i MS predložena je struktura spoja **3-8-b** prisutnog u reakcijskoj smjesi **3-8 (2)** (Slika 28.).

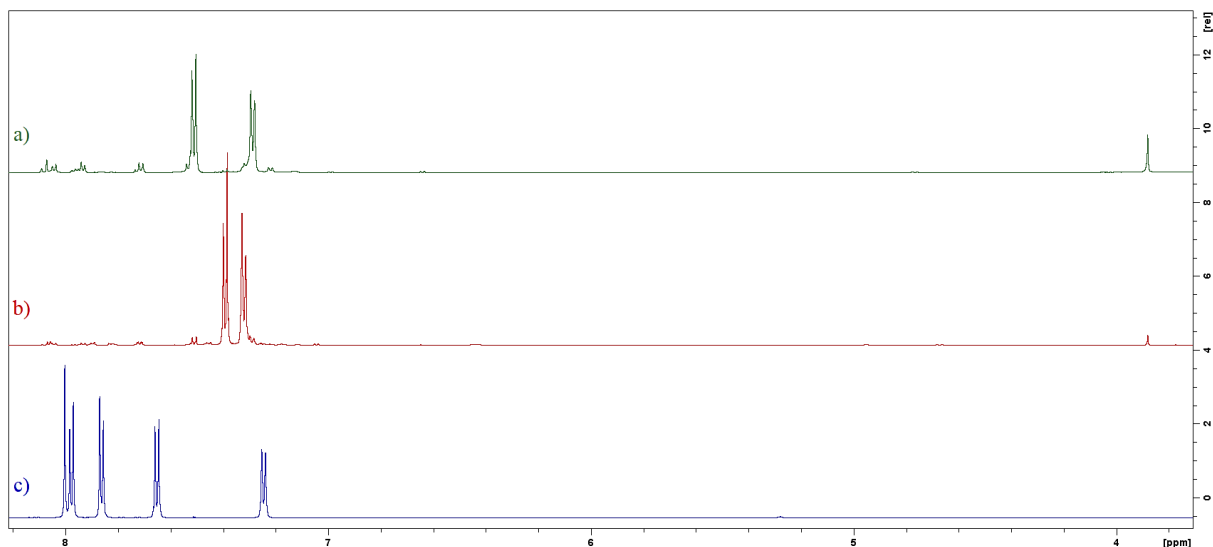
Slika 26. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$  NMR a) spoja **3-8-b** i b) spoja **P2-8**.

Slika 27. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **3-8-b**.Slika 28. Predložena struktura spoja **3-8-b**.

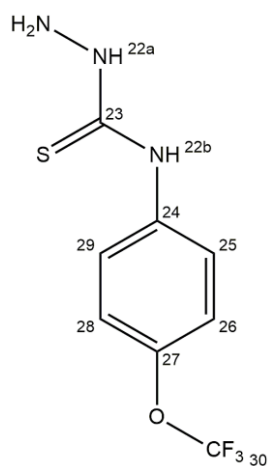
#### 4.2.4. Spojevi 3-8-c i 3-8-d

Usporedbom spektara  $^1\text{H}$  NMR spojeva **3-8-c** i **3-8-d** sa spektrom  $^1\text{H}$  NMR spoja **P2-8** (Slika 29.), vidljivo je da se radi o onečišćenjima tiosemikarbazonskog porijekla. U spektru  $^1\text{H}$  spoja **3-8-c** prisutna su dva dubleta pri 7,51 ppm i 7,29 ppm, za koje je pretpostavljeno da odgovaraju protonima H25 i H29, odnosno H26 i H28, kao kod spoja **P2-8** (Tablica 5., Slika 15.). Dodatna potvrda navedenoj pretpostavci dobivena je analizom spektra HSQC spoja **3-8-c** (Slika D11.), u kojem su prisutne korelacije navedenih protona s ugljikovim atomima pri 126,85 ppm, odnosno 121,55 ppm, čije se vrijednosti također dobro slažu sa kemijskim pomacima istih atoma ugljika kod spoja **P2-8**. Nadalje, u spektru su prisutni i signali aromatskih protona H17, H21, H18 i H20, te protona H31 iz metoksi skupine. Međutim, integrali navedenih protona su 10 puta manji u odnosu na integrale protona iz drugog benzenskog prstena, što znači da ne pripadaju istoj molekuli. Stoga je u strukturi spoja **3-8-c** prisutan samo jedan benzenski prsten koji je 1,4-disupstituiran, što se može zaključiti na temelju multipletnosti signala protona H25 i H29 te H26 i H28. U spektru HMBC (Slika D12.) prisutni su signali kvaternih ugljikovih atoma C24 (137,59 ppm) i C27 (146,52 ppm). S obzirom da su vrijednosti kemijskih pomaka navedenih kvaternih atoma ugljika u dobrom slaganju s kemijskim pomacima istih atoma kod spoja **P2-8**, može se pretpostaviti da su u strukturi spoja **3-8-c** prisutni isti supstituenti. Tako je pretpostavljeno da je na atom C27 vezana skupina  $-\text{OCF}_3$ , dok je na atom C24 vezana skupina  $-\text{NH}-\text{C}=\text{S}-\text{NH}-\text{NH}_2$ . Signali protona amino skupina (NH i  $\text{NH}_2$ ) nisu opaženi zbog izmjene protona s deuterijem iz acetonitrila- $\text{d}_3$  korištenog za snimanje spektara NMR. U spektru MS (Slika D13.) spoja **3-8-c** nije prisutan signal molekulskog iona, ali je prisutan signal pri  $m/z$  335, za koji je moguće da odgovara aduktu molekule spoja **3-8-c** s izopropanolom i natrijem,  $[\text{M} + i\text{-PrOH} + \text{Na} + \text{H}]^+$ . Predložena struktura spoja **3-8-c** prikazana je na slici 30, a tablica s kemijskim pomacima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR asigniranima u acetonitrilu- $\text{d}_3$  nalazi se u Dodatku (Tablica D3.). Struktura spoja **3-8-c** odgovara strukturi međuprodukta **P1-8** korištenog za sintezu spoja **P2-8** (Slika 31.).

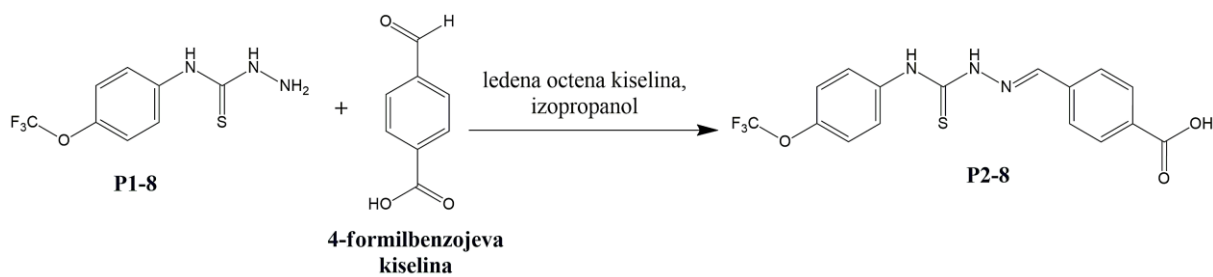




Slika 29. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$  NMR a) spoja **3-8-c**, b) spoja **3-8-d** i c) spoja **P2-8**.

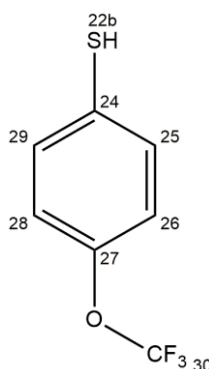


Slika 30. Predložena struktura spoja **3-8-c**.



Slika 31. Shematski prikaz sinteze spoja **P2-8**.

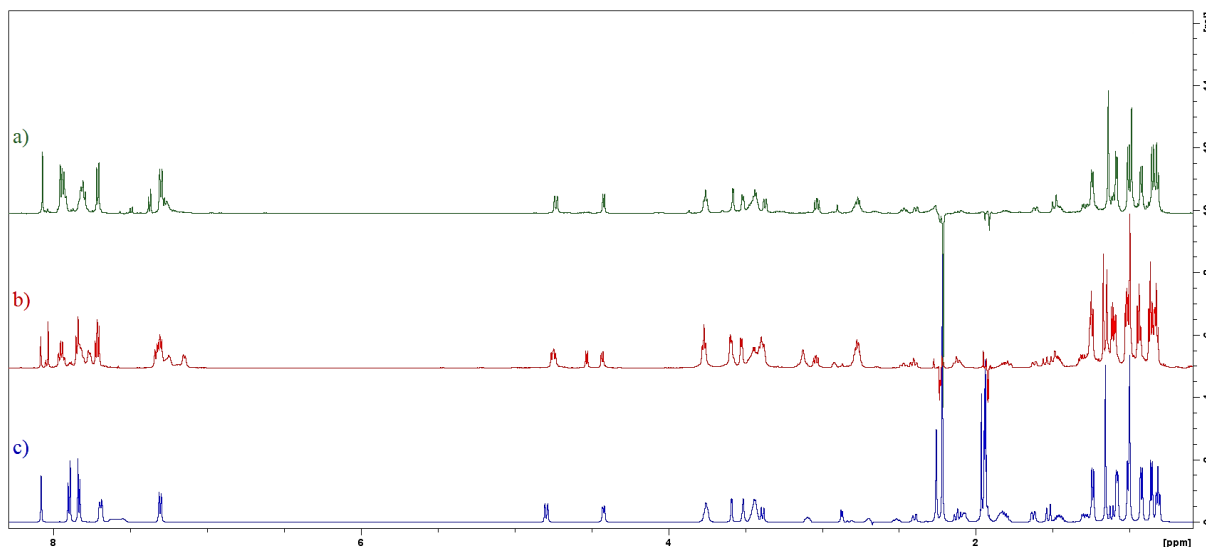
U spektru  $^1\text{H}$  spoja **3-8-d** također su prisutna dva dubleta pri 7,39 ppm i 7,32 ppm, koji u spektru HSQC (Slika D14.) imaju korelacije s atomima ugljika pri 127,52 ppm i 122,45 ppm. Pretpostavljeno je da se radi o atomima H25 i H29 te H26 i H28, odnosno C25 i C29 te C26 i C28 zbog dobrog slaganja s kemijskim pomacima istih atoma u strukturama spojeva **3-8-c** (Tablica D3.) i **P2-8** (Tablica 5.). Stoga je i spoj **3-8-d** također 1,4-disupstituirani benzen. U spektru HMBC spoja **3-8-d** (Slika D15.) također su prisutni signali kvaternih atoma ugljika C24 i C27. Kemijski pomak atoma ugljika C27 iznosi 147,59 ppm, što je u dobrom slaganju s kemijskim pomakom navedenog atoma u spektru spoja **3-8-c** (146,52 ppm), međutim atom ugljika C24 je u spektru spoja **3-8-d** značajno zasjenjen u odnosu na navedeni atom u spektru spoja **3-8-c**, te se njegov signal nalazi pri 130,19 ppm. Stoga se za supstituente može pretpostaviti da je na atomu C27 vezana skupina  $-\text{OCF}_3$ , dok drugi supstituent, koji je vezan na atom C24, treba imati odsjenjujući učinak, što ima skupina  $-\text{SH}$ . Predložena struktura spoja **3-8-d** prikazana je na slici 32, a tablica s kemijskim pomacima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR asigniranima u acetonitrilu- $d_3$  nalazi se u Dodatku (Tablica D4.). Analizom spektra MS (Slika D16.) nije pronađen signal molekulskog iona, koji bi trebao imati vrijednost  $m/z$  195.



Slika 32. Predložena struktura spoja **3-8-d**.

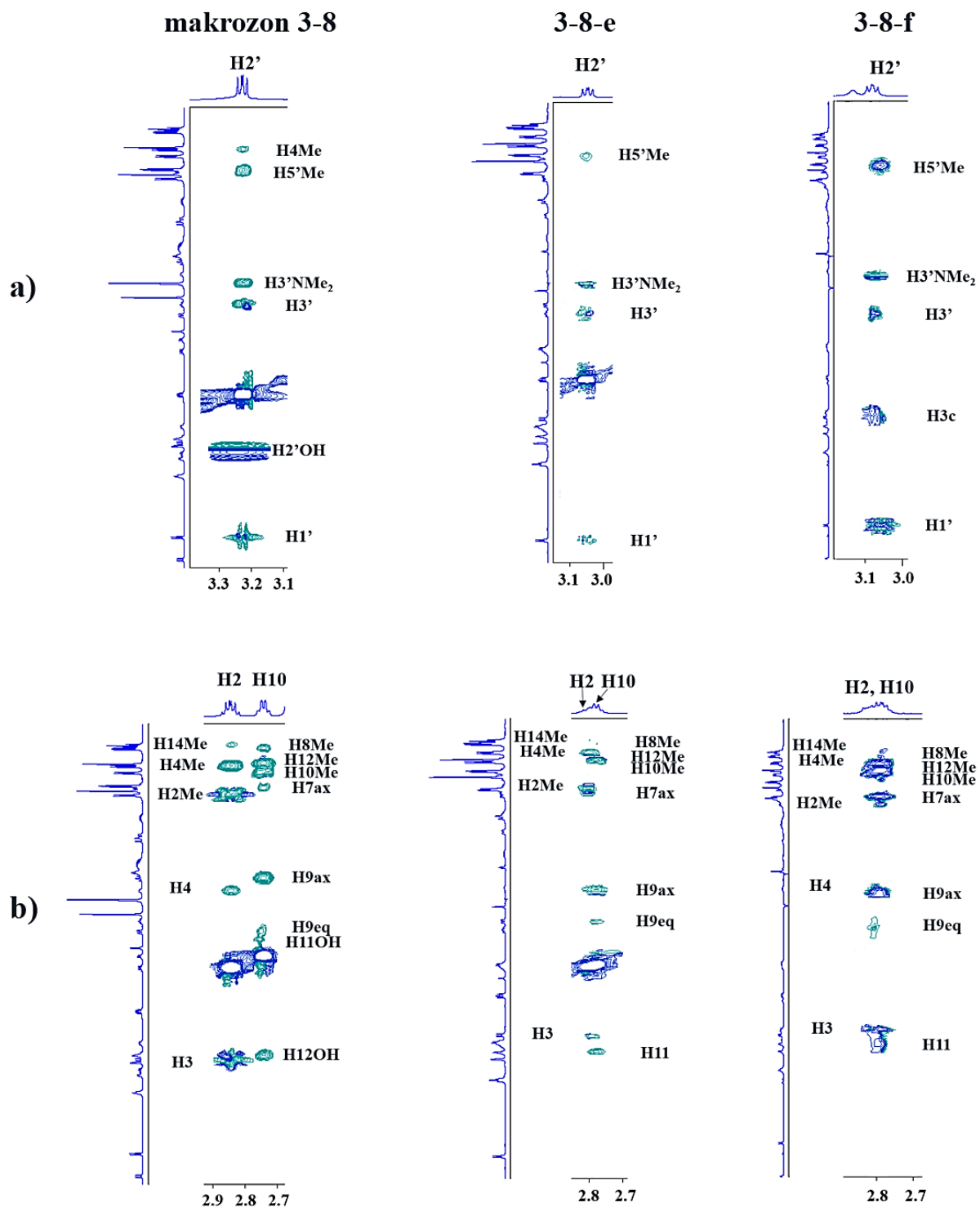
#### 4.2.5. Spojevi **3-8-e** i **3-8-f**

Usporedbom spektara  $^1\text{H}$  NMR makrozona **3-8** te spojeva **3-8-e** i **3-8-f** (Slika 33.) vidljivo je kako se oni gotovo u potpunosti preklapaju, te se na temelju analize snimljenih spektara NMR može pretpostaviti da su spojevi **3-8-e** i **3-8-f** diastereomeri makrozona **3-8**. Snimljeni spektri NMR (COSY, HSQC i HMBC) te tablice s kemijskim pomacima  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR asigniranima u acetonitrilu- $d_3$  za spojeve **3-8-e** i **3-8-f** nalaze se u Dodatku (Slika D17. – D22.; Tablice D5. i D6.). U spektrima MS spojeva **3-8-e** i **3-8-f** također je prisutan isti signal molekulskog iona  $[\text{M}+\text{H}]^+$  pri  $m/z$  1013,52 (Slika D23 i D24.).



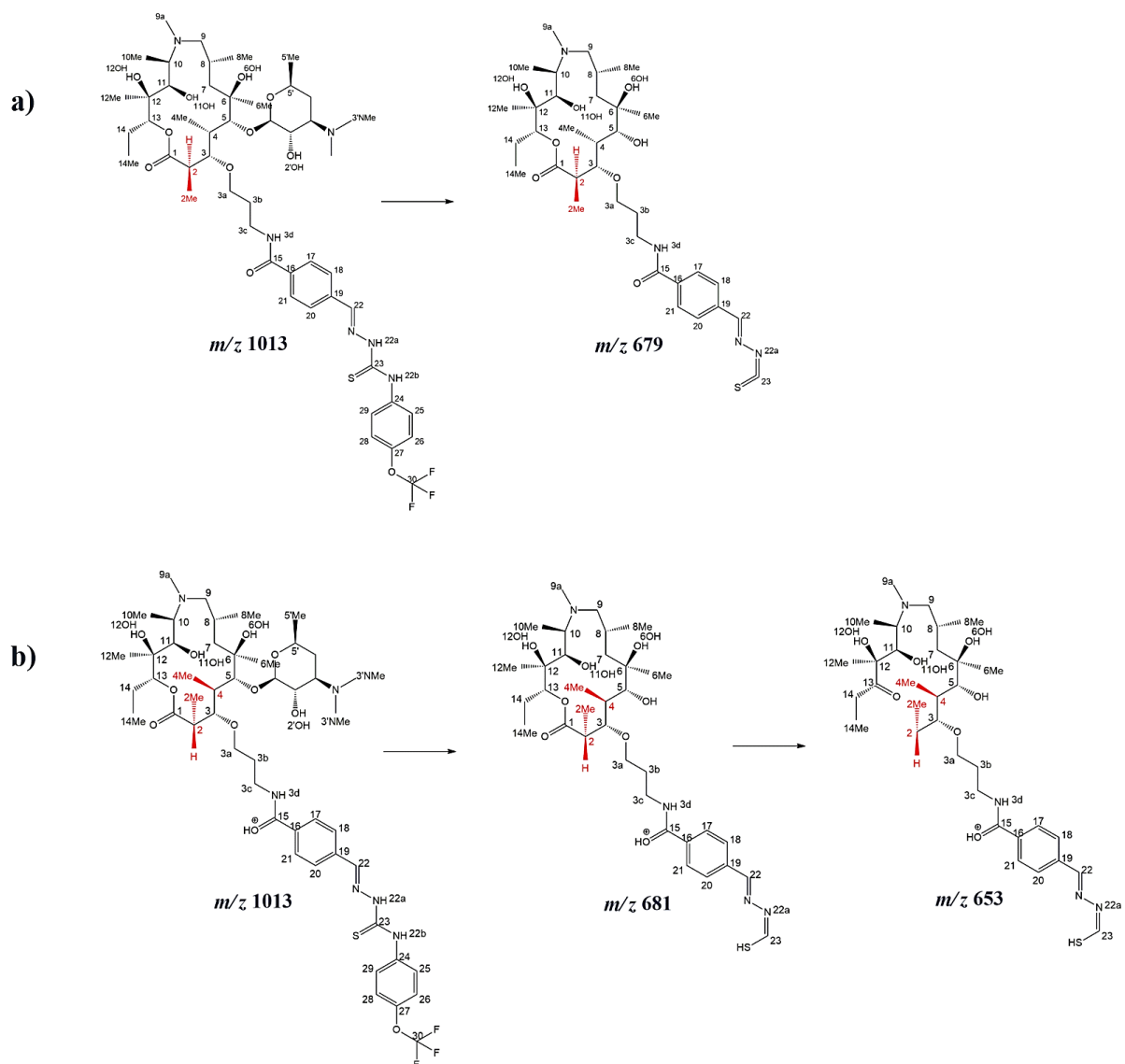
Slika 33. Spektar  $^1\text{H}$  NMR a) spoja **3-8-e**, b) spoja **3-8-f** i c) makrozona **3-8**.

Kako bi se odredilo o kojim se diastereomerima radi, snimljeni su spektri NOESY za makrozon **3-8** (Slika D25.), te spojeve **3-8-e** (Slika D26.) i **3-8-f** (Slika D27.). Za spojeve **3-8-e** i **3-8-f** također su snimljeni i spektri MS/MS (Slika D28. i D29.) kako bi se uočile moguće razlike u fragmentaciji u odnosu na makrozon **3-8**. Analizom spektara NOESY makrozona **3-8** i spoja **3-8-e** uočene su razlike u korelacijama atoma  $\text{H}2'$ ,  $\text{H}10$  i  $\text{H}2$  (Slika 34.). U spektru makrozona **3-8** prisutne su korelacije atoma  $\text{H}2'$  s atomima  $\text{H}1'$ ,  $\text{H}3'$ ,  $\text{H}3'\text{NMe}_2$ ,  $\text{H}5'\text{Me}$  i  $\text{H}4\text{Me}$ , dok su u spektru spoja **3-8-e** prisutne sve navedene korelacije osim s  $\text{H}4\text{Me}$ . Također nije prisutna ni korelacija atoma  $\text{H}2'$  s  $\text{H}2'\text{OH}$ , jer u ovom slučaju nije opažen signal atoma  $\text{H}2'\text{OH}$  zbog izmjene protona s deuterijem iz acetonitrila- $\text{d}_3$  korištenog prilikom snimanja spektra. S obzirom na neprisutnost navedene korelacije s  $\text{H}4\text{Me}$ , pretpostavljena je drugačija orijentacija atoma  $\text{H}2'$  u strukturi spoja **3-8-e**. Nadalje, u spektru makrozona **3-8** uočene su korelacije atoma  $\text{H}10$  s atomima  $\text{H}9$ ,  $\text{H}7$ ,  $\text{H}10\text{Me}$ ,  $\text{H}12\text{Me}$ ,  $\text{H}8\text{Me}$ ,  $\text{H}12\text{OH}$  i  $\text{H}11\text{OH}$ , dok korelacija s atomom  $\text{H}11$  nije prisutna. U spektru spoja **3-8-e** prisutne su sve navedene korelacije, osim s atomima  $\text{H}12\text{OH}$  i  $\text{H}11\text{OH}$ . Nadalje, u spektru NOESY makrozona **3-8** prisutne su korelacije atoma  $\text{H}2$  s atomima  $\text{H}3$ ,  $\text{H}4$ ,  $\text{H}2\text{Me}$ ,  $\text{H}4\text{Me}$  i  $\text{H}14\text{Me}$ , dok su u spektru NOESY spoja **3-8-e** prisutne sve navedene korelacije, osim s atomom  $\text{H}4$ .



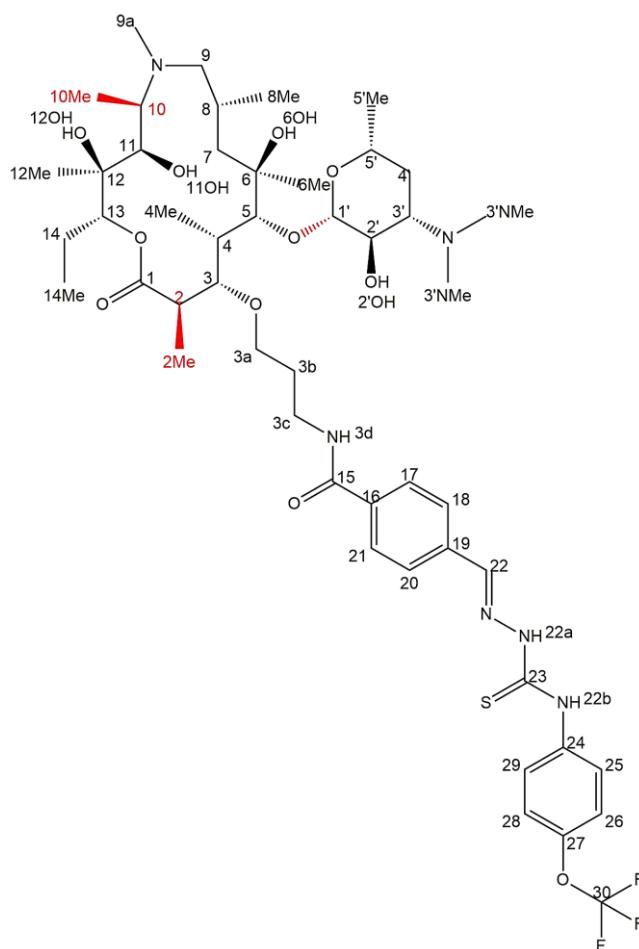
Slika 34. Usporedba korelacija u spektru NOESY makrozona 3-8 te spojeva 3-8-e i 3-8-f za a) protone H2' i b) protone H2 i H10.

Izostanak korelacije atoma H2 s atomom H4 u spektru NOESY spoja **3-8-e** može se objasniti analizom spektara MS/MS (Slika D28.). U slučaju makrozona **3-8** fragmentacijom molekuskog iona vrijednosti  $m/z$  1013 nastaje ion-fragment čija vrijednost  $m/z$  iznosi 679. S druge strane, u slučaju spoja **3-8-e** fragmentacijom molekuskog iona vrijednosti  $m/z$  1013 nastaje ion fragment vrijednosti  $m/z$  681, čiji je intenzitet signala jednak intenzitetu signala molekuskog iona, te ion-fragment pri  $m/z$  653. Ukoliko je konfiguracija protona H2 u strukturi makrozona **3-8** kako je prikazano na slici 35a, tada fragmentacijom molekuskog iona ( $m/z$  1013) nastaje ion-fragment vrijednosti  $m/z$  679 kao posljedica gubitka (trifluormetoksi)benzena i desozamina. Također se pretpostavlja da je navedeni ion-fragment ( $m/z$  679) stabiliziran vodikovom vezom između atoma H2 i atoma kisika na položaju 3 makrolaktonskog prstena. Ukoliko je konfiguracija protona H2 u strukturi spoja **3-8-e** ona prikazana na slici 35b, tada fragmentacijom molekuskog iona ( $m/z$  1013) nastaje ion-fragment vrijednosti  $m/z$  681, također kao posljedica gubitka (trifluormetoksi)benzena i desozamina. Međutim, nastali ion-fragment je manje stabilan od ion-fragmenta vrijednosti  $m/z$  679, zbog nemogućnosti stvaranja vodikove veze između protona H2 i atoma kisika na položaju 3 makrolaktonskog prstena, uslijed njihove različite orijentacije. Ion-fragment vrijednosti  $m/z$  679 stoga se dalje lakše cijepa, pri čemu nastaje ion-fragment vrijednosti  $m/z$  653 (Slika 35b.). Na temelju analize NOESY korelacija predložene su strukture makrozona **3-8** i njegovog dijastereomera **3-8-e** (Slika 36.).



Slika 35. Značajni ioni-fragменти u spektru MS/MS: a) makrozona 3-8 i b) spoja 3-8-e.

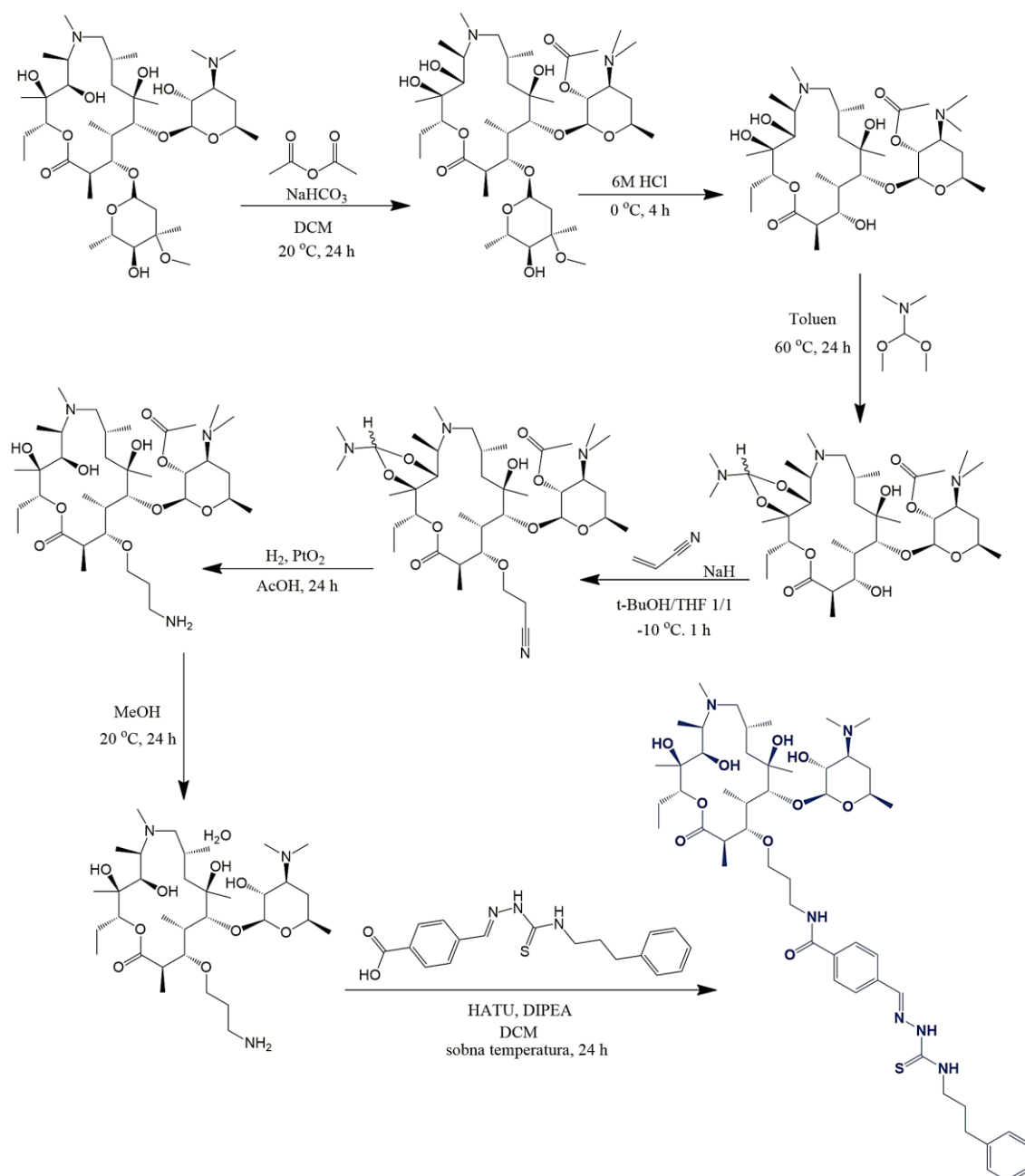


Slika 37. Predložena struktura spoja **3-8-f**.



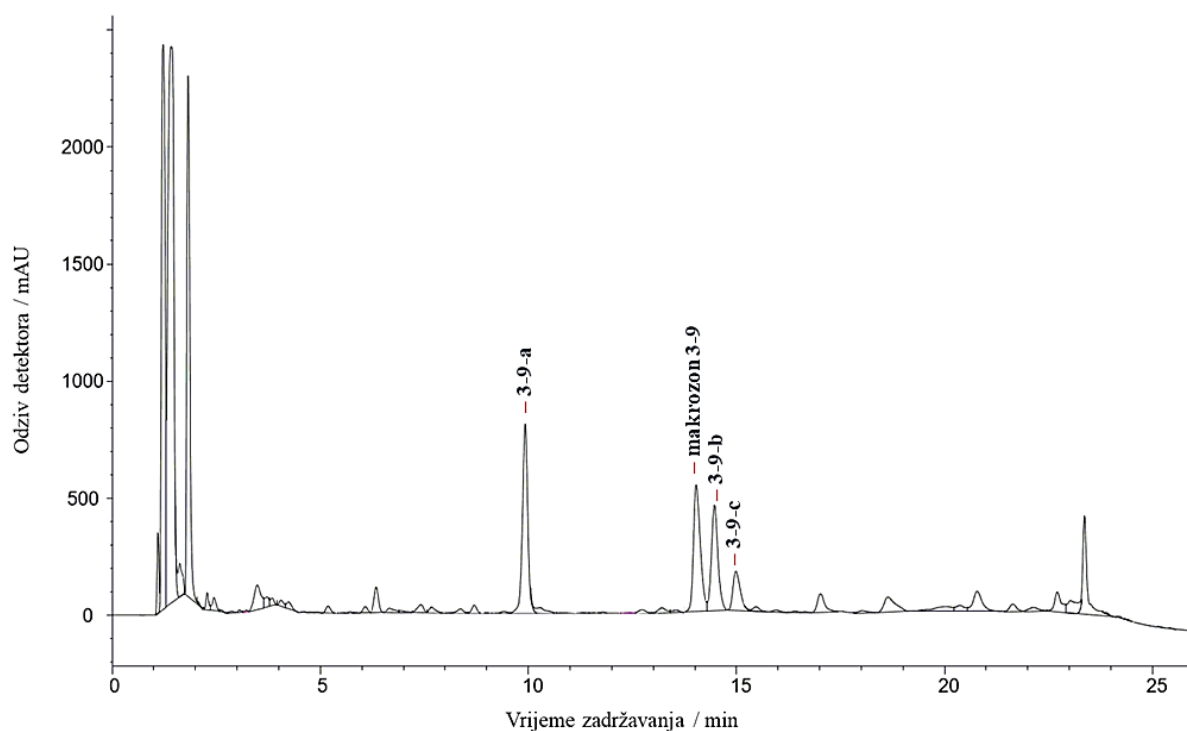
### 4.3. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-9

Sinteza makrozona 3-9 provedena je prema shemi na slici 38.



Slika 38. Shematski prikaz sinteze spoja 3-9.

Reakcijska smjesa makrozona **3-9** analizirana je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, pri čemu je kromatografsko odjeljivanje postignuto na kromatografskoj koloni Waters XBridge® Phenyl dimenzija 4,6 mm × 150 mm i promjera čestica punila 3,5 μm, uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila i amonijačnog pufera množinske koncentracije 10 mmol dm<sup>-3</sup> pri pH 10 (Tablica 2.). Reprezentativni kromatogram reakcijske smjese makrozona **3-9** prikazan je na slici 39.



Slika 39. Reprezentativni kromatogram reakcijske smjese makrozona **3-9** masene koncentracije 23,26 mg mL<sup>-1</sup>.

Kvantitativna analiza reakcijske smjese makrozona **3-9** provedena je metodom normalizacije pikova<sup>79</sup> u kromatogramu reakcijske smjese uz pomoć programskog paketa *Agilent OpenLab CDS ChemStation*. U tablici 7. prikazani su dobiveni rezultati normalizacije pikova za izolirane komponente iz reakcijske smjese makrozona **3-9**. Osim novosintetiziranog makrozona **3-9**, iz reakcijske su smjese izolirane dodatne komponente nepoznate strukture, koje su imenovane kombinacijom oznake **3-9** i malog slova abecede (**a** – **c**) prema redu eluiranja s kromatografske kolone (Slika 39.). Vrijeme zadržavanja makrozona **3-9** je 14,672 min, a njegov udio u reakcijskoj smjesi iznosi samo 5,31 %. Spoj **3-9-a** ima vrijeme zadržavanja 10,205 min, te njegov udio u reakcijskoj smjesi iznosi 7,56 %. Spoj **3-9-b** eluira s kolone pri  $t_R$  14,872 min, a

njegov udio u reakcijskoj smjesi je 6,39 %. Spoj **3-9-c** ima vrijeme zadržavanja 15,756 min i 2,59 % udjela u reakcijskoj smjesi.

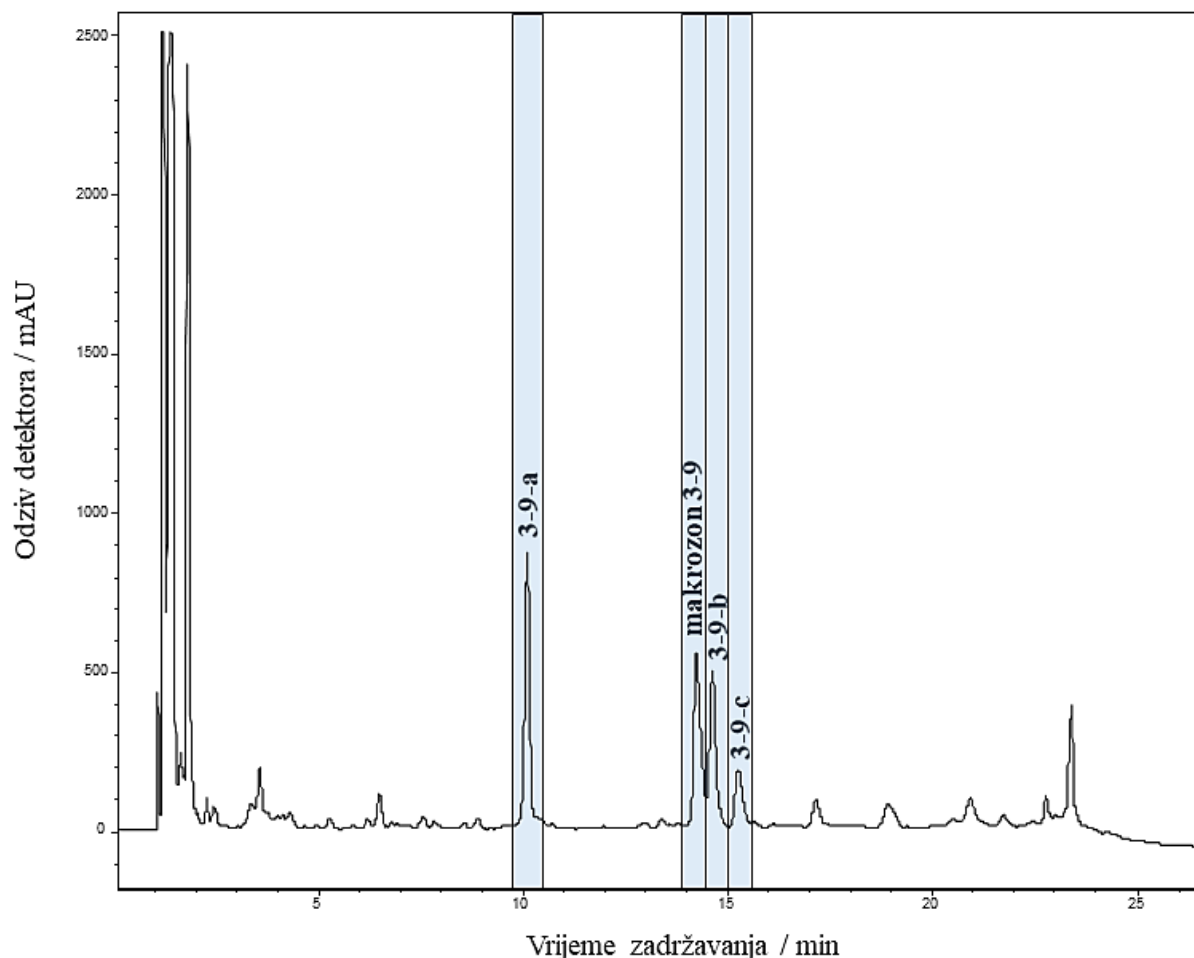
Tablica 7. Udio komponenata u reakcijskoj smjesi makrozona **3-9** korištenjem metode normalizacije pikova.

Spoj	Vrijeme zadržavanja / min	Površina ispod kromatografske krivulje / mAU s	% Površine
<b>3-9-a</b>	10,205	6086,2	7,56
<b>makrozon 3-9</b>	14,672	4274,9	5,31
<b>3-9-b</b>	14,872	5142,1	6,39
<b>3-9-c</b>	15,756	2083,1	2,59

Iz reakcijske smjese makrozona **3-9** uspješno su ekstrahirane izabrane komponente – makrozon **3-9** te spojevi **3-9-(a – c)** (Slika 40.). Navedeni spojevi ekstrahirani su višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbense punjene nepokretnom fazom C18, pri čemu je broj ukoncentriravanja iznosio od 50 do 100 puta. Mase ekstrahiranih spojeva prikazane su u tablici 8. Nakon ekstrakcije odabranih komponenata pomoću tehnike HPLC-SPE, spojevi su eluirani u 3 mm cjevčice NMR korištenjem acetonitrila- $d_3$  te su snimljeni sljedeći spektri:  $^1\text{H}$ , COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC i HMBC za svaki spoj, a za neke su spojeve snimljeni i spektri NOESY. Također su snimljeni i spektri masa.

Tablica 8. Mase ekstrahiranih spojeva iz reakcijske smjese makrozona **3-9**.

Spoj	<i>m</i> / mg
<b>3-9-a</b>	0,36
<b>makrozon 3-9</b>	0,31
<b>3-9-b</b>	0,40
<b>3-9-c</b>	0,43

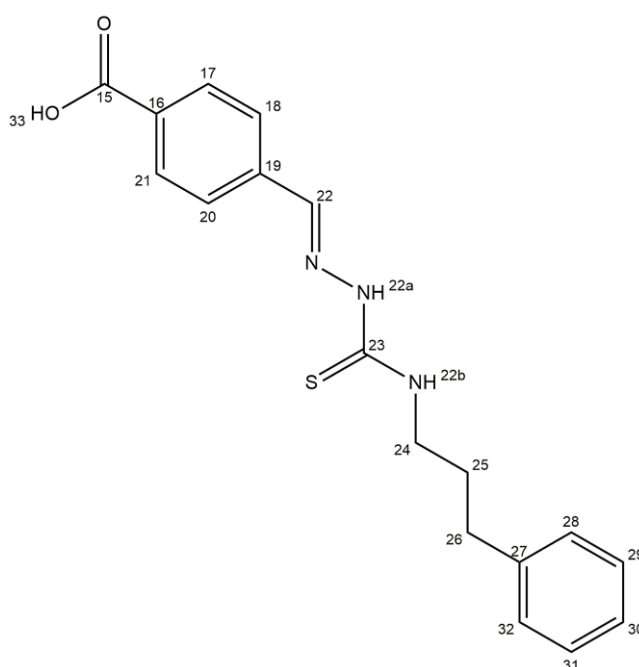


Slika 40. Kromatogram LC-SPE s izoliranim komponentama iz reakcijske smjese **3-9**.

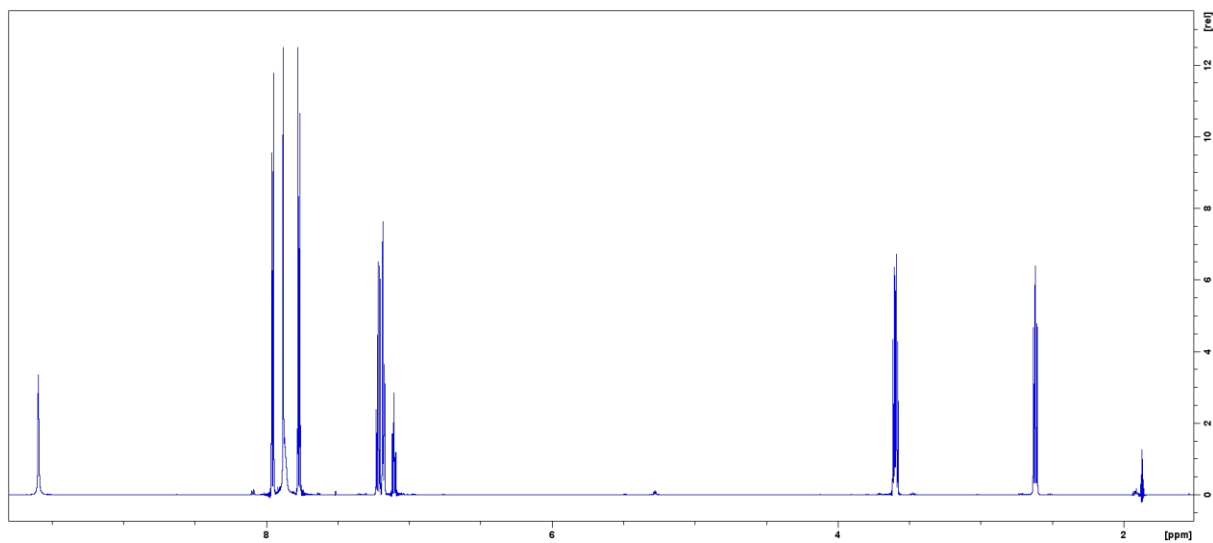
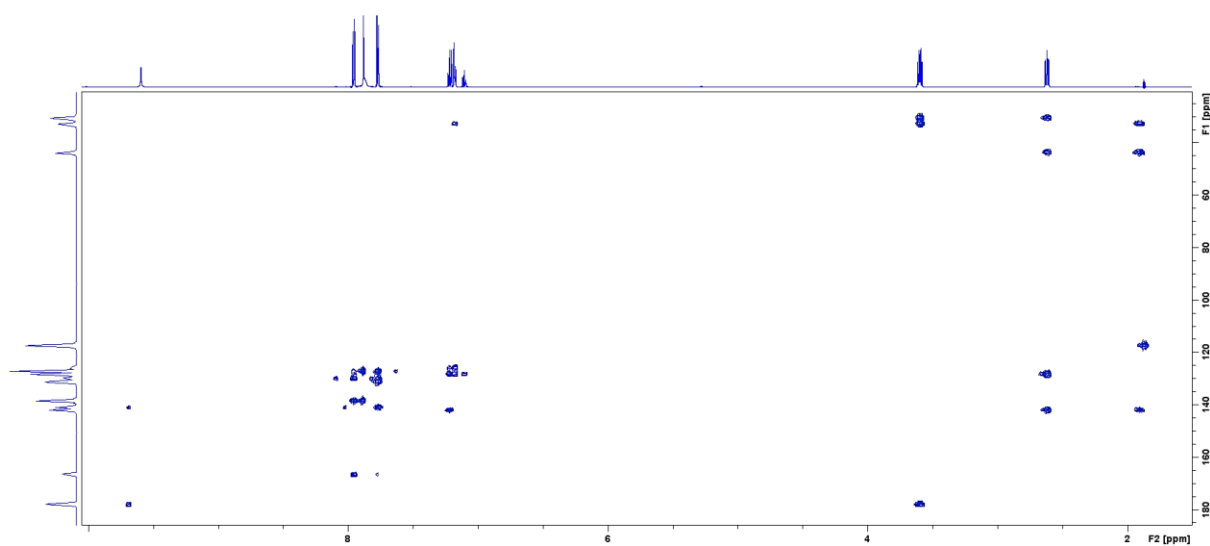
#### 4.3.1. Analiza spoja **P2-9** spektroskopijom NMR

U sintezi makrozona **3-9** korišten je odgovarajući derivat tiosemikarbazida **P2-9**, čija je struktura prikazana na slici 41. Za potvrdu strukture navedenog spoja snimljeni su sljedeći spektri NMR:  $^1\text{H}$ , COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Analizom spektra  $^1\text{H}$  NMR (Slika 42.) mogu se vidjeti signali u području od 7,18 ppm do 7,96 ppm koji odgovaraju protonima iz dvaju benzenskih prstena. Iz spektara COSY (Slika D30.) i HSQC (Slika D31.) jednoznačno su određeni kemijski pomaci aromatskih protona i pripadajućih atoma ugljika. Stoga, protoni H17 i H21 imaju kemijski pomak 7,96 ppm, a signal protona H18 i H20 nalazi se pri 7,77 ppm. Njima odgovarajući signali ugljikovih atoma nalaze se pri 130,02 ppm za C17 i C21, odnosno pri 127,21 ppm za C18 i C20. Signali protona drugog aromatskog sustava nalaze se pri 7,18 ppm (H28 i H32) i 7,22 ppm (H29 i H31), a njima odgovarajući signal ugljikovih atoma nalazi se pri 128,38 ppm za atome C28, C32, C29 i C31. Signali prisutni pri 1,91 ppm, 2,62 ppm i 3,60 ppm odgovaraju metilenskim protonima H25, H26 i H24. Analizom spektara COSY i

HSQC određeni su i kemijski pomaci odgovarajućih metilenskih atoma ugljika. U spektru  $^1\text{H}$  NMR prisutan je izraženi singlet pri 7,88 ppm koji odgovara protonu H22 iz imino veze. Navedeni proton u spektru HSQC ima korelaciju s odgovarajućim atomom ugljika C22 pri 141,03 ppm. Također, u spektru HMBC (Slika 43.) prisutna je korelacija protona H22 s atomima aromatskih ugljika (C18 i C20), čiji se signal nalazi pri 127,21 ppm, te korelacija protona H22 i kvaternog atoma ugljika C19 pri 138,59 ppm. U spektru  $^1\text{H}$  prisutan je i singlet pri 9,60 ppm, koji odgovara protonu karboksilne skupine (H33). Signali protona sekundarnih amino skupina (H22a i H22b) nisu opaženi zbog izmjene s deuterijem iz acetonitrila- $\text{d}_3$  korištenog prilikom snimanja spektara NMR. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **P2-9** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$  prikazani su u tablici 9.



Slika 41. Struktura spoja **P2-9**.

Slika 42. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **P2-9**.Slika 43. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **P2-9**.

Tablica 9. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **P2-9** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ .

spoj P2-9		
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
15	–	166,58
16	–	131,30
17;21	7,96	130,02
18;20	7,77	127,21
19	–	138,59
22	7,88	141,03
22a	–*	–
22b	–	–
23	–	178,14
24	3,60	43,74
25	1,91	30,51
26	2,62	32,85
27	–	142,07
28;32	7,18	128,38
29;31	7,22	128,38
30	7,10	125,89
33	9,60	–

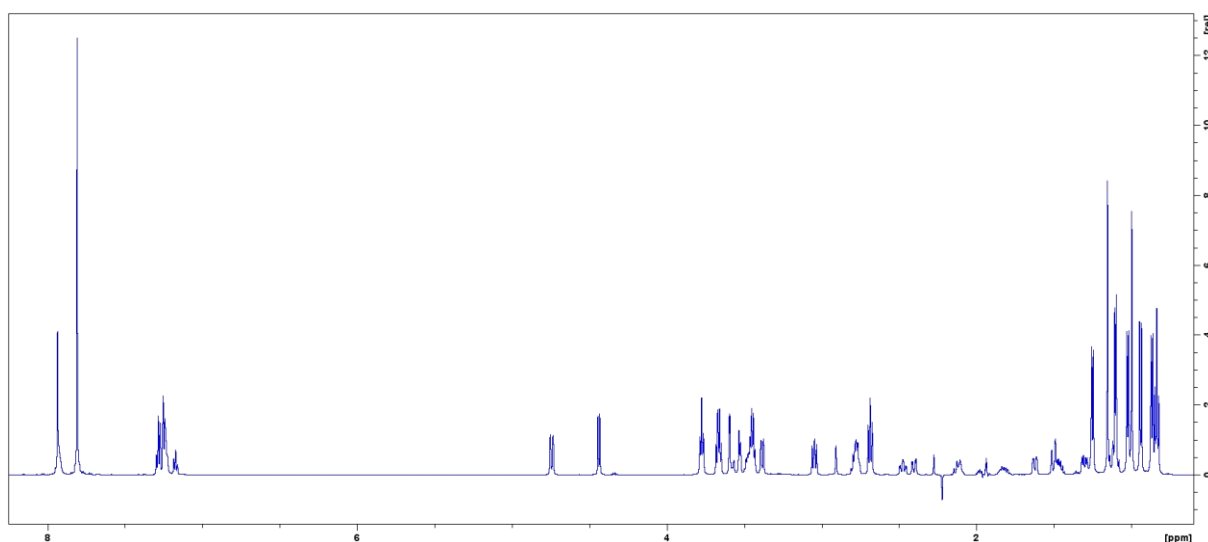
\*signal nije opažen

#### 4.4. Strukturna karakterizacija izoliranih spojeva iz reakcijske smjese makrozona 3-9

##### 4.4.1. Makrozon 3-9

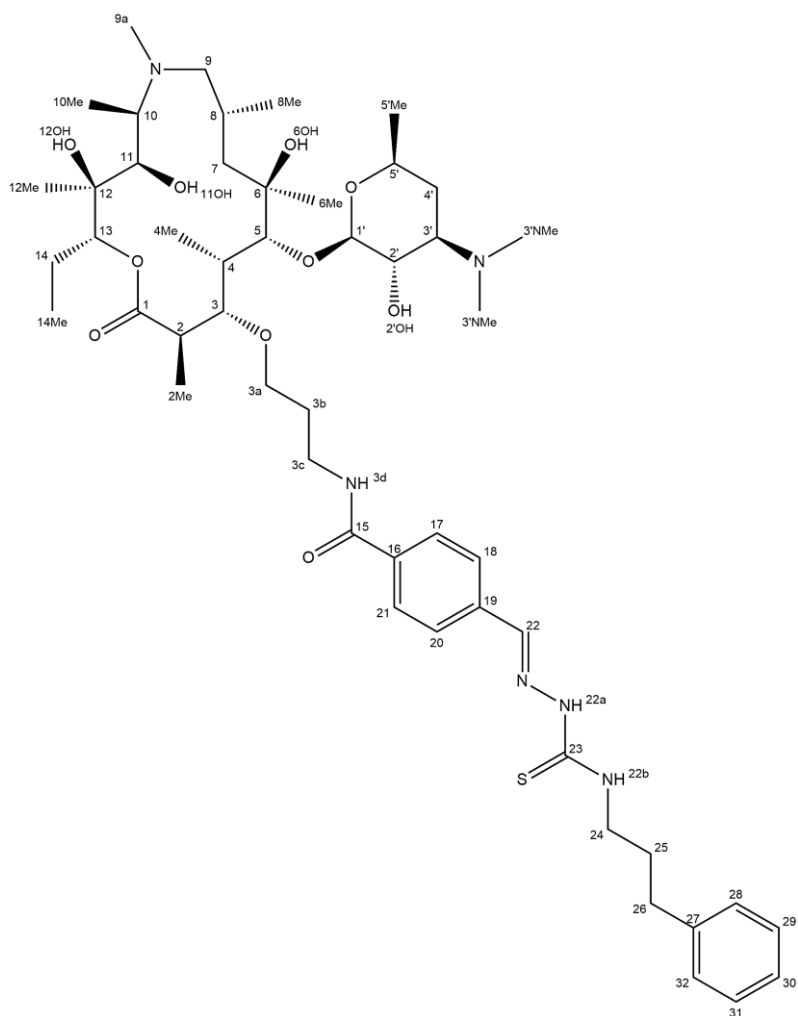
U spektru  $^1\text{H}$  NMR makrozona **3-9** (Slika 44.) prisutan je signal pri 7,24 ppm koji odgovara protonu iz amidne veze tiosemikarbazonoskog dijela makrozona (H3d, Slika 45.), čime je potvrđena uspješnost zadnjeg koraka sinteze makrozona **3-9**, odnosno reakcija amidacije. Dodatna potvrda novosintetiziranog makrozona **3-9** dobiva se analizom spektara COSY (Slika D32.) i HMBC (Slika 46.). U spektru COSY prisutna je korelacija amidnog protona H3d i metilenskog protona H3c, čiji kemijski pomak iznosi 3,44 ppm. U spektru HMBC prisutne su korelacije amidnog protona H3d s karbonilnim ugljikovim atomom C15 pri 166,30 ppm te s atomom ugljika C3c pri 37,72 ppm. Nadalje, prisutna je i korelacija metilenskog protona H3c s kvaternim atomom ugljika C15 (166,30 ppm) te korelacija s metilenskim atomima ugljika C3a pri 72,87 ppm i C3b pri 30,17 ppm. Signali aromatskih protona iz tiosemikarbazonoskog dijela molekule makrozona **3-9** prisutni su u području od 7,25 ppm do 7,81 ppm, te se analizom

spektra HSQC (Slika D33.) mogu jednoznačno odrediti kemijski pomaci odgovarajućih atoma ugljika. U spektru  $^1\text{H}$  NMR prisutan je singlet pri 7,93 ppm koji odgovara protonu iz imino veze, H22 (Slika 45.), dok se njemu odgovarajući atom ugljika C22, u spektru HSQC nalazi pri 141,30 ppm. U spektru HMBC prisutna je korelacija protona H22 s aromatskim atomima ugljika C18 i C20, čiji se signali nalaze pri 127,34 ppm, te korelacija s kvaternim ugljikovim atomom C19 pri 136,81 ppm. Signali protona iz hidroksilnih skupina vezanih na makrolaktonski prsten i šećernu jedinicu desozamin (6OH, 11OH, 12OH i 2'OH), kao i signali protona H22a i H22b iz amino skupina, nisu prisutni zbog izmjene s deuterijem iz acetonitrila- $\text{d}_3$  korištenog za snimanje spektara NMR. U tablici 10. prikazani su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za makrozon **3-9** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ . U spektru MS makrozona **3-9** (Slika D34.), snimljenom u pozitivnom ionizacijskom modu, prisutan je signal molekuskog iona,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , pri vrijednosti  $m/z$  971,58 koji potvrđuje novosintetizirani makrozon **3-9**, čija molekulska masa iznosi 970,58 Da. Signal molekuskog iona makrozona **3-9** podvrgnut je fragmentaciji, pri čemu su u spektru MS/MS (Slika 47.) detektirani ioni fragmenti spoja na temelju čega je predložen fragmentacijski put makrozona **3-9** (Slika 48.). Analizom snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR te spektara MS potvrđeno je da je struktura makrozona **3-9** ona prikazana na slici 45.

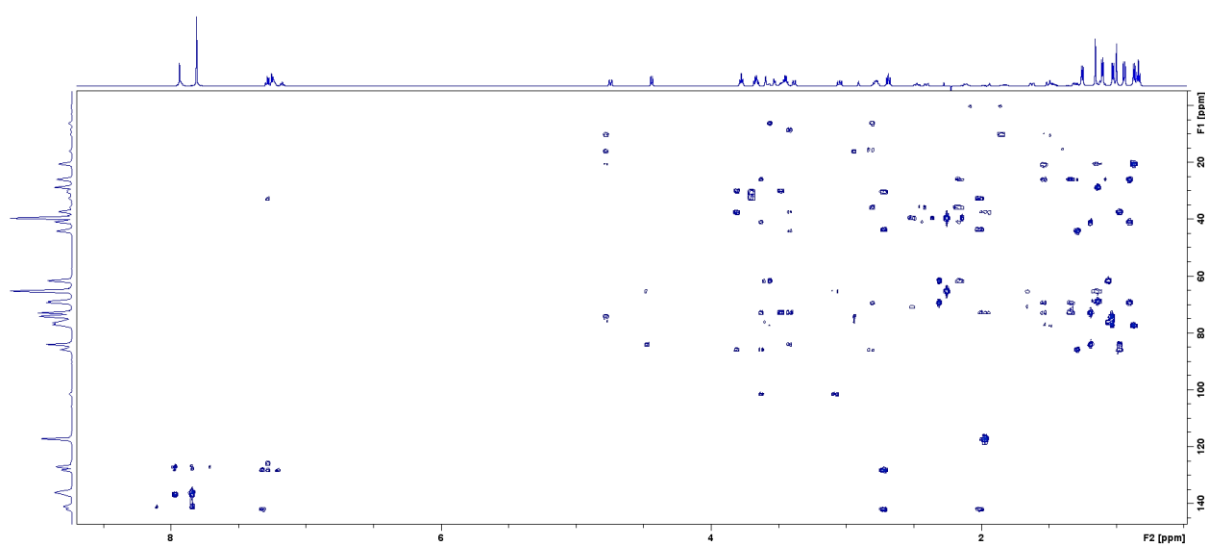


Slika 44. Spektar  $^1\text{H}$  NMR makrozona **3-9**.





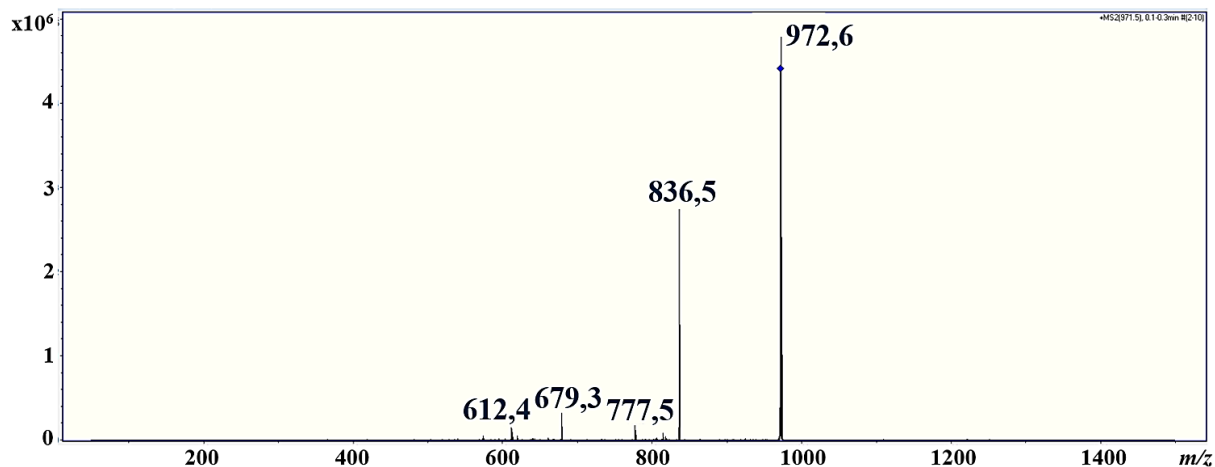
Slika 45. Struktura makrozona 3-9.

Slika 46. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC makrozona 3-9.

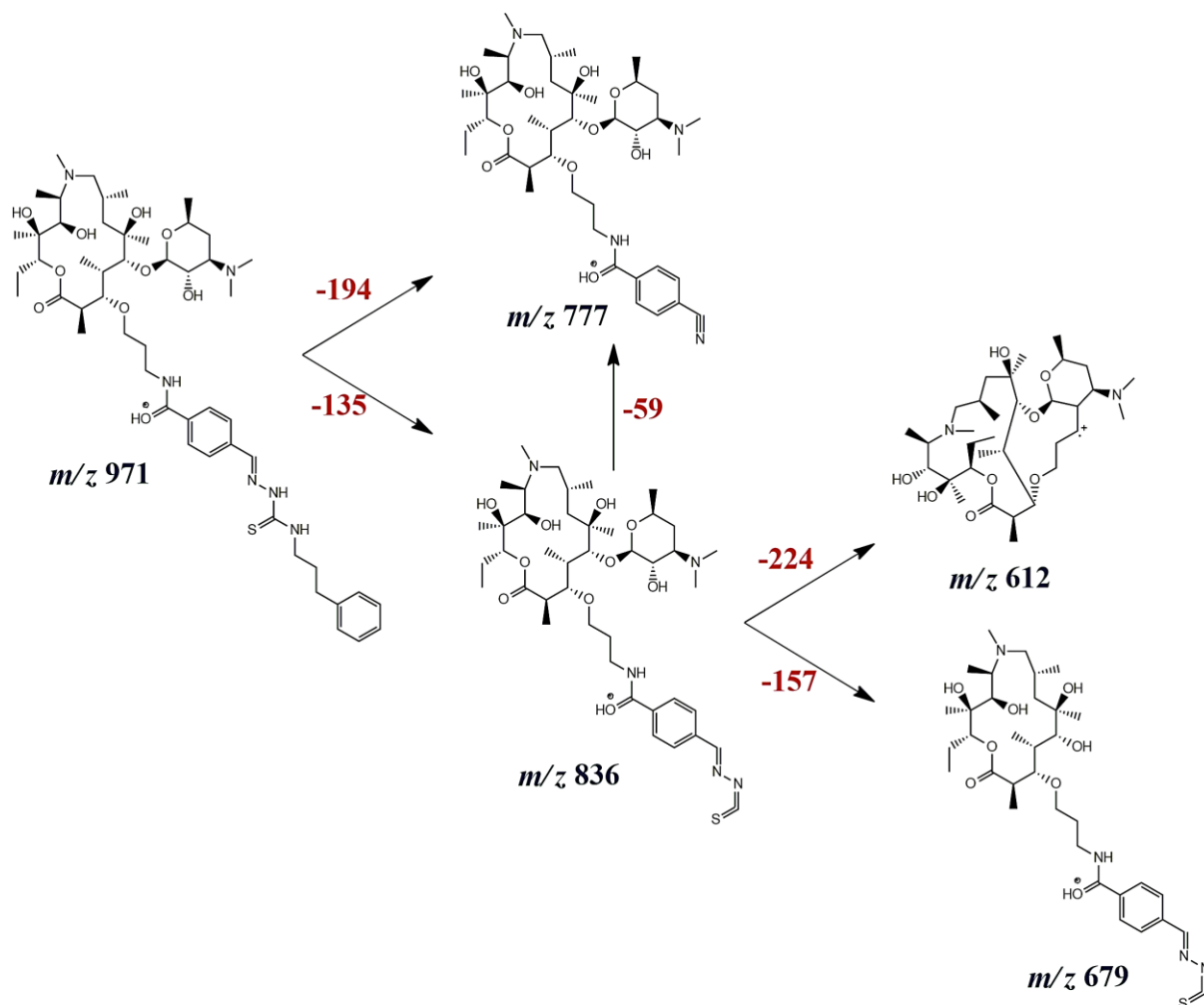
Tablica 10. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za makrozon 3-9 asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

makrozon 3-9					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	–	177,5	2'OH	–*	–
2	2,77	44,25	3'	2,47	65,38
2Me	1,25	15,57	3'NMe <sub>2</sub>	2,22	39,66
3	3,38	86,06	4'eq; 4'ax	1,63; 1,11	28,93
4	2,11	37,46	5'	3,47	68,91
4Me	0,94	8,51	5'Me	1,10	20,68
5	3,59	84,10	3a	3,77	72,87
6	–		3b	1,94	30,17
6Me	1,15	26,16	3c	3,44	37,72
6OH	–*	–	3d	7,24	–
7eq; 7ax	1,51; 1,30	41,10	15	–	166,30
8	1,84	26,15	16	–	136,35
8Me	0,87	20,85	17;21	7,81	127,34
9eq; 9ax	2,40; 2,12	69,51	18;20	7,81	127,34
9a-N	2,27	35,80	19	–	136,81
10	2,77	61,68	22	7,93	141,30
10Me	1,02	6,47	22a	–*	–
11	3,53	76,13	22b	–	–
11OH	–*	–	23	–	178,00
12	–	74,30	24	3,66	43,76
12Me	0,99	16,17	25	1,98	30,51
12OH	–*	–	26	2,68	32,75
13	4,74	77,46	27	–	142,16
14eq; 14ax	1,82; 1,47	20,76	28;32	7,25	128,41
14Me	0,83	10,21	29;31	7,28	128,41
1'	4,44	101,52	30	7,17	125,82
2'	3,05	70,79			

\*signal nije opažen



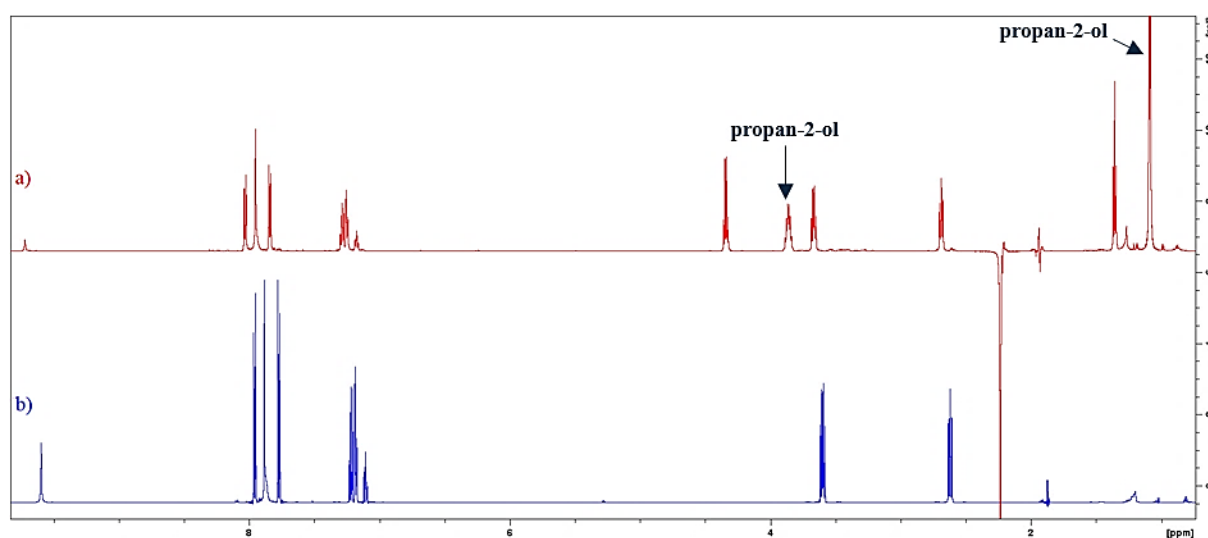
Slika 47. Spektar MS/MS makrozona 3-9.

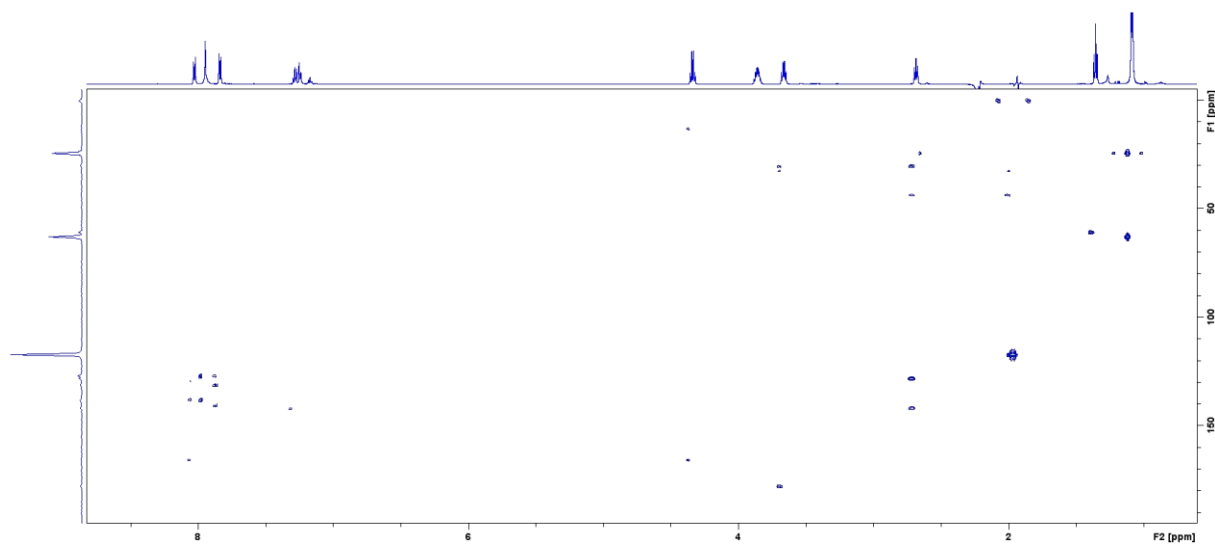
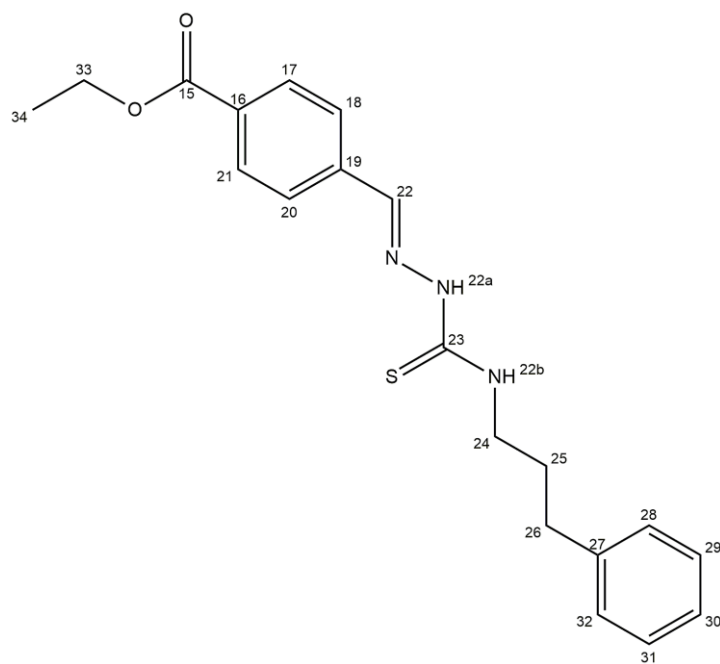


Slika 48. Predloženi fragmentacijski put makrozona 3-9.

## 4.4.2. Spoj 3-9-a

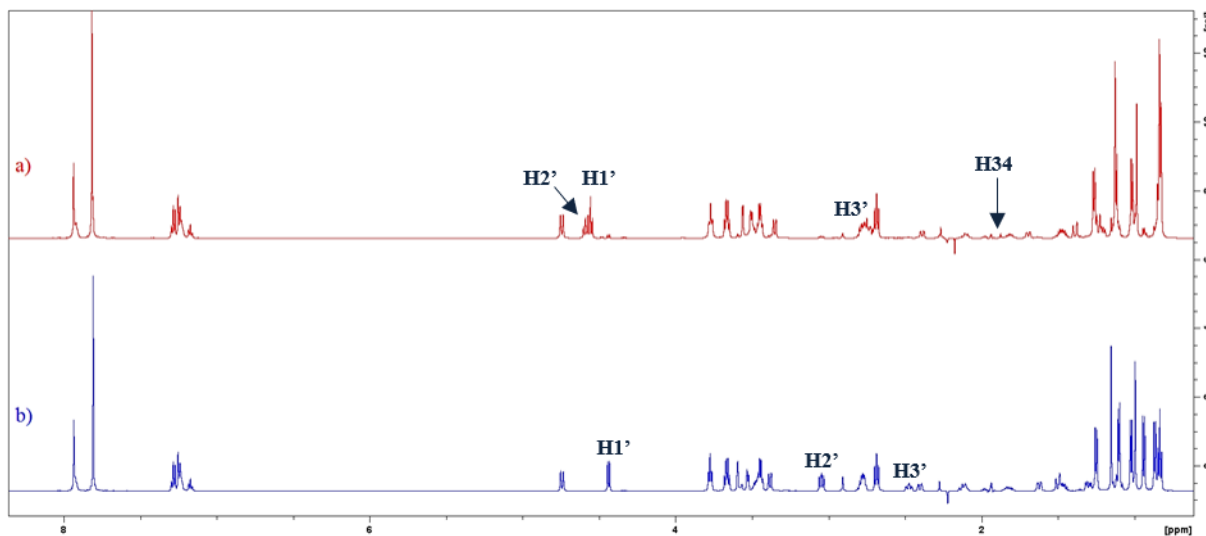
Analizom spektra  $^1\text{H}$  NMR spoja **3-9-a** vidljivo je kako su prisutni signali usporedivi sa signalima derivata tiosemikarbazida, **P2-9** (Slika 49.). U spektru su prisutni signali aromatskih protona iz dvaju benzenskih prstena, te su kemijski pomaci protona i odgovarajućih atoma ugljika određeni na temelju korelacija u spektarima COSY (Slika D35.) i HSQC (Slika D36.). U spektru spoja **3-9-a** dodatno su prisutna dva nova signala. Jedan signal je kvartet pri 4,34 ppm (H33, Slika 51.) s integralom približno 2, a drugi signal je triplet koji se nalazi pri 1,36 ppm (H34) s integralom približno 3. Navedena dva signala su u spektru COSY u međusobnoj korelaciji, pri čemu čine zaseban spinski sustav, te se pretpostavlja kako navedeni protoni pripadaju etoksi skupini. Iz spektra HSQC određeni su kemijski pomaci odgovarajućih atoma ugljika koji iznose 61,00 ppm za C33 i 13,50 ppm za C34. U spektru HMBC (Slika 50.) prisutna je korelacija protona H33 s kvaternim ugljikovim atomom C15, čiji je signal prisutan pri 165,93 ppm. Osim toga, u spektru  $^1\text{H}$  NMR spoja **3-9-a** prisutan je dublet pri 1,09 ppm te kvartet pri 3,87 ppm koji su u međusobnoj korelaciji u spektru COSY. Navedeni signali odgovaraju propan-2-olu, koji se koristi za ispiranje pumpe Knauer-120 za dodatni protok vodene faze. Na taj način je propan-2-ol dospio na SPE-sorbens, a potom je ispran zajedno s analitom u cjevčicu NMR. Protoni sekundarnih amino skupina (H22a i H22b) nisu prisutni zbog izmjene s deuterijem iz acetonitrila- $d_3$  korištenog prilikom snimanja spektara NMR. U tablici D7. prikazani su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-9-a** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ . Na temelju svega može se zaključiti da je spoj **3-9-a** etilni ester, čija je struktura prikazana na slici 51.

Slika 49. Spektar  $^1\text{H}$  NMR a) spoja **3-9-a** i b) spoja **P2-9**.

Slika 50. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **3-9-a**.Slika 51. Predložena struktura spoja **3-9-a**.

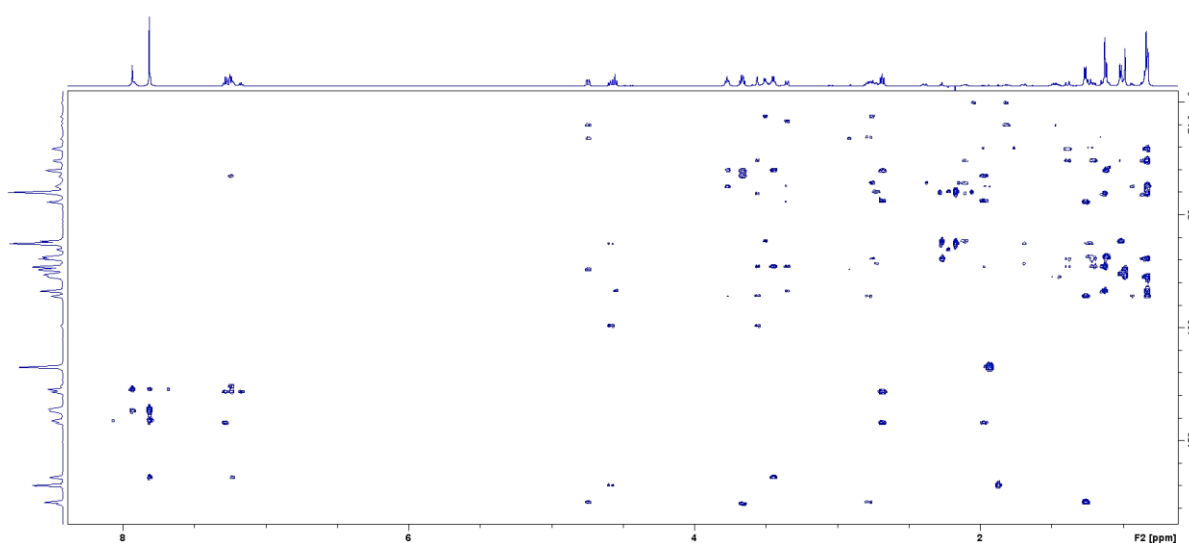
#### 4.4.3. Spoj **3-9-b**

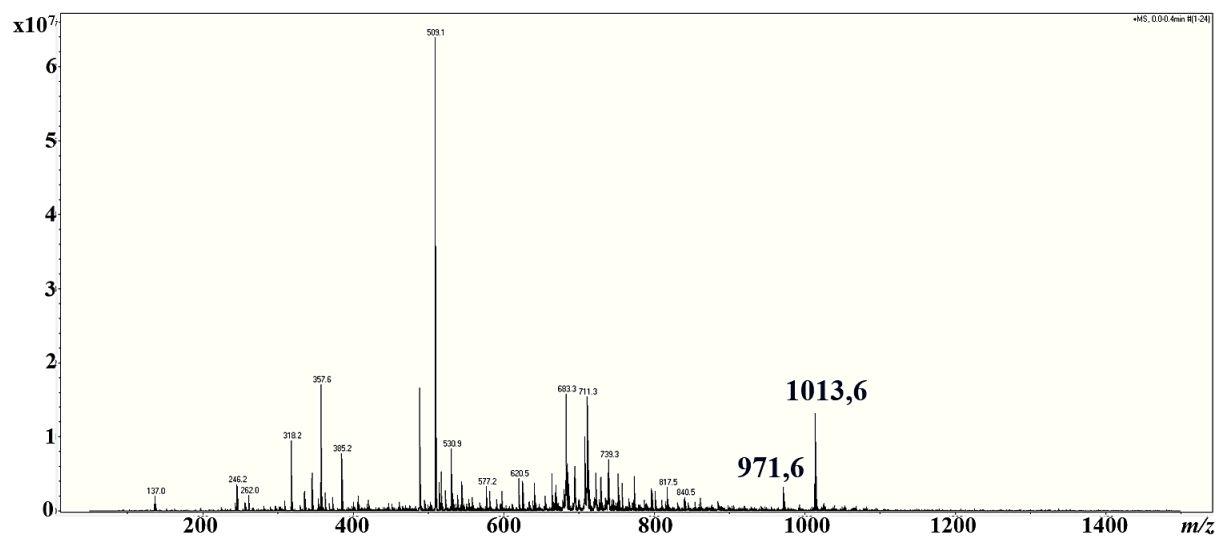
Usporedbom spektara  $^1\text{H}$  NMR spoja **3-9-b** i makrozona **3-9** (Slika 52.) vidljivo je kako se oni međusobno preklapaju, ali je u spektru onečišćenja prisutan dodatni singlet pri 1,88 ppm. Stoga je prva pretpostavka bila da se radi o acetiliranom makrozonu. Nadalje, u spektru spoja **3-9-b** signali protona  $\text{H1}' - \text{H3}'$  vrlo su niskog intenziteta i prema vrijednostima integrala ne pripadaju glavnom spoju, ali su prisutni odsjenjeniji signali pri 4,55 ppm, 4,58 ppm i 2,76 ppm koji vjerojatno odgovaraju navedenim protonima. Kemijski pomaci protona  $\text{H4}'$  i  $\text{H5}'$  nisu se značajno promijenili u usporedbi s makrozonom **3-9**. U tablici 11. uspoređeni su kemijski pomaci atoma  $\text{H1}' - \text{H5}'$  za spoj **3-9-b** i makrozon **3-9**. Pretpostavljeno je da je na položaju  $2'$  prisutna acetilna skupina, koja bi bila odgovorna za odsjenjenje protona  $\text{H1}' - \text{H3}'$ . Potvrda navedenoj pretpostavci je prisutnost singleta pri 1,88 ppm ( $\text{H34}$ ) koji u spektru HSQC (Slika D37.) ima korelaciju s atomom ugljika pri 20,52 ppm ( $\text{C34}$ ), što bi moglo odgovarati metilnoj skupini iz acetilne skupine. Navedeni proton u spektru HMBC (Slika 53.) ima korelaciju s kvaternim atomom ugljika pri 169,7 ppm ( $\text{C33}$ ), kao i proton  $\text{H2}'$ , čime je potvrđena prethodno navedena pretpostavka. U spektru MS (Slika 54.) prisutan je signal molekuskog iona pri vrijednosti  $m/z$  1013,6 što dodatno potvrđuje pretpostavku o acetiliranom makrozonu, čija molekulska masa iznosi 1012,6 Da. Osim toga, u spektru MS je prisutan i signal pri vrijednosti  $m/z$  971,6 koji odgovara ionu fragmentu. Navedeni ion fragment nastaje gubitkom acetaldehida, te mu je masa jednaka masi makrozona **3-9**. Na slici 55. prikazana je predložena struktura spoja **3-9-b**. Ovo onečišćenje vrlo često nastaje tijekom sinteze makrozona iz klase 3-, budući da se položaj  $2'$  zaštićuje acetilnom skupinom (Slika 38.) U tablici D8. navedeni su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-9-b** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ .

Slika 52. Spektar  $^1\text{H}$  NMR a) spoja **3-9-b** i b) makrozona **3-9**.

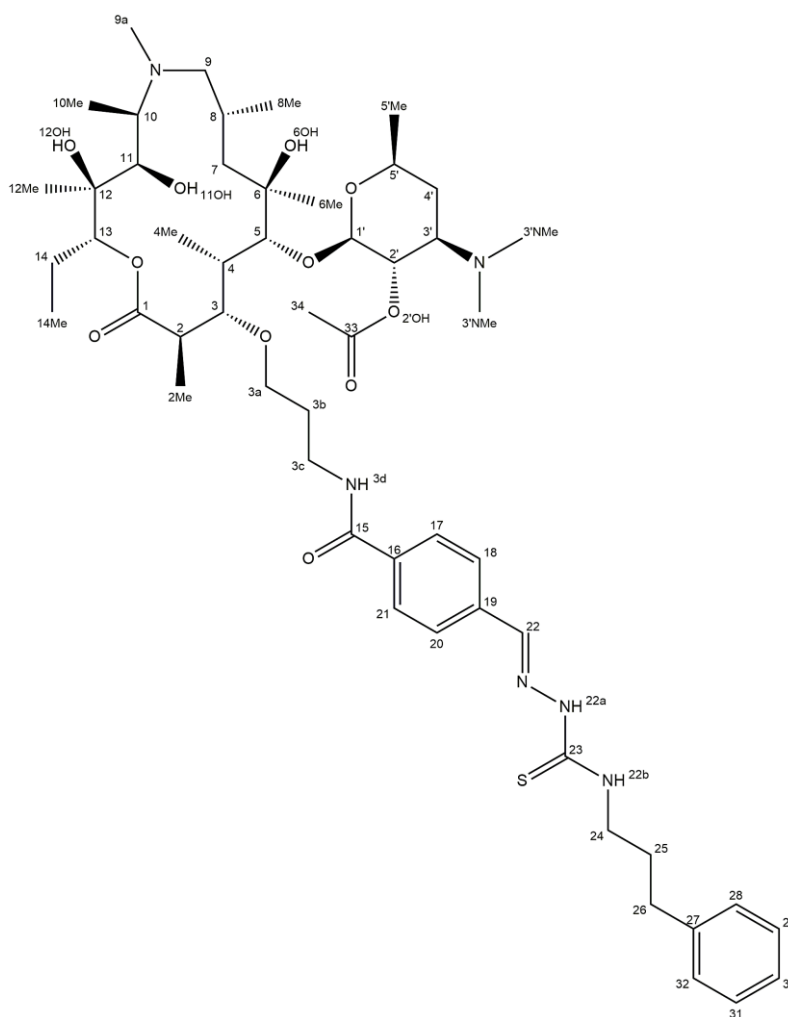
Tablica 11. Usporedba kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR atoma H1' – H5' spoja **3-9-b** i makrozona **3-9**.

Atom	spoj 3-9-b		makrozon 3-9	
	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1'	4,55	98,98	4,44	101,52
2'	4,58	71,4	3,05	70,79
3'	2,76	62,7	2,47	65,38
4'eq; 4'ax	1,70; 1,24	30,27	1,63; 1,11	28,93
5'	3,49	68,67	3,47	68,91

Slika 53. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **3-9-b**.



Slika 54. Spektar ESI-MS spoja 3-9-b.

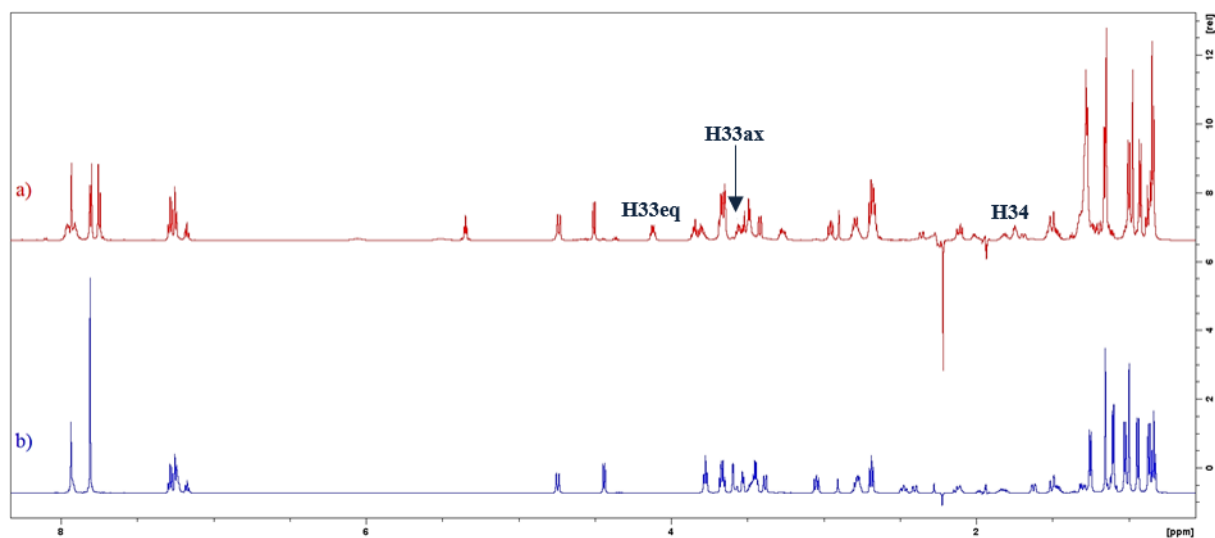
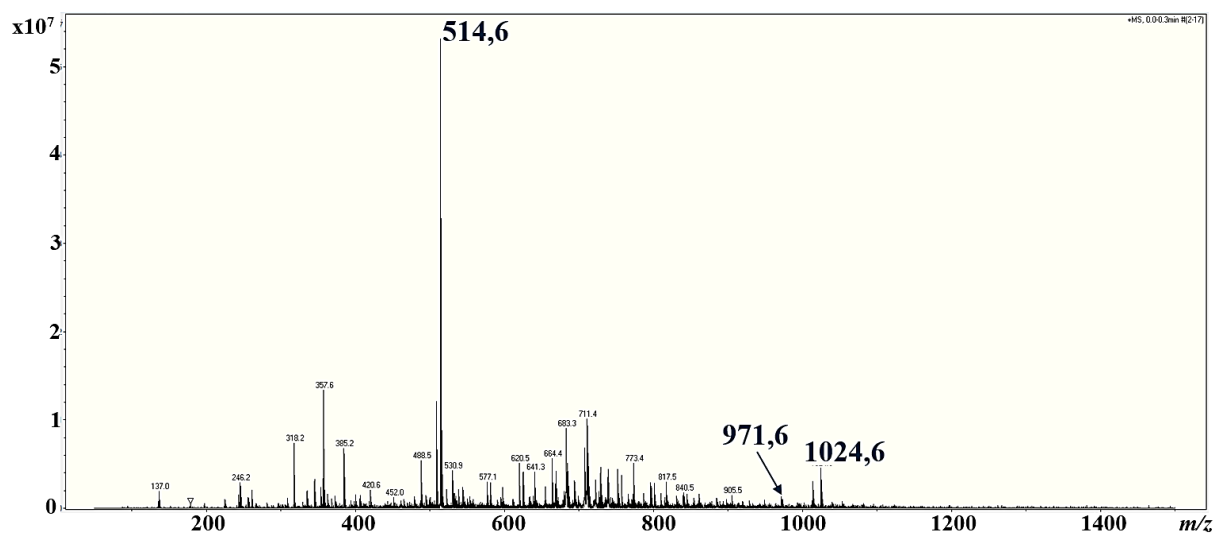


Slika 55. Predložena struktura spoja 3-9-b.

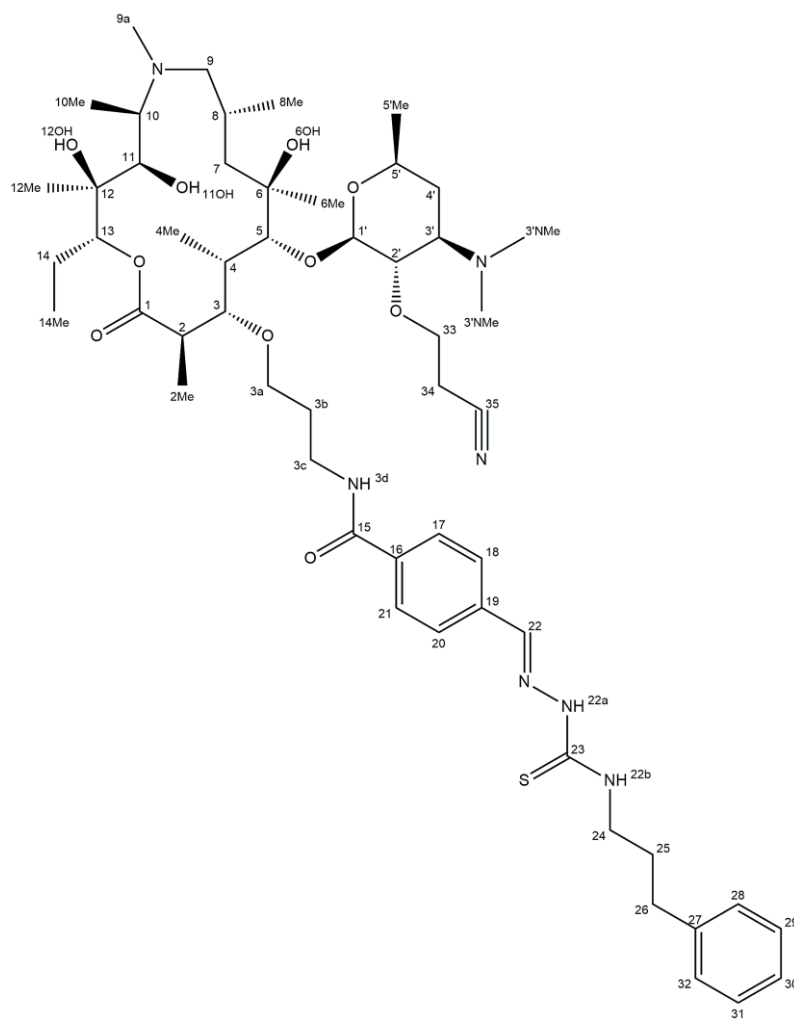


#### 4.4.4. Spoj 3-9-c

Usporedbom spektara  $^1\text{H}$  NMR spoja **3-9-c** i makrozona **3-9** (Slika 56.) vidljivo je kako se oni međusobno preklapaju. Osim što su prisutni svi signali koji odgovaraju strukturi makrozona **3-9**, u spektru spoja **3-9-c** prisutni su i dodatni signali koji pripadaju onečišćenju koje vjerojatno koeluiraju zajedno sa spojem **3-9-c**. Međutim, detaljnijom analizom snimljenih spektara NMR i MS, uočeno je kako pojedini dodatni signali pripadaju spoju **3-9-c**. Analizom spektra NOESY (Slika D38.) spoja **3-9-c** uočene su korelacije protona H2' s protonima H1', H3', H4', H5' i H5'Me, ali i s protonima koji se nalaze pri 4,12 ppm i 3,55 ppm ( $\text{H33}_{\text{eq, ax}}$ , Slika 58.). Navedeni protoni  $\text{H33}_{\text{eq, ax}}$  pripadaju novoj metilenskoj skupini, te je iz spektra HSQC (Slika D39.) određen kemijski pomak odgovarajućeg atoma ugljika C33, koji iznosi 71,98 ppm. U spektru COSY (Slika D40.) prisutna je korelacija protona  $\text{H33}_{\text{eq, ax}}$  s protonom H34 pri 1,75 ppm, koji pripada još jednoj novoj metilenskoj skupini, te njegov atom ugljika C34 ima kemijski pomak pri 29,66 ppm. Zatim su u spektru NOESY uočene i korelacije protona  $\text{H33}_{\text{eq}}$  s protonima  $\text{H33}_{\text{ax}}$ , H2', H34 i H4Me, te korelacije protona H34 s protonima  $\text{H33}_{\text{eq, ax}}$ , H3c i H4Me. Obzirom na navedeno, pretpostavlja se da su dvije nove metilenske skupine (H33, H34) vezane na položaj 2'OH, pri čemu se radi o skupini oblika  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$ . Za supstituent R, na temelju analize spektara MS, pretpostavljeno je da se radi o nitrilnoj skupini. U spektru MS (Slika 57.) prisutan je signal molekulskog iona pri  $m/z$  1024,6 te signal njegova dvostruko nabijenog iona pri vrijednosti  $m/z$  514,6, što je u slaganju s masom spoja **3-9-c** koja iznosi 1023,6 Da. Osim toga, u spektru MS je prisutan i signal iona fragmenta pri vrijednosti  $m/z$  971,6 koji nastaje gubitkom propionitrila pri čemu masa molekule tada iznosi 970,6 Da, što ujedno odgovara makrozonu **3-9**. U spektru HMBC (Slika D41.) prisutne su korelacije atoma  $\text{H33}_{\text{eq}}$  s atomom C34 (29,66 ppm), te korelacija atoma H34 s atomom C33 (71,98 ppm), pri čemu su navedene korelacije u razini šuma. U spektru nažalost nije vidljiva korelacija protona H34 s kvaternim atomom ugljika C35 iz nitrilne skupine, koji bi prema predikciji imao kemijski pomak pri otprilike 118 ppm. U tablici 12. nalaze se kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-9-c** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ , a predložena struktura prikazana je na slici 58.

Slika 56. Spektar  $^1\text{H}$  NMR a) spoja 3-9-c i b) makozona 3-9.

Slika 57. Spektar ESI-MS spoja 3-9-c.



Slika 58. Predložena struktura spoja 3-9-c.

Tablica 12. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-9-c** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

spoj <b>3-9-c</b>					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	–	177,10	<b>2'OH</b>	–*	–
<b>2</b>	2,80	44,08	<b>3'</b>	2,47	65,38
<b>2Me</b>	1,27	15,52	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,22	39,74
<b>3</b>	3,42	86,40	<b>4'eq; 4'ax</b>	1,69; 1,17	30,35
<b>4</b>	2,10	37,19	<b>5'</b>	3,48	68,20
<b>4Me</b>	0,92	8,19	<b>5'Me</b>	1,16	20,38
<b>5</b>	3,64	82,70	<b>3a</b>	3,84; 3,79	67,98
<b>6</b>	–	73,10	<b>3b</b>	1,94	30,17
<b>6Me</b>	1,14	26,04	<b>3c</b>	3,65; 3,27	38,20
<b>6OH</b>	–*	–	<b>3d</b>	7,96	–
<b>7eq; 7ax</b>	1,50; 1,23	41,07	<b>15</b>	–	166,70
<b>8</b>	1,81	26,09	<b>16</b>	–	137,00
<b>8Me</b>	0,84	20,80	<b>17;21</b>	7,75	127,46
<b>9eq; 9ax</b>	2,36; 1,98	69,56	<b>18;20</b>	7,80	127,25
<b>9a-N</b>	2,25	35,91	<b>19</b>	–	136,40
<b>10</b>	2,78	63,60	<b>22</b>	7,93	141,16
<b>10Me</b>	1,00	6,44	<b>22a</b>	–*	–
<b>11</b>	3,49	76,18	<b>22b</b>	7,91	–
<b>11OH</b>	–*	–	<b>23</b>	–	178,20
<b>12</b>	–	74,11	<b>24</b>	3,67	43,64
<b>12Me</b>	0,97	16,47	<b>25</b>	1,98	30,42
<b>12OH</b>	–*	–	<b>26</b>	2,69	32,82
<b>13</b>	4,74	77,54	<b>27</b>	–	142,32
<b>14eq; 14ax</b>	1,81; 1,47	20,76	<b>28;32</b>	7,25	128,37
<b>14Me</b>	0,85	10,22	<b>29;31</b>	7,28	128,37
<b>1'</b>	4,50	100,92	<b>30</b>	7,17	125,76
<b>2'</b>	2,95	80,36	<b>33eq; 33ax</b>	4,12; 3,55	71,98
			<b>34</b>	1,75	29,66
			<b>35</b>	–	–

\*signal nije opažen

## § 5. ZAKLJUČAK

U svrhu izrade ovog diplomskog rada uspješno je primijenjen vezani sustav LC-SPE/NMR za analizu reakcijskih smjesa iz sinteze dvaju novih makrozona, konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. Pripravljene su reakcijske smjese 3-trifluormetoskifenil- (**3-8**) i 3-(3-fenilpropil)-makrozona (**3-9**), pri čemu je reakcijska smjesa makrozona **3-8** pripravljena u dvije šarže. Komponente pojedinih reakcijskih smjesa uspješno su odijeljene tekućinskom kromatografijom na kromatografskoj koloni Waters XBridge® Phenyl nakon čega su odabrane komponente uspješno ekstrahirane na SPE-sorbense C18, a zatim su snimljeni njihovi spektri NMR i MS. Analizom snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR te spektara MS predložene su strukture novosintetiziranih makrozona **3-8** i **3-9**, kao i izoliranih onečišćenja. Iz reakcijskih smjesa makrozona **3-8** izolirano je i strukturno okarakterizirano ukupno 6 onečišćenja, pri čemu dva onečišćenja (**3-8-e** i **3-8-f**) odgovaraju diastereomerima makrozona **3-8**, čije su strukture predložene na temelju analize spektara NOESY. Iz reakcijske smjese makrozona **3-9** izolirano je i strukturno okarakterizirano ukupno 3 onečišćenja. S obzirom da su sva izolirana onečišćenja strukturno slična odgovarajućim makrozonima, može se zaključiti da ona pripadaju nusproduktima i/ili razgradnim produktima, od kojih su neka tiosemikarbazonoskog porijekla, a neka makrolidnog.

Korištenjem vezanog sustava LC-SPE/NMR u provedenom istraživanju, postignuto je učinkovitije i brže pročišćavanje te identifikacija spojeva u odnosu na klasične tehnike *off-line*, pri čemu su korištene znatno manje količine uzoraka i otapala. S obzirom na mogućnost višestrukog ukoncentriravanja na SPE-sorbense, vezani sustav LC-SPE/NMR vrlo je pogodan za analizu smjesa gdje su, uz glavne komponente, prisutna i onečišćenja u vrlo niskim udjelima. Također, zbog svoje osjetljivosti i niskih granica detekcije, sustav LC-SPE/NMR vrlo je prikladan za istraživanje profila onečišćenja u farmaceutskoj analizi tijekom razvoja lijeka i prije njihovog stavljanja na tržište, kako bi kvaliteta krajnjeg proizvoda bila osigurana. Ovo istraživanje je pokazalo da je tehnika LC-SPE-NMR u kombinaciji s tehnikom LC-MS/MS vrlo učinkovita za identifikaciju i određivanje konfiguracije diastereomera.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

- ACE – automatski izmjenjivač SPE-sorbensa (engl. *Automatic Cartridge Exchanger*)
- AMR – anitmikrobna rezistencija (engl. *Antimicrobial Resistance*)
- APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
- API – aktivni farmaceutski pripravak (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*)
- ARCs – spojevi srodni azitromicinu (engl. *Azithromycin Related Compounds*)
- CD<sub>3</sub>CN – deuterirani acetonitril (acetonitril-d<sub>3</sub>)
- CE – kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*)
- COSY – korelacijska spektroskopija (engl. *Correlation Spectroscopy*)
- DAD – detektor s nizom fotodioda (engl. *Diode Array Detector*)
- DCM – diklormetan
- DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin
- ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*)
- GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)
- HATU – 1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5*b*]piridinijev 3-oksid  
heksafluorofosfat
- HMBC – engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)
- HPD – visokotlačni raspršivač (engl. *High Pressure Dispenser*)
- HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*)
- HSQC – engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
- ICH – engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*
- MeOH – metanol
- MLS<sub>B</sub> – skupina antibiotika u koju pripadaju makrolidi, linkozamid i Streptogramin B
- MS – spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)
- NMR – nuklearna magnetna rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*)
- NOESY – engl. *Nuclear Overhauser effect Spectroscopy*
- ROESY – engl. *Rotating frame Overhauser effect Spectroscopy*

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. *ribosomal ribonucleic acid*)

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase Extraction*)

S/N – omjer signala prema šumu (engl. *Signal to Noise ratio*)

THF – tetrahidrofur

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-Layer Chromatography*)

TMS – tetrametilsilan

TOCSY – engl. *Total Correlation Spectroscopy*

WATERGATE – supresija signala otapala pomoću pobude gradijentima (engl. *Water suppression by Gradient-Tailored Excitation*)

WET – supresija signala otapala pojačana pomoću efekta T1 (engl. *Water suppression Enhanced through T1 effects*)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. Omura, *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice*, 2<sup>nd</sup> ed, Academic Press, California, SAD, 2002., str. 1–57.
2. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 2967–2983.
3. V. Eraković Haber, *Infektološki glasnik*, **31** (2011) 29–39.
4. T. Golkar, M. Zielinski, A. M. Berghuis, *Front. Microbiol.*, **9** (2018) 1942–1957.
5. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics*, **5** (2016) 29–42.
6. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2019. str. 1–30.
7. Z. Banić Tomišić, *Kem. Ind.*, **60** (2011) 603–617.
8. S. Alvarez-Elcoro, M. J. Enzler, *Mayo Clin. Proc.*, **74** (1999) 613–634.
9. J. Shim, N. Rama Jyothi, N. A. Mohammad Farook, *Asian J. Chem.*, **25** (2013) 5838–5840.
10. A. I. Matesanz, P. Souza, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **9** (2009) 1389–1396.
11. N. P. Prajapati, H. D. Patel, *Synth. Commun.*, **49** (2019) 2767–2804.
12. S. Arora, S. Agarwal, S. Singhal, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6** (2014) 34–41.
13. H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **4** (2005) 31–39.
14. D. S. Kalinowski, P. Quach, D. R. Richardson, *Future Med. Chem.*, **6** (2009) 1143–1151.
15. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.*, **5** (2012) 39–42.
16. A. E. Liberta, D. X. West, *BioMetals*, **5** (1992) 121–126.
17. R. Matsa, P. Makam, M. Kaushik, S. L. Hoti, T. Kannan, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **137** (2019)
18. S. Savir, Z. J. Wei, J. W. K. Liew, I. Vythilingam, Y. A. L. Lim, H. M. Saad, K. S. Sim, K. W. Tan, *J. Mol. Struct.*, **1211** (2020)
19. L. N. Suvarapu, A. R. Somala, J. R. Koduru, S. O. Baek, V. R. Ammireddy, *Asian J. Chem.*, **24** (2012) 1889–1898.
20. F. Prestinaci, P. Pezzotti, A. Pantosti, *Pathog. Global Health*, **109** (2015) 309–318.
21. C. L. Ventola, *Pharm. Ther.*, **40** (2015) 277–283.
22. P. Chowdhary, A. Raj, D. Verma, Y. Akhter, *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*, Elsevier, Amsterdam, 2020., str. 315–328.
23. A. F. MacCabe, J. C. Gould, *Scott. Med. J.*, **1** (1956) 223–226.

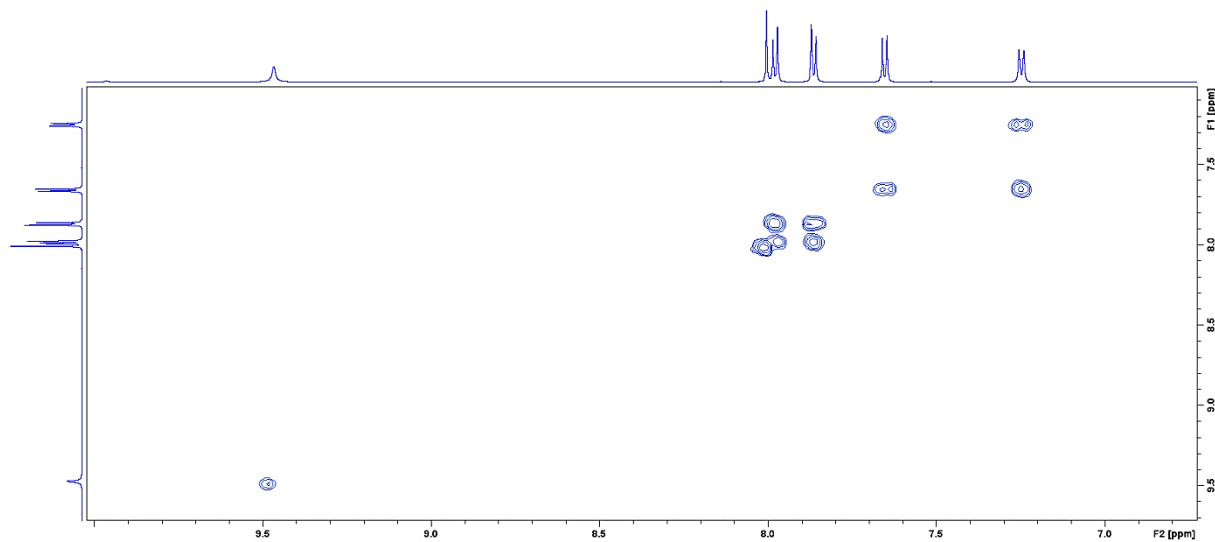


24. G. Maravić, *Curr. Drug. Targets: Infect. Disord.*, **4** (2004) 193–202.
25. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2019. str. 79–99.
26. J. Esteban, A. M. Costa, M. C. Cruzado, M. Faja, P. García, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.*, **47** (2006), 1919–1922.
27. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Cindrić, K. Brajša, M. Dumić, N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.*, **42** (2007) 138–145.
28. C. Agouridas, A. Denis, et al., *J. Med. Chem.*, **41** (1998) 4080–4100.
29. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, H. Čipčić Paljetak, N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.*, **44** (2009) 3459–3470.
30. M. Bukvić Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša, N. Kujundžić, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** (2011) 853–856.
31. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **56** (2020)
32. <https://makrozoni.chem.pmf.hr> (datum pristupa: 28. kolovoza 2021.)
33. M. S. H. Akash, K. Rehman, *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, Springer, Singapur, 2020., str. 1–18.
34. <https://www.ich.org> (datum pristupa: 2. rujna 2021.)
35. International Conference on Harmonization (ICH), *Impurities in new drug substances Q3A (R2)*, 2006
36. International Conference on Harmonization (ICH), *Impurities in new drug products Q3B (R2)*, 2006
37. S. Görög, *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2000., str. 1–65.
38. M. S. Lee, E. H. Kerns, *Mass Spectrom. Rev.*, **18** (1999) 187–279.
39. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7<sup>th</sup> ed, Cengage Learning, Boston, SAD, 2018., str. 501–536 i 746–781.
40. C. K. Lim, G. Lord, *Biol. Pharm. Bull.*, **25** (2002) 547–557.
41. J. Wang, *Mass Spectrom. Rev.*, **28** (2009) 50–92.
42. W. Zhou, Y. Ling, T. Liu, et al., *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **1062** (2017) 411–420.

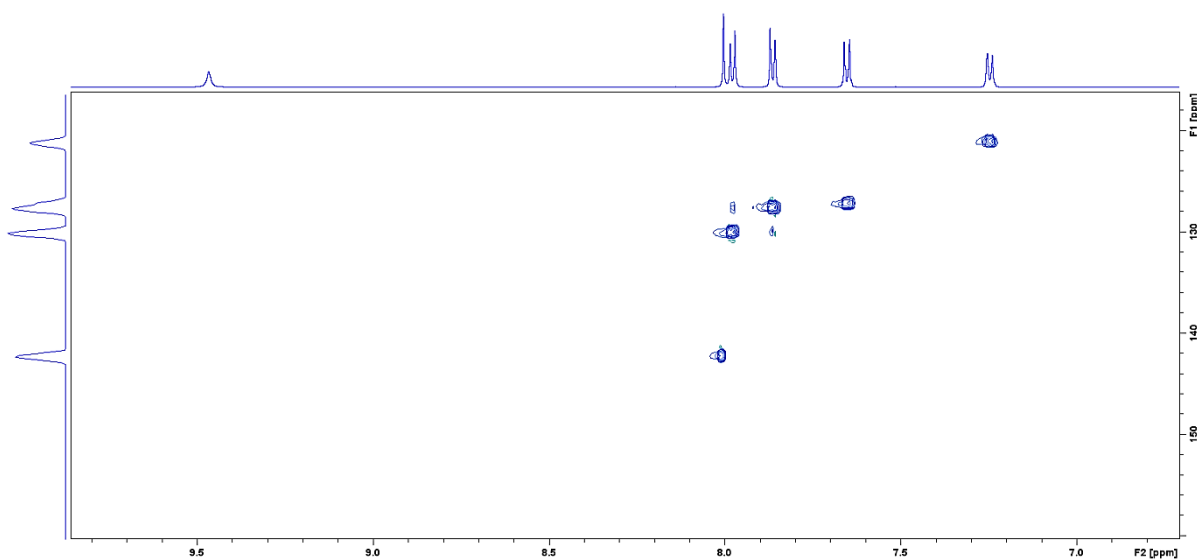
43. C. Benetti, R. Piro, G. Binato, R. Angeletti, G. Biancotto, *Food Addit. Contam.* **23** (2006) 1099–1108.
44. C. Lan, D. Yin, Z. Yang, W. Zhao, Y. Chen, W. Zhang, S. Zhang, *J. Anal. Methods Chem.*, **2019** (2019)
45. J. V. Grutes, R. G. Ferreira, M. U. Pereira, F. S. Candido, B. F. Spisso, *J. Environ. Sci. Health, Part B*, **56** (2021) 197–211.
46. I. Senta, I. Krizman-Matasić, S. Terzić, M. Ahel, *J. Chromatogr. A*, **1509** (2017) 60–68.
47. V. G. Amelin, D. S. Bol'shakov, *Moscow Univ. Chem. Bull. (Engl. Transl.)*, **74** (2019) 63–69.
48. M. Horie, K. Saito, R. Ishii, T. Yoshida, Y. Haramaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A*, **812** (1998) 295–302.
49. B. F. Spisso, R. G. Ferreira, et al., *Anal. Chim. Acta*, **682** (2010) 82–92.
50. L. Jank, M. T. Martins, J. B. Arsand, et al., *Talanta*, **144** (2015) 686–695.
51. T. Cai-Ming, H. Qiu-Xin, Y. Yi-Yi, P. Xian-Zhi, *Chin. J. Anal. Chem.*, **37** (2009) 1119–1124.
52. M. Kushwaha, B. Goel, S. Jaglan, S. K. Jain, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **43** (2020) 131–137.
53. P. Novak, *Kem. Ind.*, **53** (2004) 441–447.
54. P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, M. Miró, *Encyclopedia of Analytical Science*, 3<sup>rd</sup> ed, Elsevier, SAD, 2019., str. 220–247.
55. S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd, *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Elsevier, SAD, 2013., str. 349–384.
56. M. Sandvoss, B. Bardsley, T. L. Beck, E. Lee-Smith, S. E. North, P. J. Moore, A. J. Edwards, R. J. Smith, *Magn. Reson. Chem.*, **43** (2005) 762–770.
57. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan, P. Novak, *Croat. Chem. Acta*, **89** (2016) 543–547.
58. I. Habinovec, T. Jednačak, P. Novak, *ADMET & DMPK*, **3** (2015) 352–358.
59. P. Novak, P. Tepeš, I. Fistrić, I. Bratoš, V. Gabelica, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40** (2006) 1268–1272.
60. P. Novak, P. Tepeš, M. Ilijaš, I. Fistrić, I. Bratoš, A. Avdagić, Z. Hameršak, V. Gabelica Marković, M. Dumić, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50** (2009) 68–72.

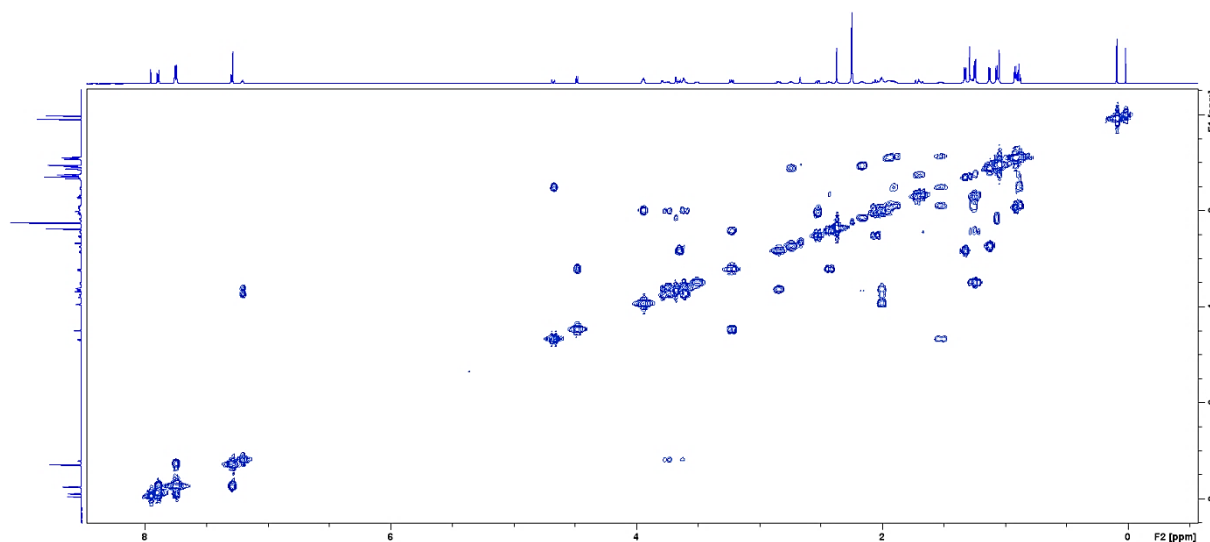
61. M. Pendela, S. Béni, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **402** (2012) 781–790.
62. G. Zhou, S. Shi, W. Zhang, Z. Tan, Y. Chen, D. Guo, H. Zhou, H. Hu, J. Tan, *Biomed. Chromatogr.*, **24** (2010) 1130–1135.
63. J. Borlak, M. Waller, M. Elend, T. Thum, A. Preiss, K. Levsen, *Xenobiotica*, **33** (2003) 655–676.
64. A. Acevedo De la Cruz, G. Hilbert, et al., *Anal. Chim. Acta*, **732** (2012) 145–152.
65. A. D. Pawlus, E. Cantos-Villar, et al., *J. Chromatogr. A*, **1289** (2013) 19–26.
66. M. Zehl, C. Braunberger, J. Conrad, M. Crnogorac, S. Krasteva, B. Vogler, U. Beifuss, L. Krenn, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400** (2011) 2565–2576.
67. A. Preiss, E. Berger-Preiss, M. Elend, S. Gerling, S. Kühn, S. Schuchardt, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403** (2012) 2553–2561.
68. M. Godejohann, J. D. Berset, D. Muff, *J. Chromatogr. A*, **1218** (2011) 9202–9209.
69. J. Li, H. Zhu, J. Li, S. Jin, C. Hu, *J. Antibiot.*, **60** (2007) 272–276.
70. G. Schlotterbeck, S. M. Ceccarelli, *Bioanalysis*, **1** (2009) 549–559.
71. P. C. Barrow, *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, 2013., str. 575–586.
72. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers, *Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction*, Wiley, Weinheim, 2008., str. 207–254.
73. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna Analiza Spojeva Spektroskopskim Metodama*, TIVA, Varaždin, 2013., str. 5–62.
74. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj, *Org. Biomol. Chem.*, **3** (2005) 39–47.
75. J. Gharbi-Benarous, M. Delaforge, C. K. Jankowski, J. P. Girault, *J. Med. Chem.*, **34** (1991) 1117–1125.
76. H. Steinmetz, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, R. Jansen, *Chem. Eur. J.*, **13** (2007) 5822–5832.
77. S. Schieferdecker, S. König, C. Weigel, H. M. Dahse, O. Werz, M. Nett, *Chem. Eur. J.*, **20** (2014) 15933–15940.
78. P. Przybylski, K. Pyta, J. Stefańska, B. Brzezinski, F. Bartl, *Magn. Reson. Chem.*, **48** (2010) 286–296.
79. S. Erturk, E. S. Aktas, L. Ersoy, S. Ficicioglu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33** (2003) 1017–1023.

## § 8. DODATAK

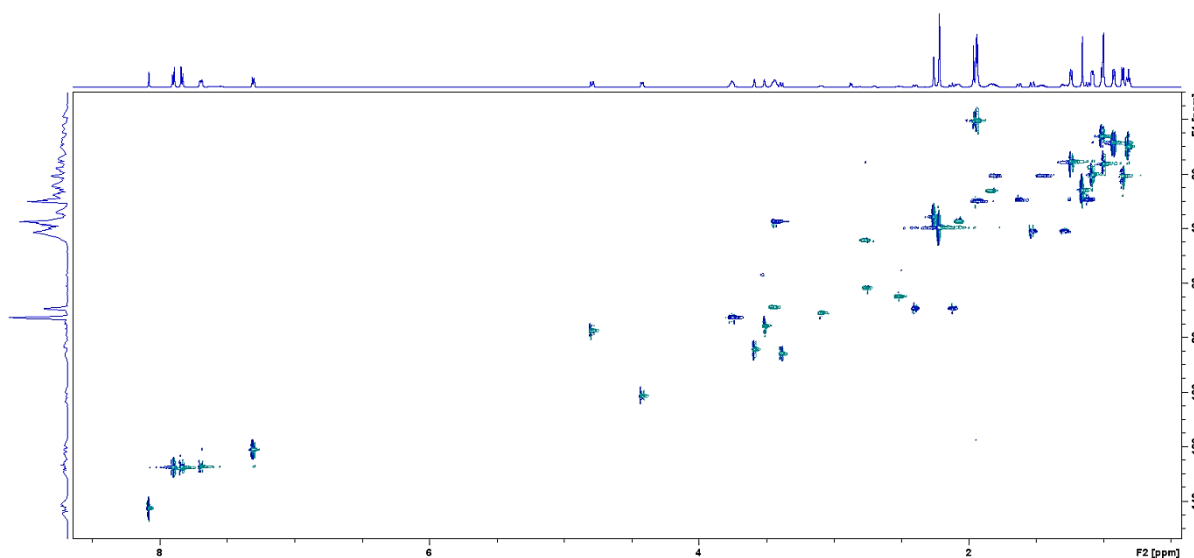
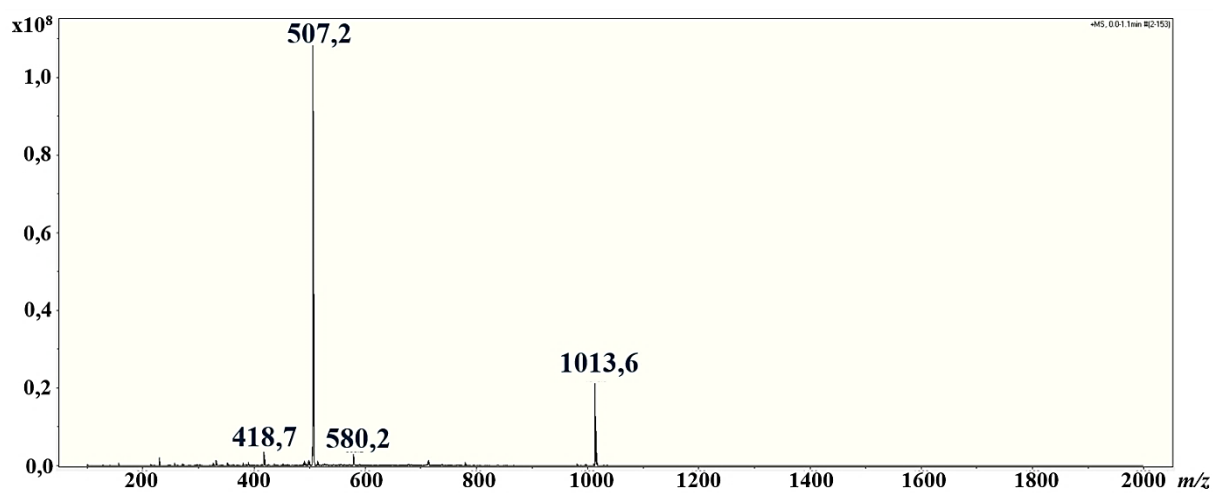


Slika D1. Prošireni dio spektra COSY spoja P2-8.

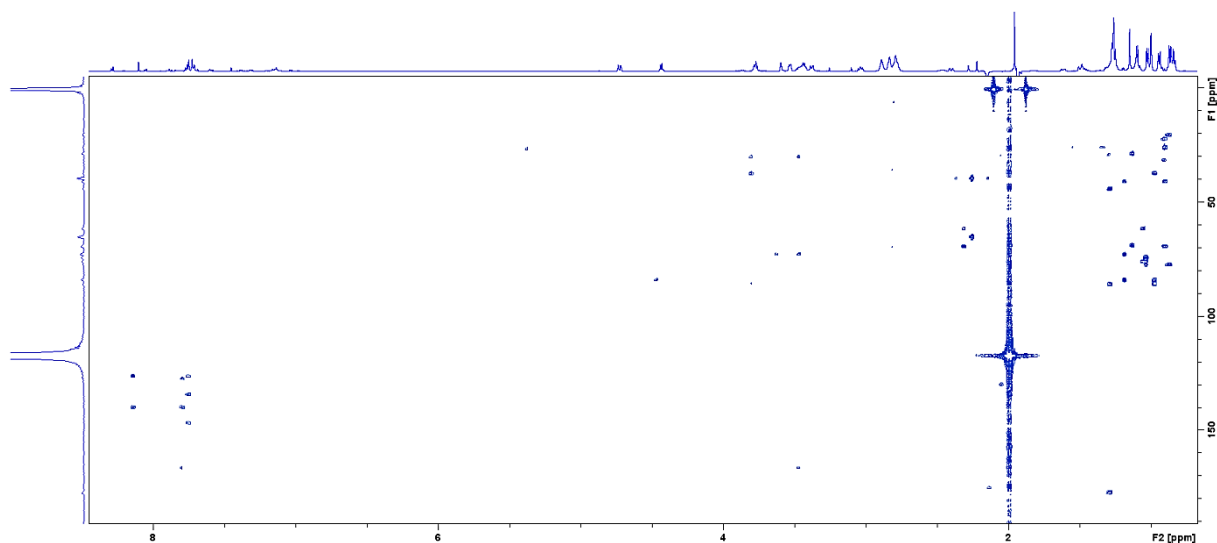
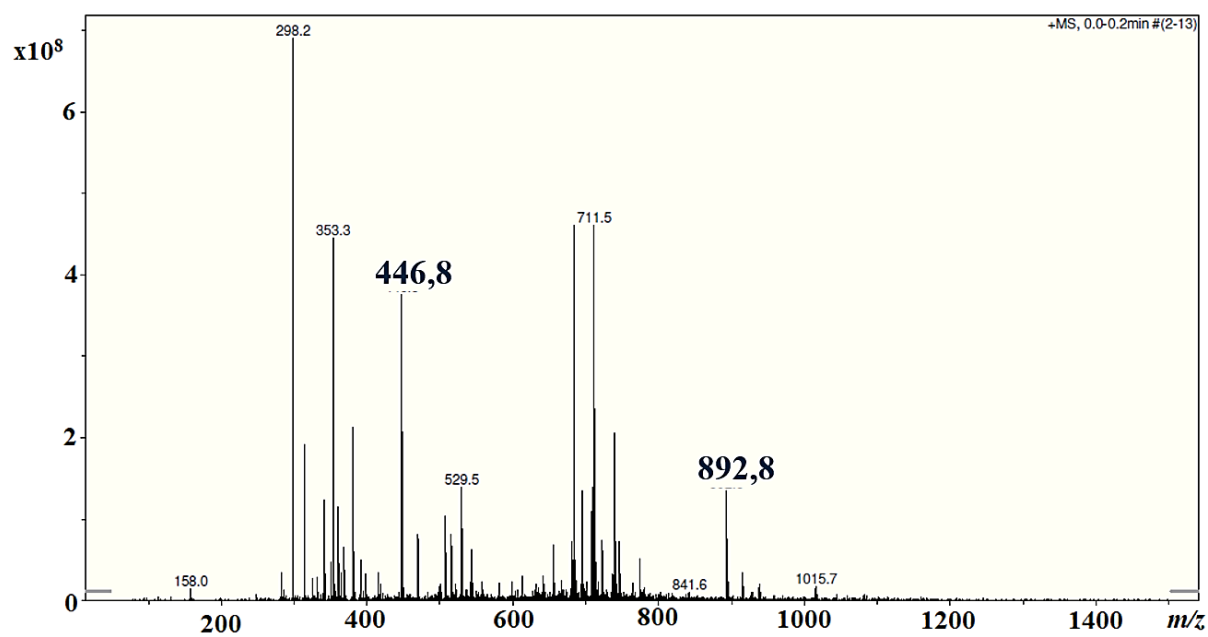
Slika D2. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja P2-8.



Slika D3. Spektar COSY makrozona 3-8.

Slika D4. Spektar <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC makrozona 3-8.

Slika D5. Spektar ESI-MS makrozona 3-8.

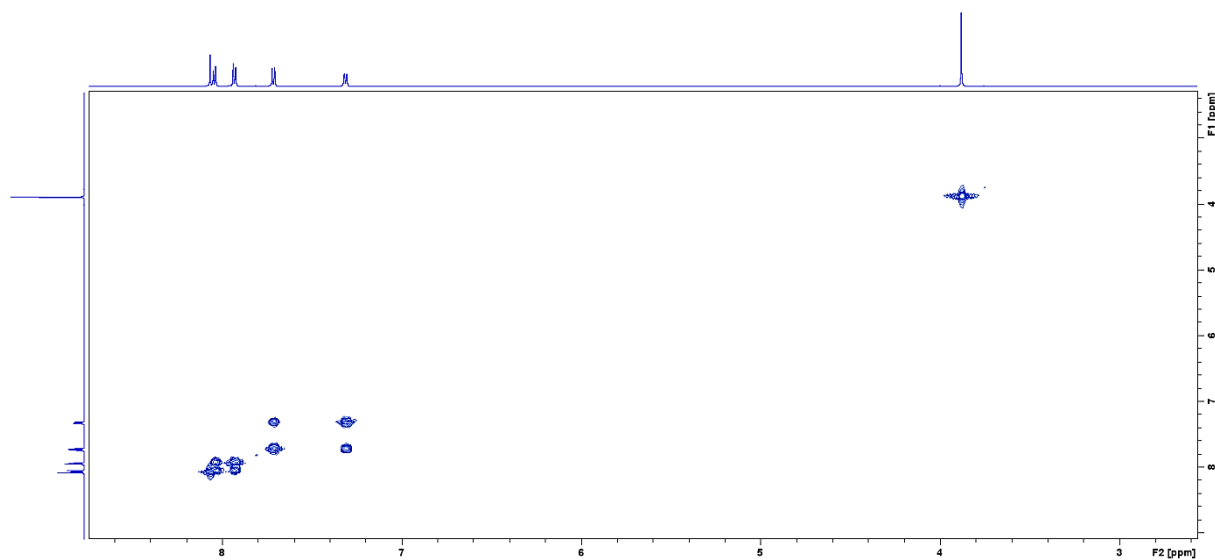
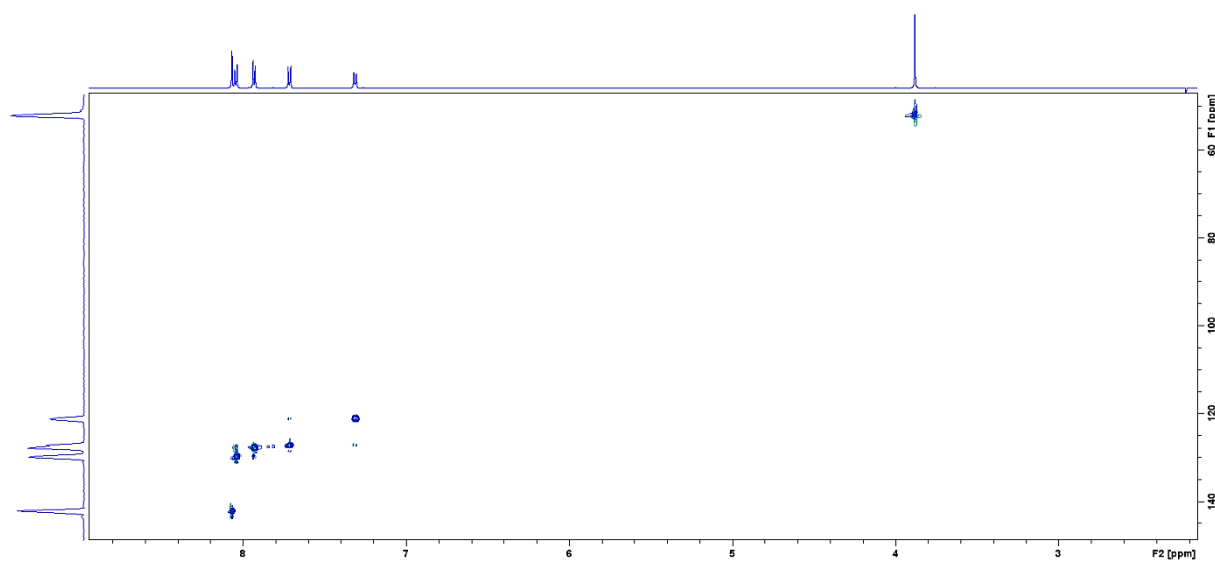
Slika D6. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja 3-8-a.

Slika D7. Spektar ESI-MS spoja 3-8-a.

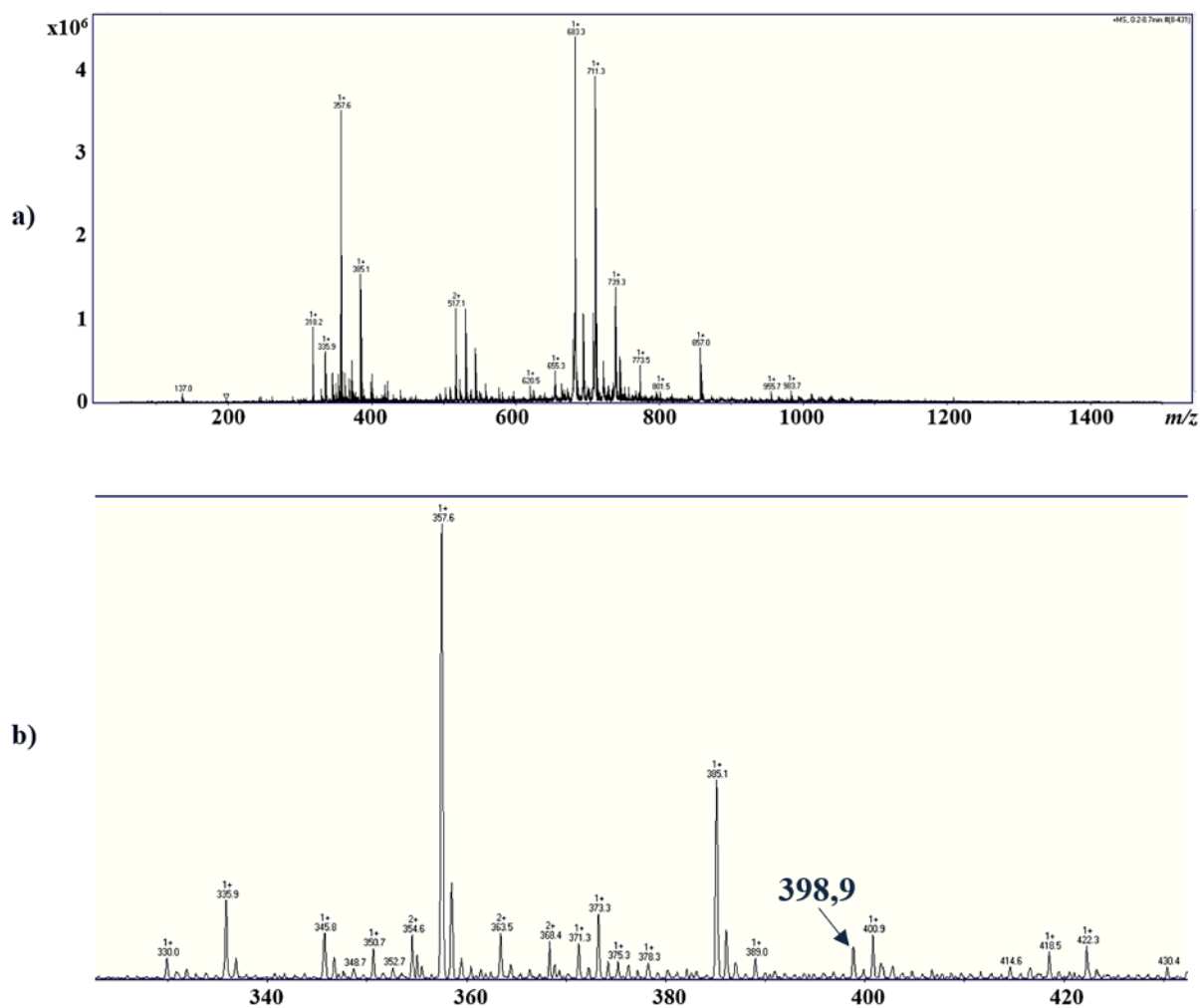
Tablica D1. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-a** assignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

spoj 3-8-a					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	–	177,28	<b>14eq; 14ax</b>	1,81; 1,48	20,72
<b>2</b>	2,79	44,33	<b>14Me</b>	0,84	10,28
<b>2Me</b>	1,25	15,68	<b>1'</b>	4,43	101,61
<b>3</b>	3,38	86,07	<b>2'</b>	3,04	70,73
<b>4</b>	2,11	37,52	<b>2'OH</b>	–*	–
<b>4Me</b>	0,94	8,71	<b>3'</b>	2,47	65,39
<b>5</b>	3,59	84,18	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,21	39,66
<b>6</b>	–	72,86	<b>4'eq; 4'ax</b>	1,61; 1,11	28,97
<b>6Me</b>	1,15	26,16	<b>5'</b>	3,44	68,99
<b>6OH</b>	–*	–	<b>5'Me</b>	1,10	20,52
<b>7eq; 7ax</b>	1,51; 1,30	41,17	<b>3a</b>	3,77	72,96
<b>8</b>	1,83	26,12	<b>3b</b>	1,94	30,19
<b>8Me</b>	0,87	20,82	<b>3c</b>	3,43	37,51
<b>9eq; 9ax</b>	2,40; 2,14	69,54	<b>3d</b>	7,17	–
<b>9a-N</b>	2,28	35,91	<b>15</b>	–	166,52
<b>10</b>	2,77	61,75	<b>16</b>	–	135,86
<b>10Me</b>	1,02	6,46	<b>17;21</b>	7,75	127,33
<b>11</b>	3,54	76,28	<b>18;20</b>	7,72	126,26
<b>11OH</b>	–*	–	<b>19</b>	–	137,22
<b>12</b>	–	74,19	<b>22</b>	8,10	146,76
<b>12Me</b>	1,00	16,29	<b>22a</b>	–*	–
<b>12OH</b>	–*	–	<b>22b</b>	–*	–
<b>13</b>	4,74	77,49			

\*signal nije opažen

Slika D8. Prošireni dio spektra COSY spoja **3-8-b**.Slika D9. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja **3-8-b**.



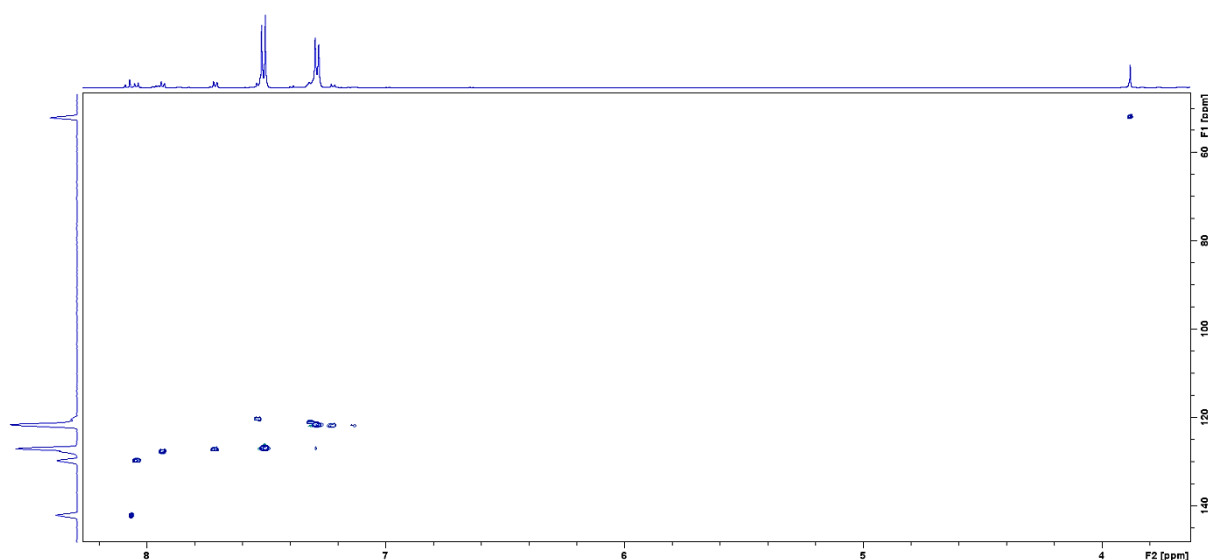


Slika D10. a) Spektar ESI-MS spoja 3-8-b i b) uvećani dio spektra ESI-MS spoja 3-8-b.

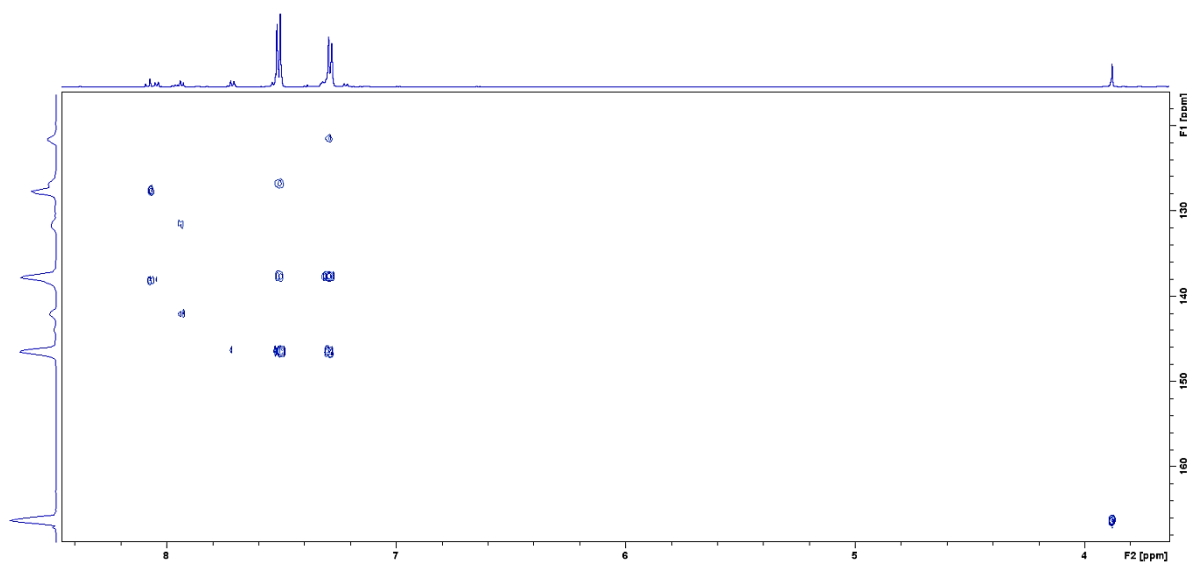
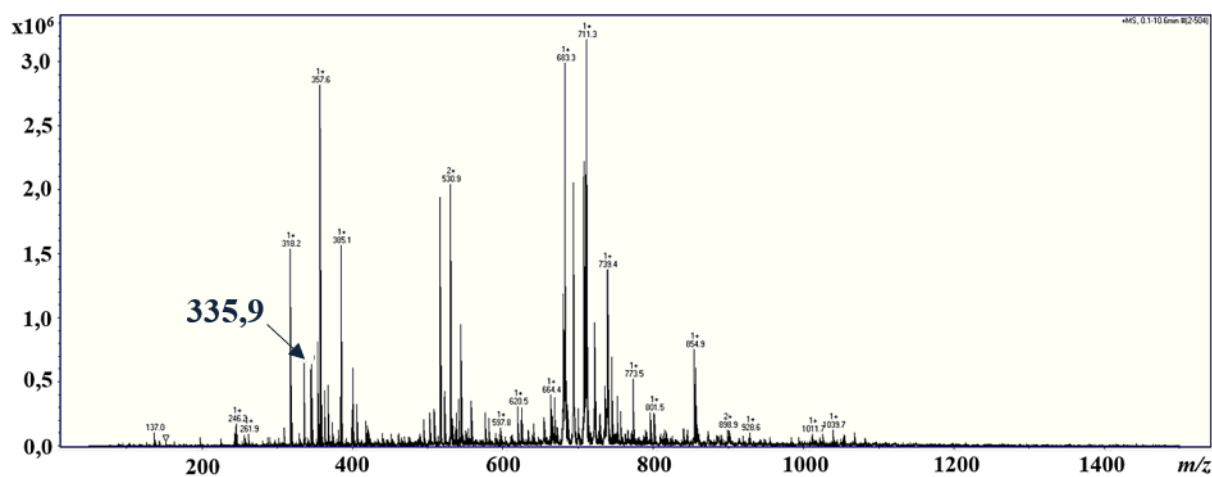
Tablica D2. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-b** assignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

spoj 3-8-b		
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
15	–	166,30
16	–	131,51
17;21	8,04	129,83
18;20	7,93	127,64
19	–	138,15
22	8,07	142,12
22a	–*	–
22b	–*	–
23	–	–*
24	–	137,79
25;29	7,71	127,14
26;28	7,31	121,03
27	–	146,37
30	–	121,17
31	3,88	51,87

\*signal nije opažen



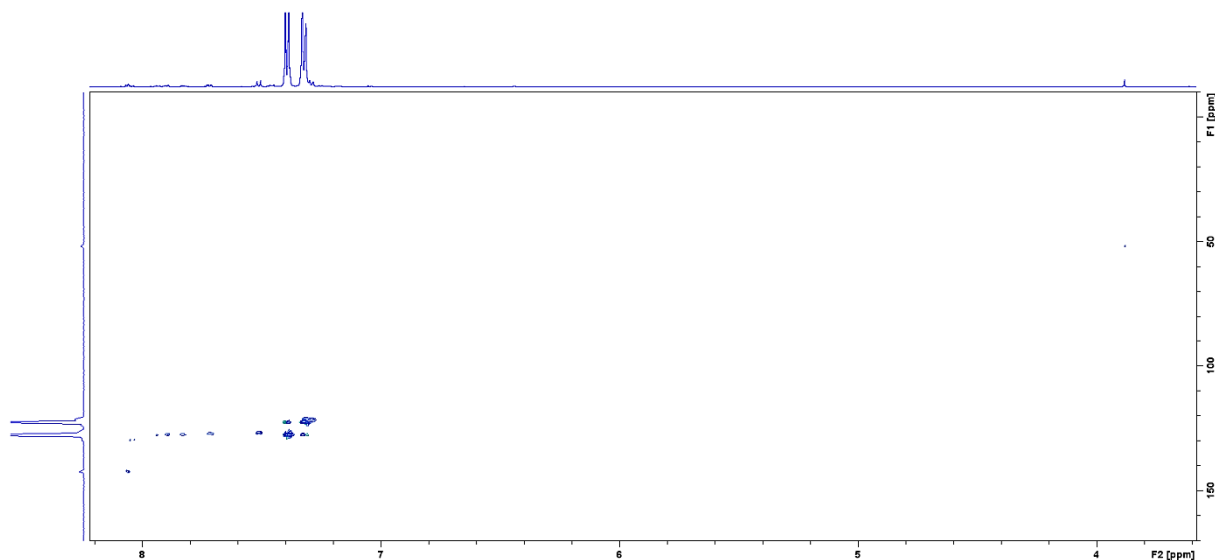
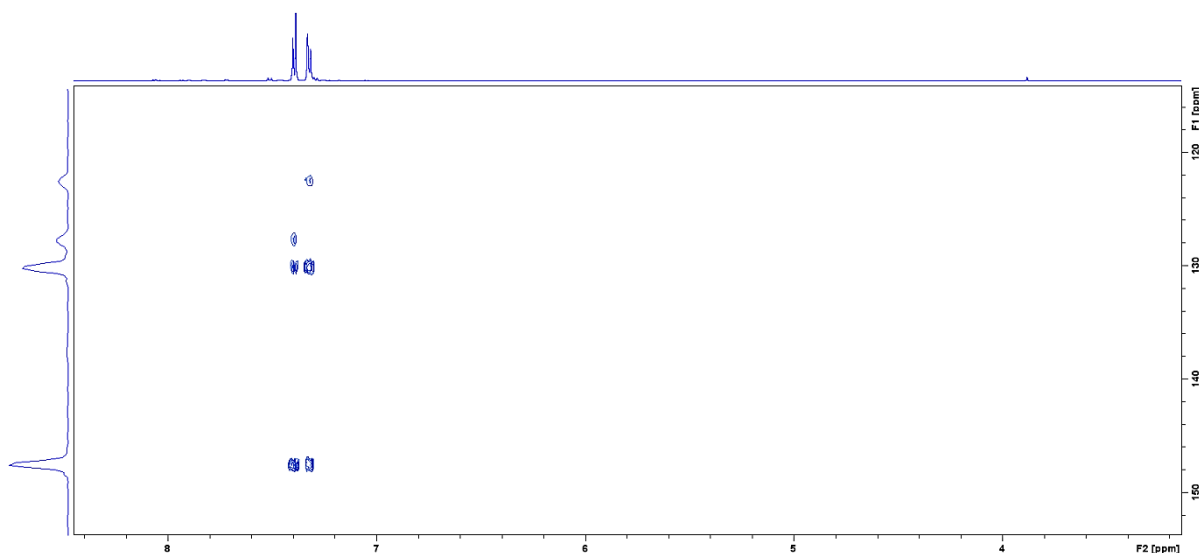
Slika D11. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja **3-8-c**.

Slika D12. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **3-8-c**.Slika D13. Spektar ESI-MS spoja **3-8-c**.

Tablica D3. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-c** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ .

spoj <b>3-8-c</b>		
Atom	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) / ppm	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) / ppm
<b>22a</b>	—*	—
<b>22b</b>	—*	—
<b>23</b>	—	—*
<b>24</b>	—	137,59
<b>25;29</b>	7,51	126,85
<b>26;28</b>	7,29	121,55
<b>27</b>	—	146,52
<b>30</b>	—	121,51

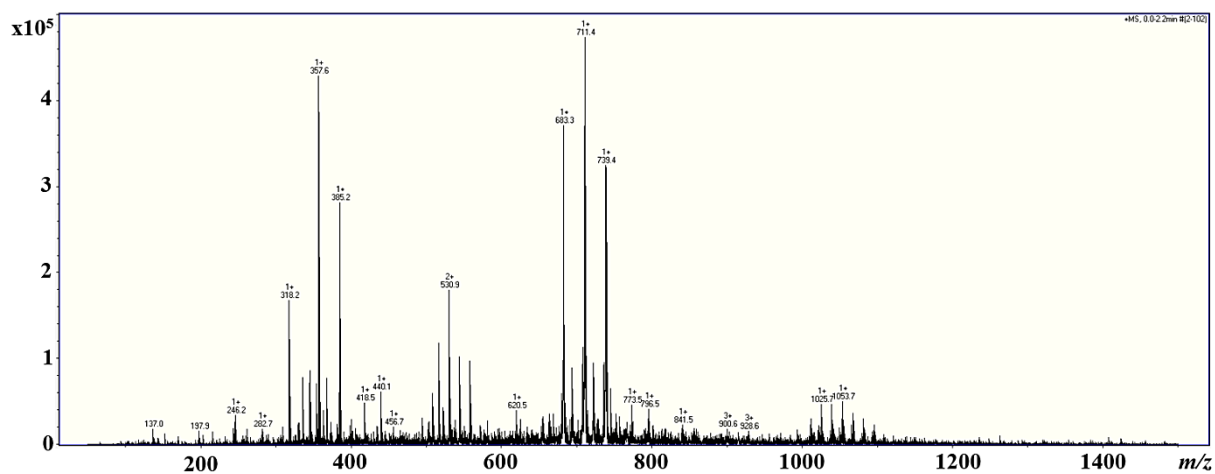
\*signal nije opažen

Slika D14. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja **3-8-d**.Slika D15. Prošireni dio spektra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **3-8-d**.

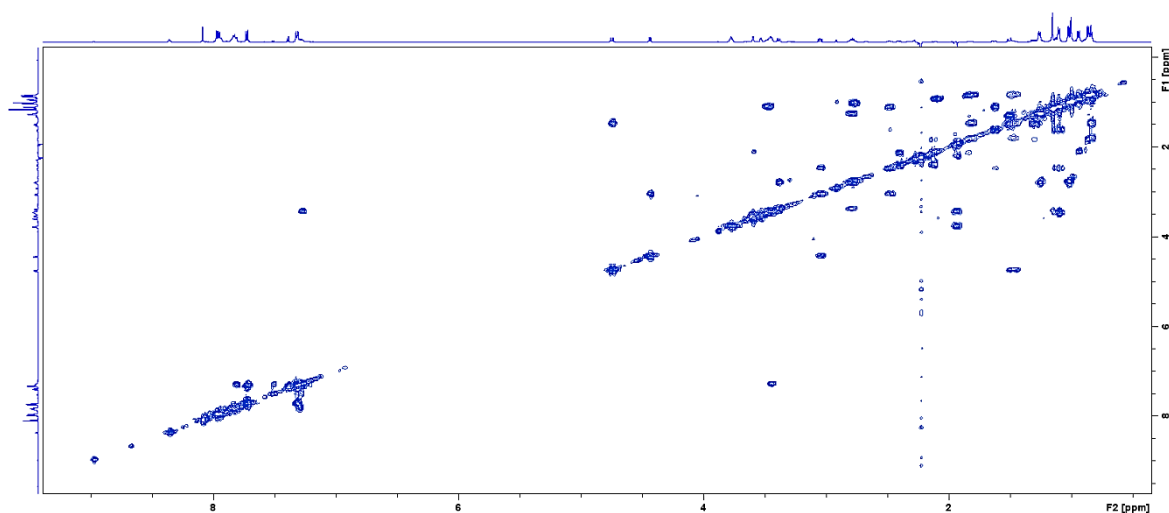
Tablica D4. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-d** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ .

spoj 3-8-d		
Atom	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) / ppm	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) / ppm
<b>22b</b>	—*	—
<b>24</b>	—	130,19
<b>25;29</b>	7,39	127,52
<b>26;28</b>	7,32	122,45
<b>27</b>	—	147,59
<b>30</b>	—	122,45

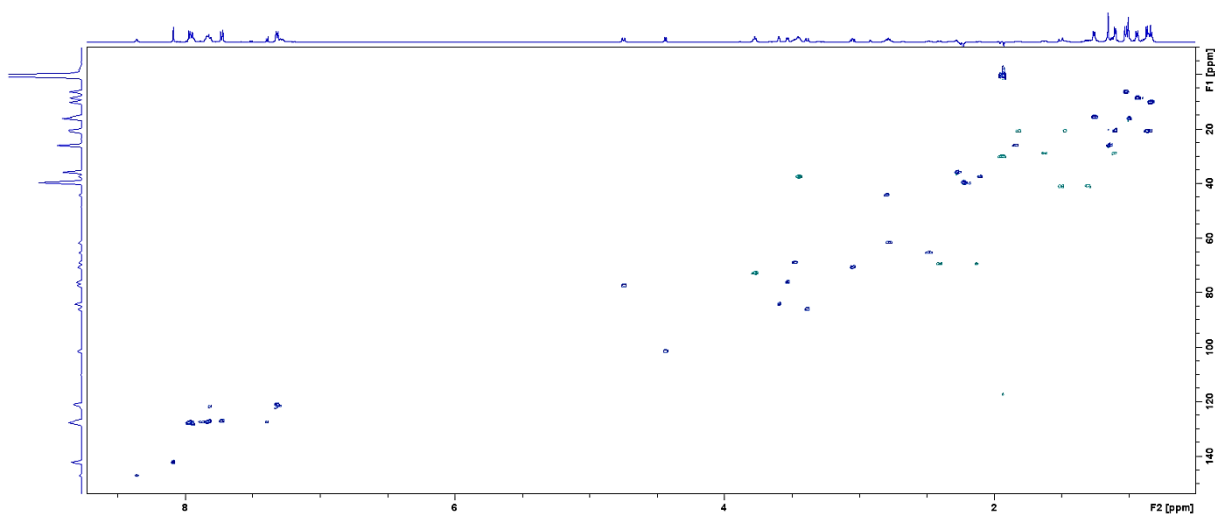
\*signal nije opažen

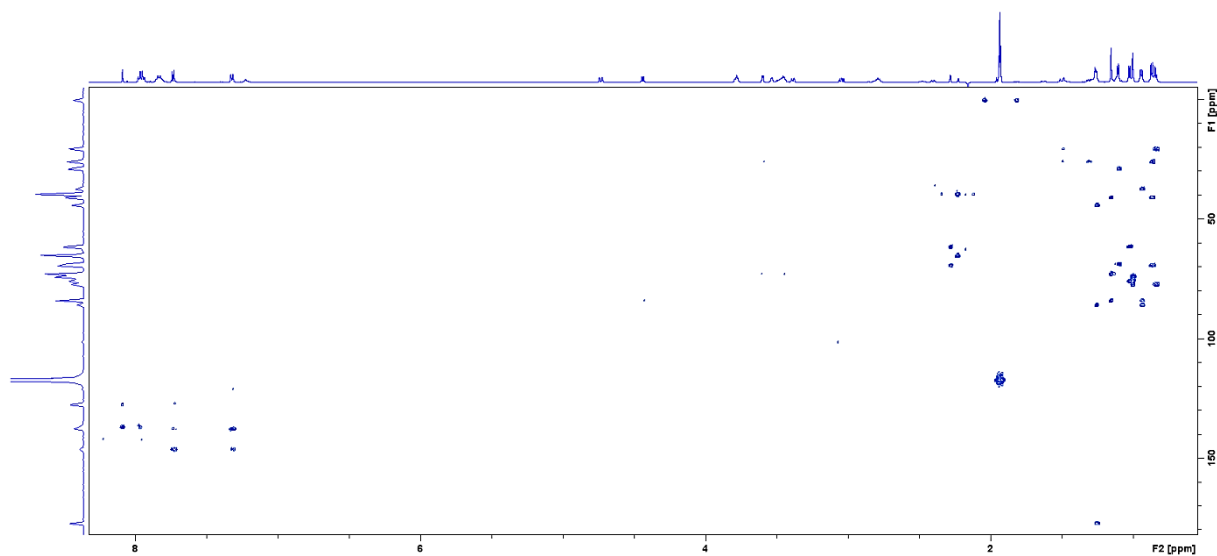
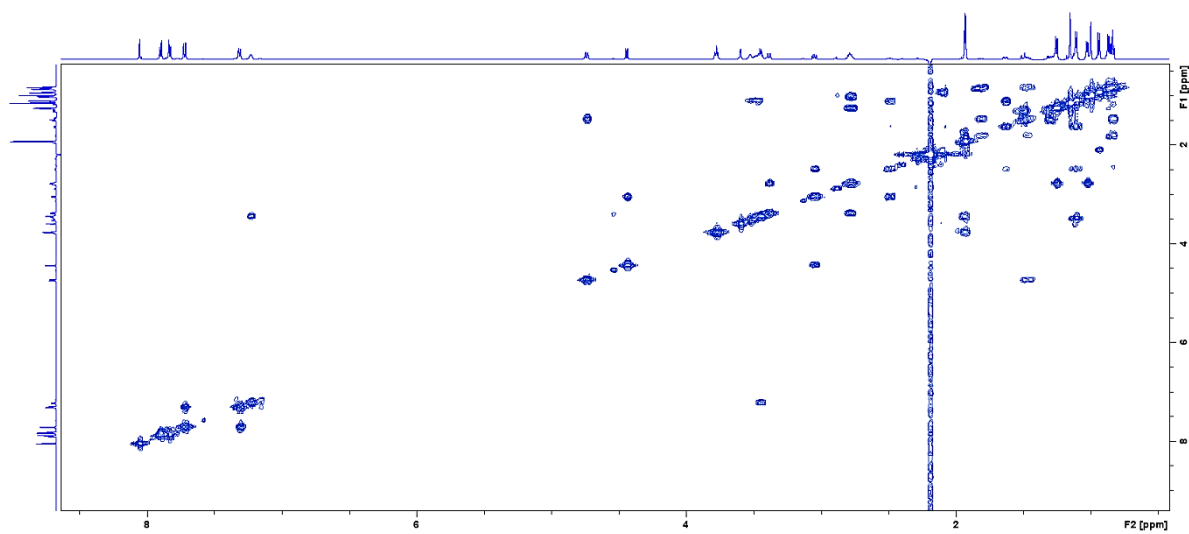


Slika D16. Spektar ESI-MS spoja 3-8-d.

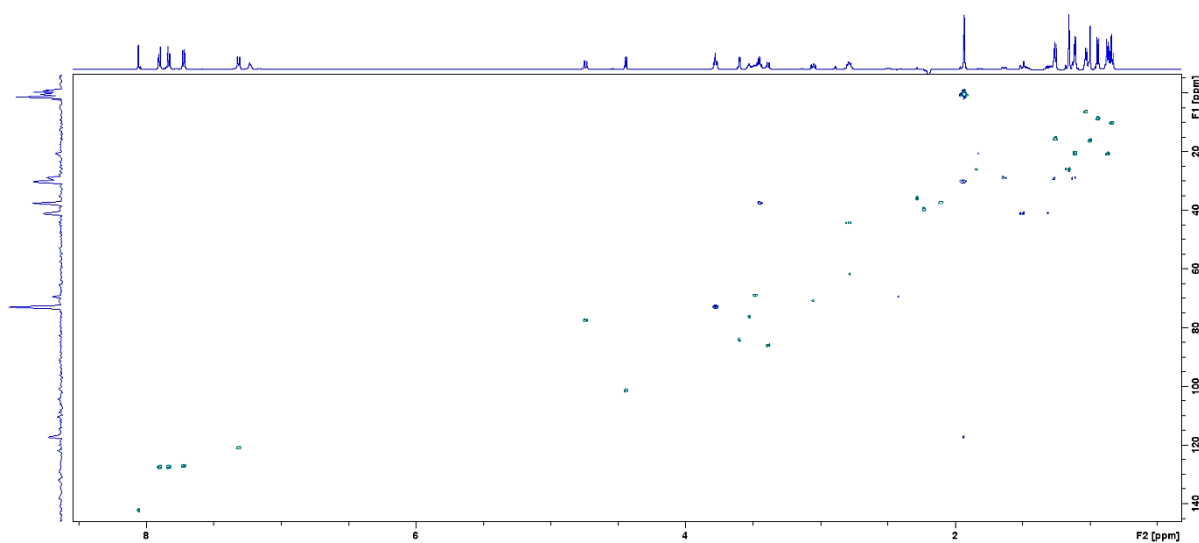
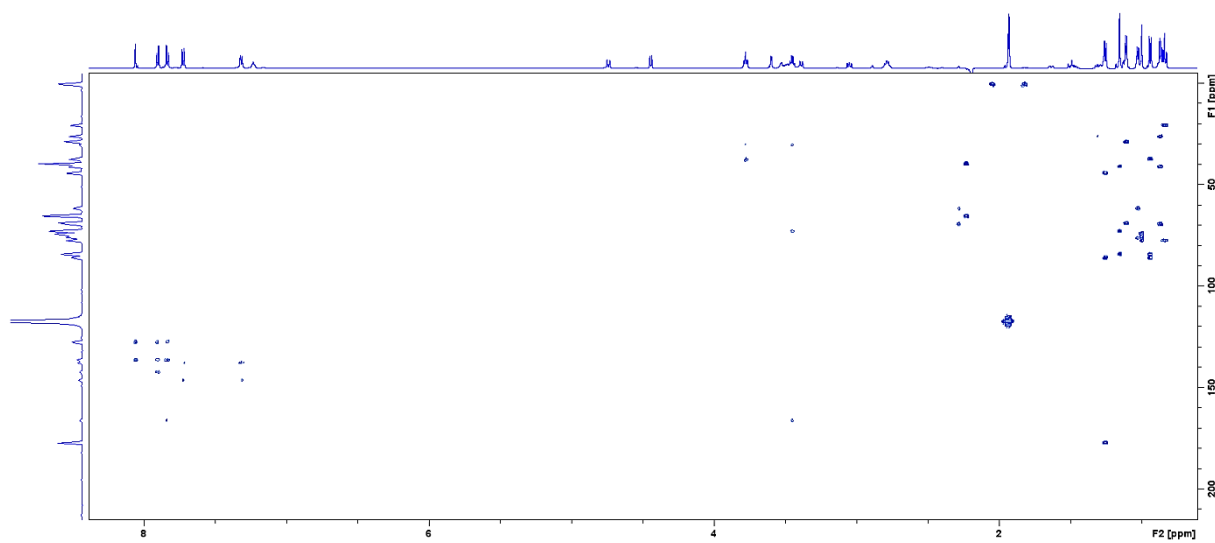


Slika D17. Spektar COSY spoja 3-8-e.

Slika D18. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja 3-8-e.

Slika D19. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja 3-8-e.

Slika D20. Spektar COSY spoja 3-8-f.

Slika D21. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja **3-8-f**.Slika D22. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja **3-8-f**.

Tablica D5. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-e** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

spoj <b>3-8-e</b>					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	–	177,34	<b>1'</b>	4,44	101,54
<b>2</b>	2,80	44,18	<b>2'</b>	3,05	70,75
<b>2Me</b>	1,26	15,56	<b>2'OH</b>	–*	–
<b>3</b>	3,39	86,05	<b>3'</b>	2,49	65,36
<b>4</b>	2,11	37,46	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,22	39,68
<b>4Me</b>	0,94	8,64	<b>4'eq; 4'ax</b>	1,63; 1,11	28,94
<b>5</b>	3,60	84,19	<b>5'</b>	3,47	68,92
<b>6</b>	–	72,94	<b>5'Me</b>	1,10	20,53
<b>6Me</b>	1,16	26,05	<b>3a</b>	3,78	72,94
<b>6OH</b>	–*	–	<b>3b</b>	1,94	30,15
<b>7eq; 7ax</b>	1,51; 1,31	41,08	<b>3c</b>	3,45	37,48
<b>8</b>	1,84	26,13	<b>3d</b>	7,28	–
<b>8Me</b>	0,87	20,82	<b>15</b>	–	–*
<b>9eq; 9ax</b>	2,41; 2,13	69,48	<b>16</b>	–	–*
<b>9a-N</b>	2,28	35,85	<b>17;21</b>	7,84	127,41
<b>10</b>	2,78	61,66	<b>18;20</b>	7,96	127,93
<b>10Me</b>	1,02	6,38	<b>19</b>	–	137,22
<b>11</b>	3,53	76,11	<b>22</b>	8,09	142,19
<b>11OH</b>	–*	–	<b>22a</b>	–*	–
<b>12</b>	–	74,28	<b>22b</b>	–*	–
<b>12Me</b>	1,00	16,18	<b>23</b>	–	–*
<b>12OH</b>	2,92?	–	<b>24</b>	–	137,84
<b>13</b>	4,75	77,49	<b>25;29</b>	7,73	127,12
<b>14eq; 14ax</b>	1,82; 1,48	20,68	<b>26;28</b>	7,32	121,00
<b>14Me</b>	0,84	10,21	<b>27</b>	–	146,38
			<b>30</b>	–	121,13

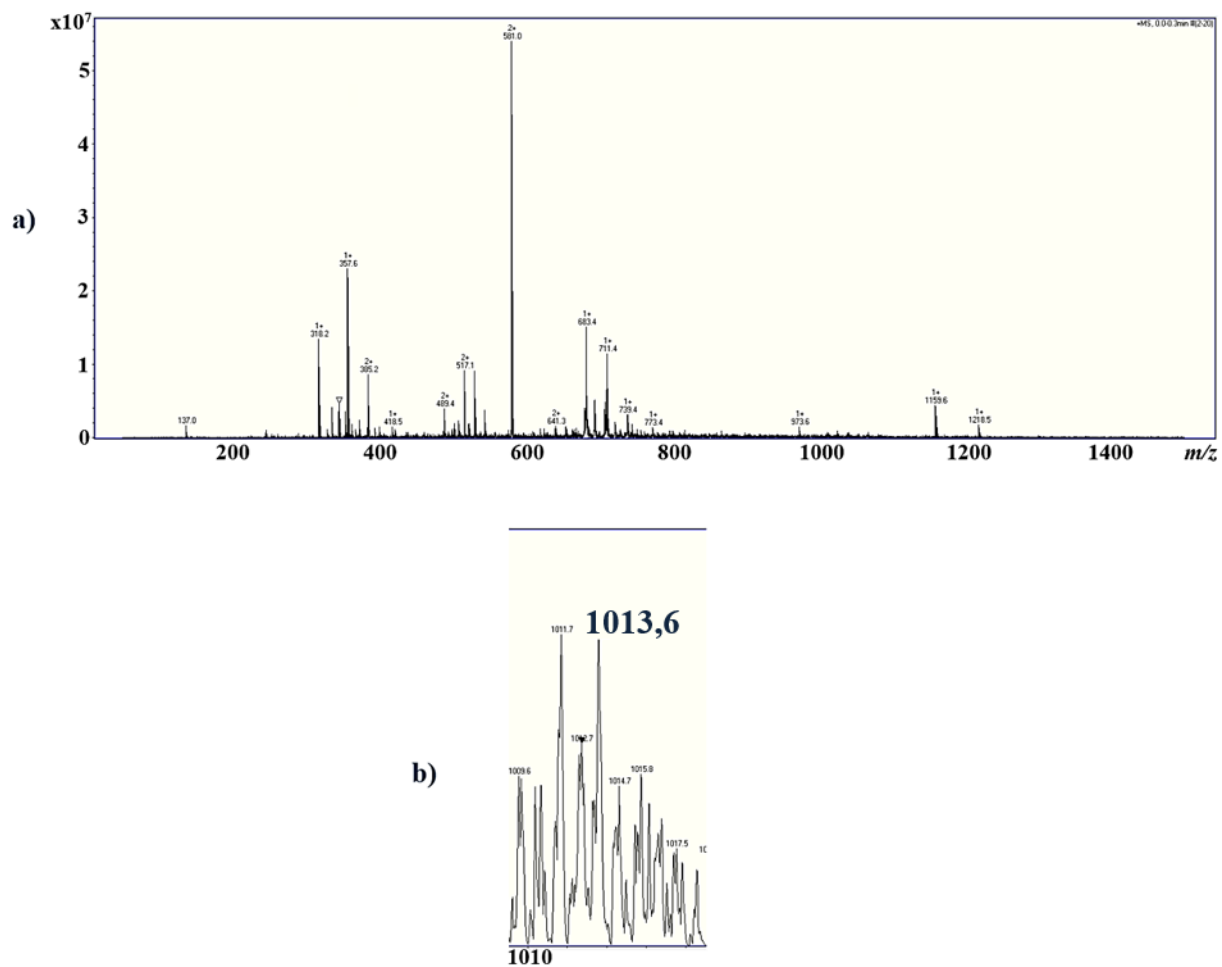
\*signal nije opažen



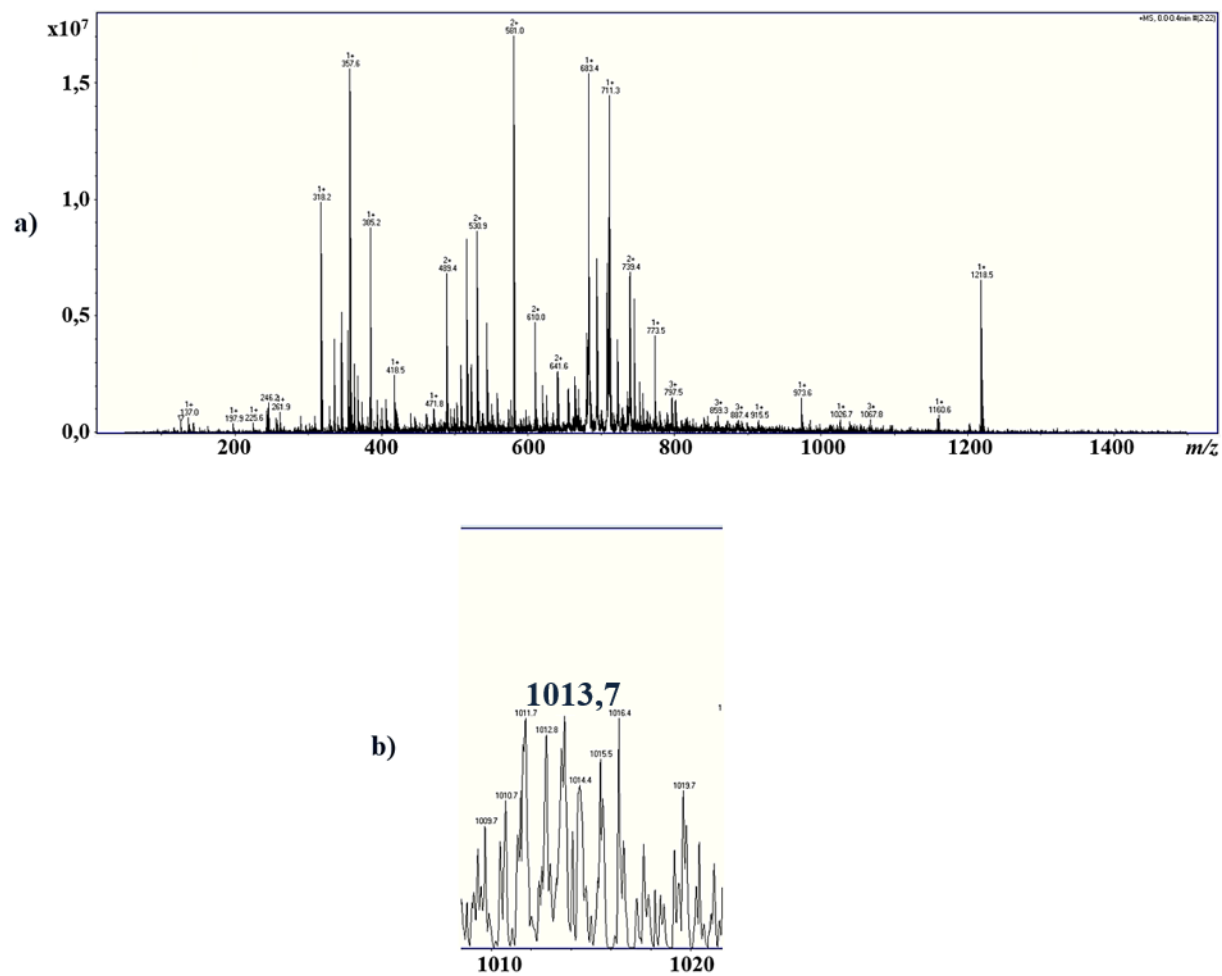
Tablica D6. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-8-f** assignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

spoj 3-8-f					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	–	177,25	<b>1'</b>	4,44	101,56
<b>2</b>	2,78	44,22	<b>2'</b>	3,05	70,72
<b>2Me</b>	1,25	15,66	<b>2'OH</b>	–*	–
<b>3</b>	3,38	85,97	<b>3'</b>	2,49	65,31
<b>4</b>	2,11	37,42	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,23	39,71
<b>4Me</b>	0,94	8,64	<b>4'eq; 4'ax</b>	1,63; 1,11	28,95
<b>5</b>	3,60	84,13	<b>5'</b>	3,49	68,97
<b>6</b>	–	72,97	<b>5'Me</b>	1,11	20,54
<b>6Me</b>	1,15	26,03	<b>3a</b>	3,78	72,94
<b>6OH</b>	–*	–	<b>3b</b>	1,93	30,14
<b>7eq; 7ax</b>	1,50; 1,30	40,98	<b>3c</b>	3,45	37,57
<b>8</b>	1,84	26,13	<b>3d</b>	7,23	–
<b>8Me</b>	0,87	20,82	<b>15</b>	–	166,15
<b>9eq; 9ax</b>	2,40; 2,14	69,47	<b>16</b>	–	136,27
<b>9a-N</b>	2,28	35,87	<b>17;21</b>	7,83	127,53
<b>10</b>	2,78	61,74	<b>18;20</b>	7,90	127,53
<b>10Me</b>	1,03	6,42	<b>19</b>	–	136,43
<b>11</b>	3,53	76,28	<b>22</b>	8,06	142,30
<b>11OH</b>	–*	–	<b>22a</b>	–*	–
<b>12</b>	–	74,38	<b>22b</b>	–*	–
<b>12Me</b>	1,00	16,18	<b>23</b>	–	–*
<b>12OH</b>	3,14?	–	<b>24</b>	–	137,70
<b>13</b>	4,74	77,43	<b>25;29</b>	7,72	127,10
<b>14eq; 14ax</b>	1,82; 1,48	20,73	<b>26;28</b>	7,31	121,01
<b>14Me</b>	0,84	10,21	<b>27</b>	–	146,31
			<b>30</b>	–	–*

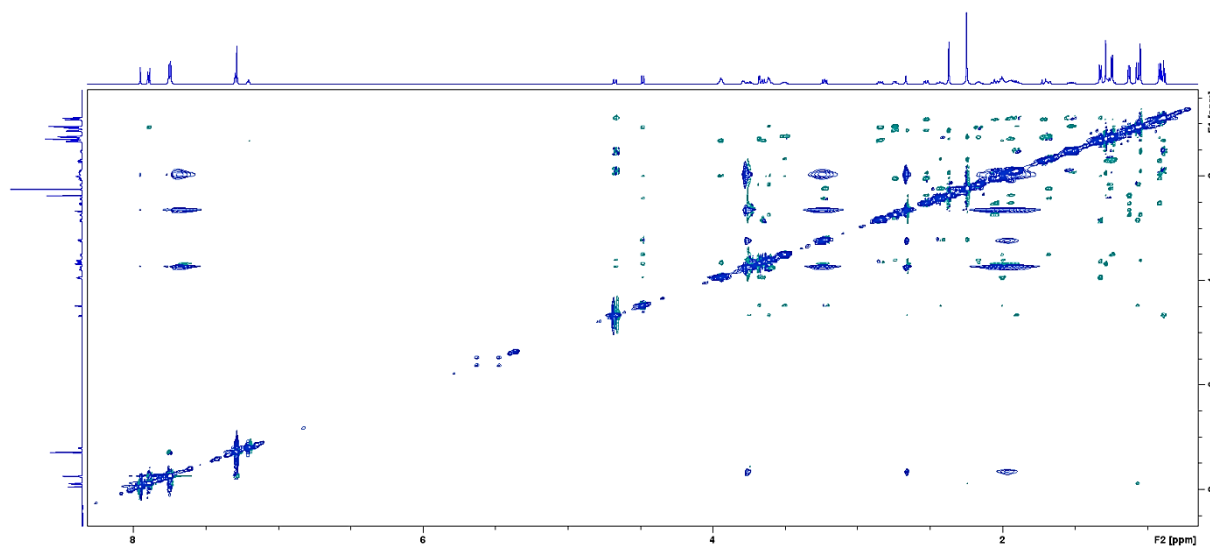
\*signal nije opažen



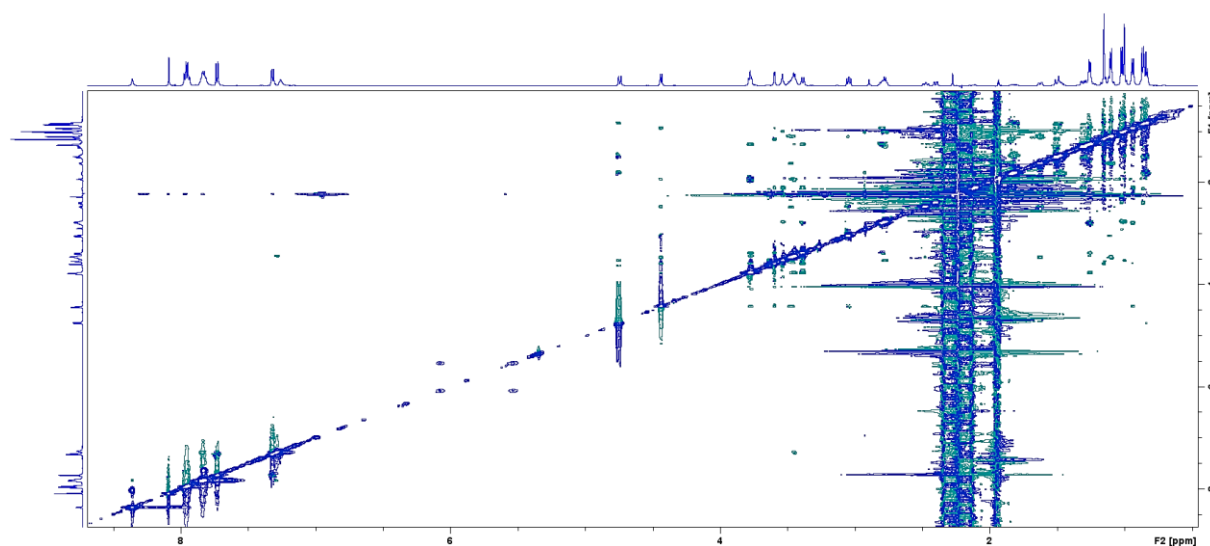
Slika D23. a) Spektar ESI-MS spoja **3-8-e** i b) uvećani spektar ESI-MS spoja **3-8-e**.



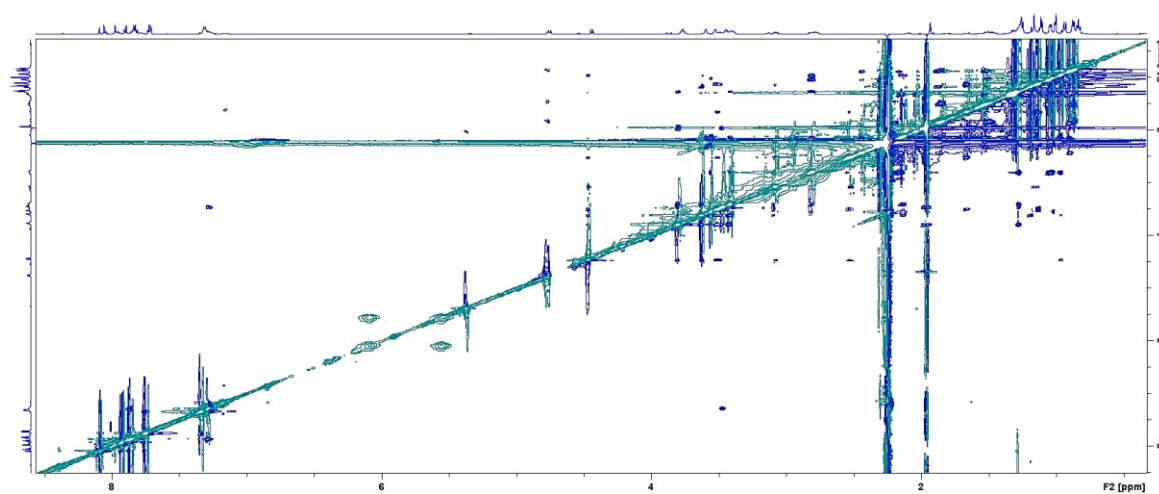
Slika D24. a) Spektar ESI-MS spoja **3-8-f** i b) uvećani spektar ESI-MS spoja **3-8-f**.



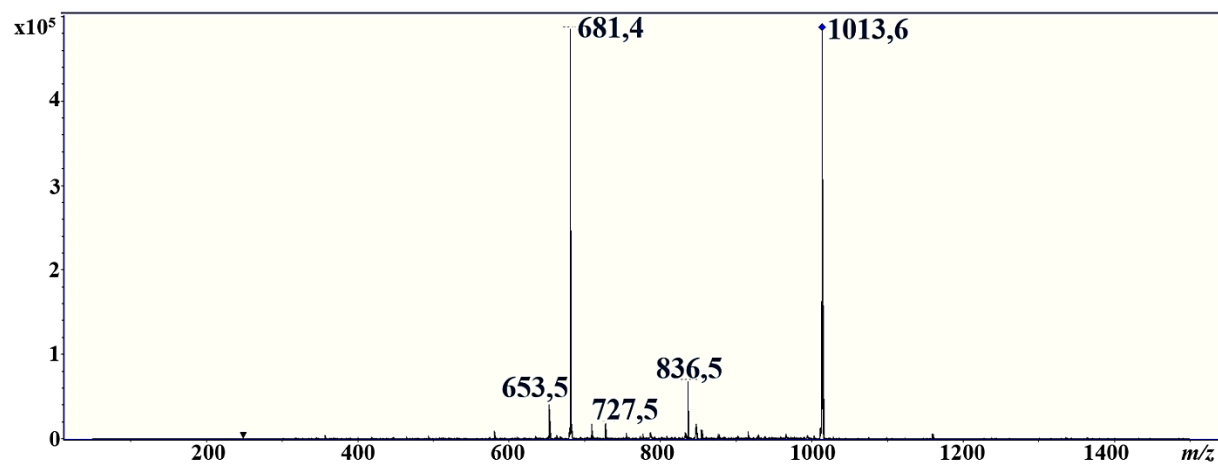
Slika D25. Spektar NOESY makrozona 3-8.



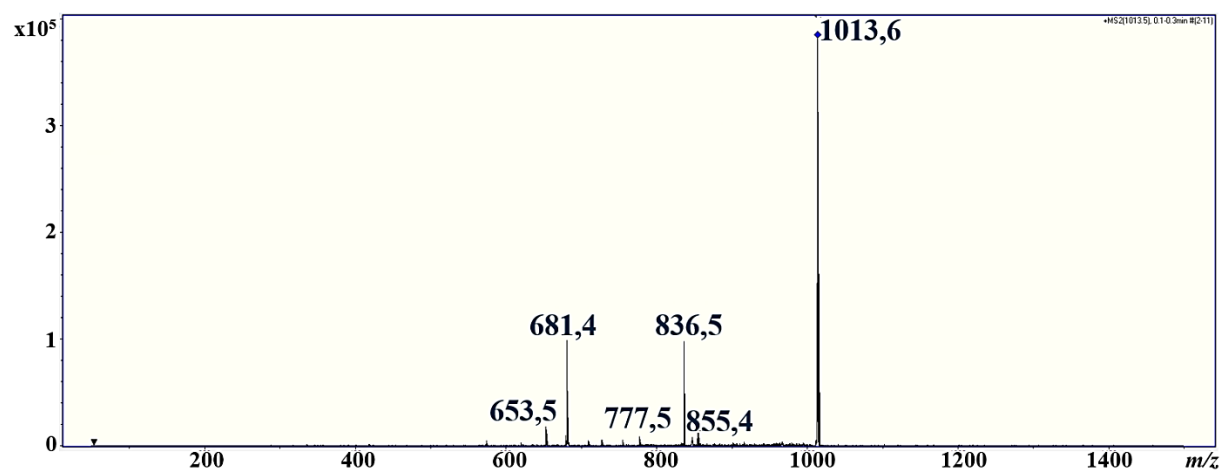
Slika D26. Spektar NOESY spoja 3-8-e.



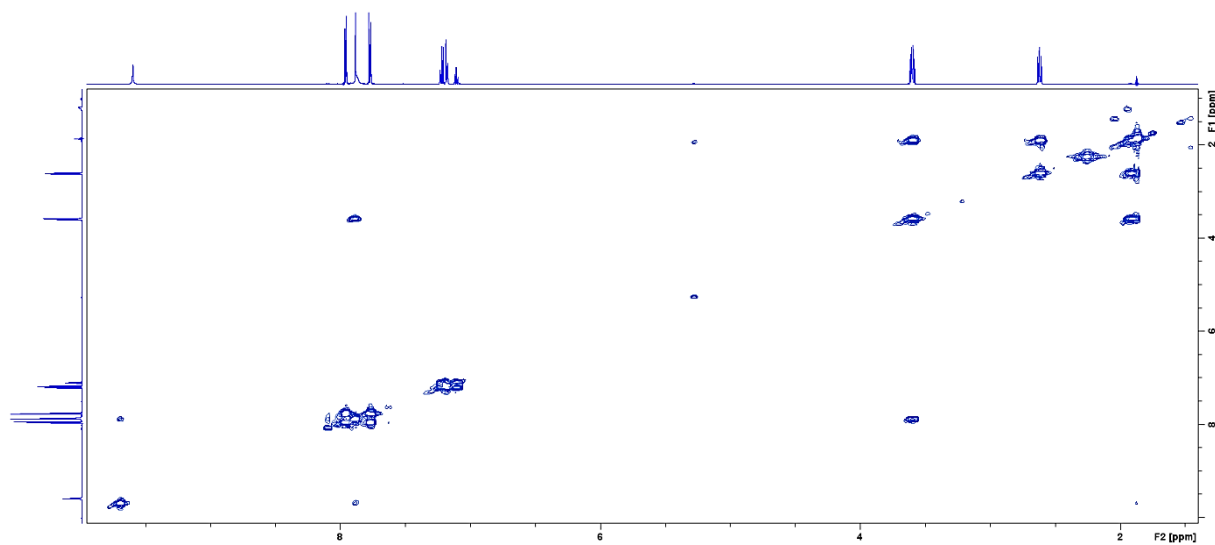
Slika D27. Spektar NOESY spoja 3-8-f.



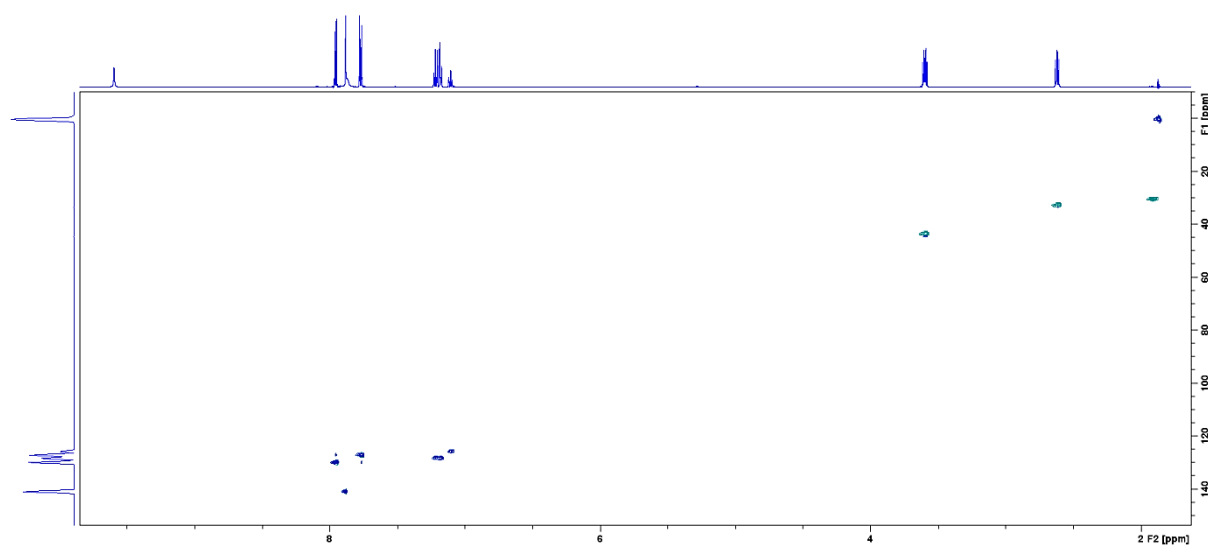
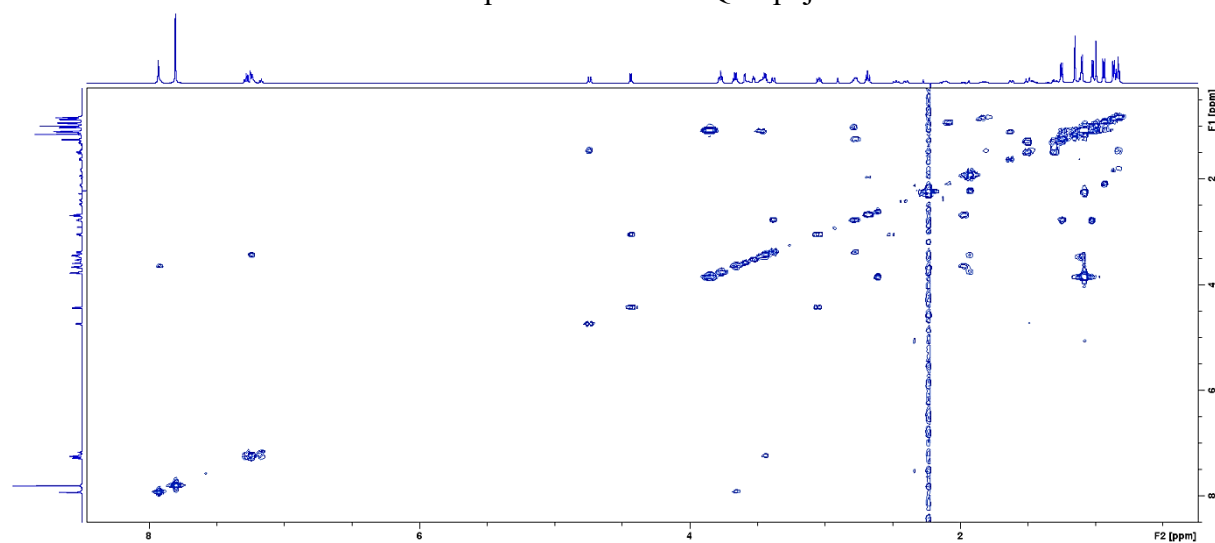
Slika D28. Spektar MS/MS spoja 3-8-e.



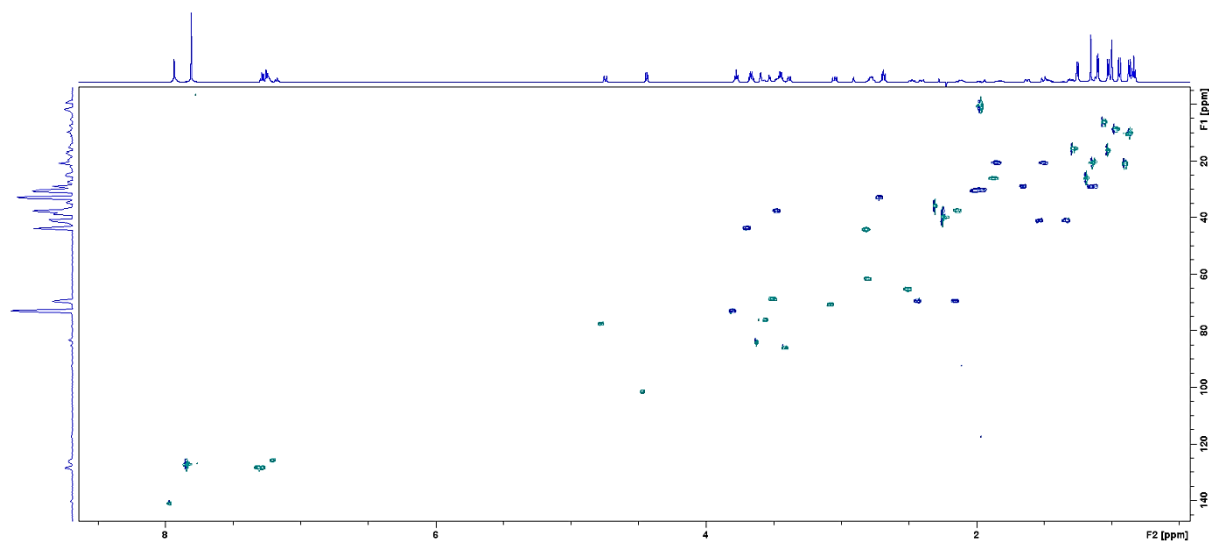
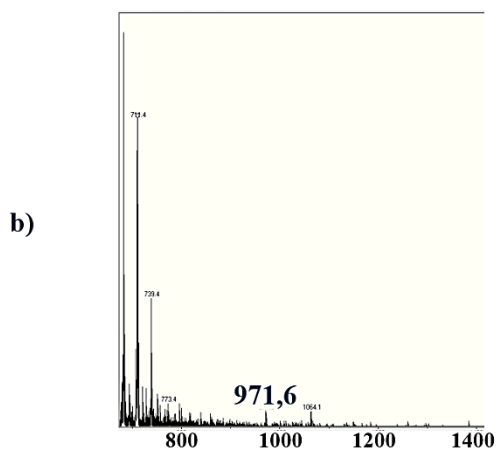
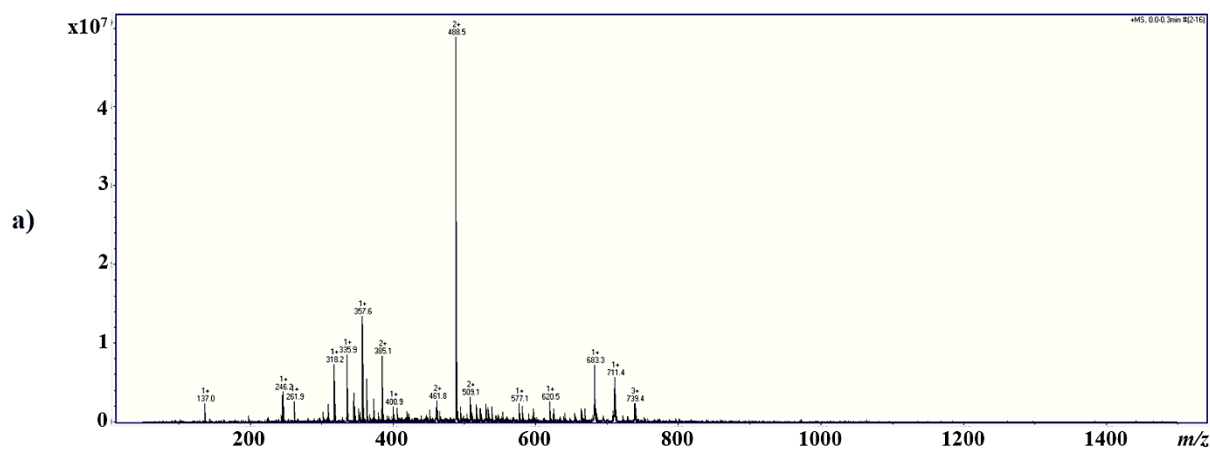
Slika D29. Spektar MS/MS spoja 3-8-f.



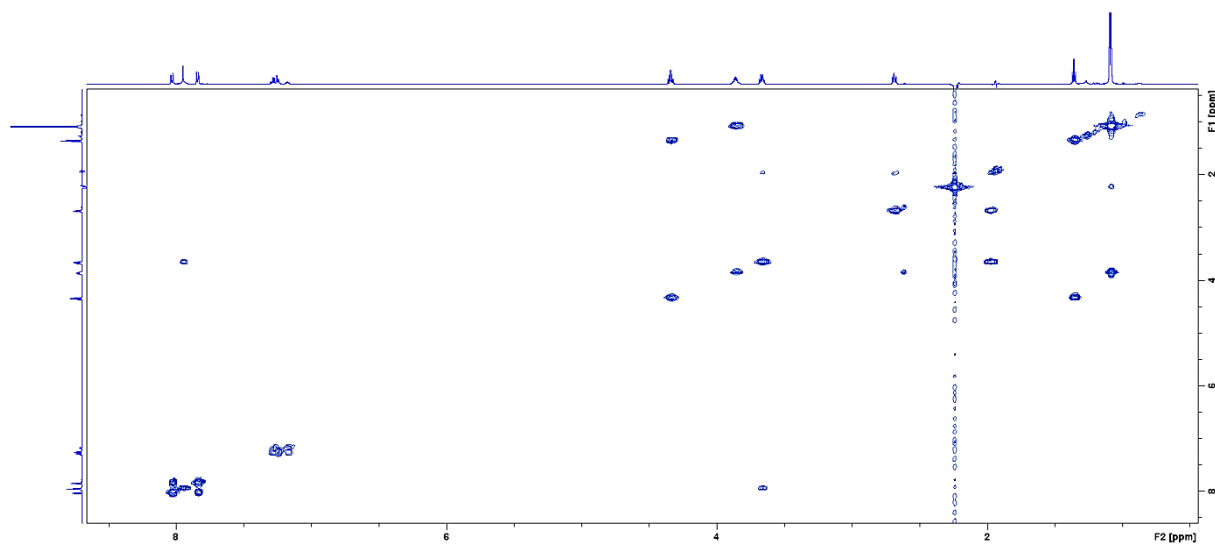
Slika D30. Spektar COSY spoja P2-9.

Slika D31. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja P2-9.

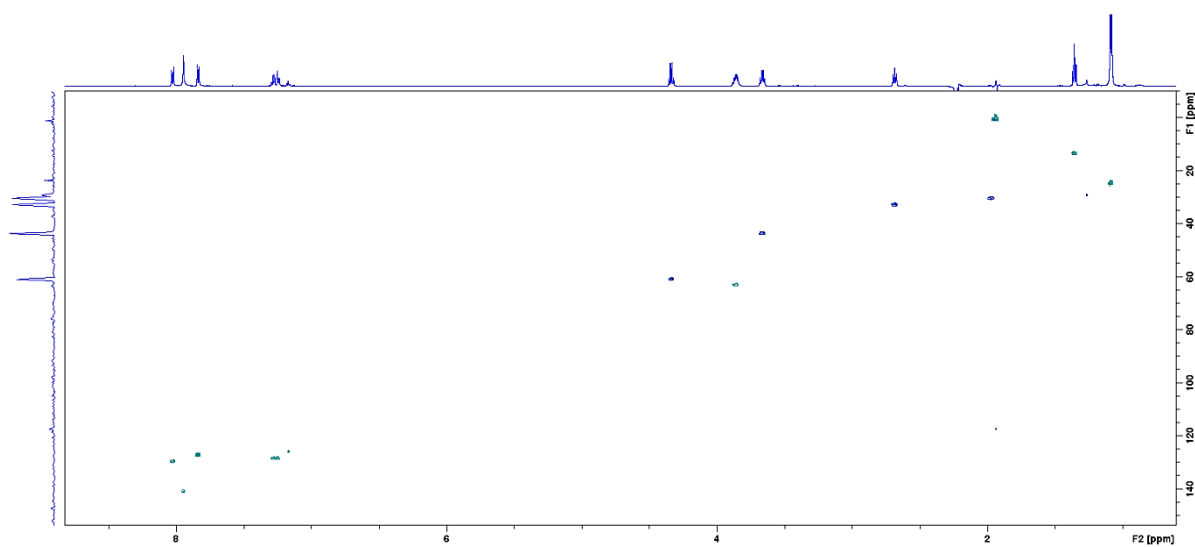
Slika D32. Spektar COSY makrozona 3-9.

Slika D33. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC makrozona 3-9.

Slika D34. a) Spektar ESI-MS makrozona 3-9 i b) uvećani spektar ESI-MS makrozona 3-9.



Slika D35. Spektar COSY spoja 3-9-a.

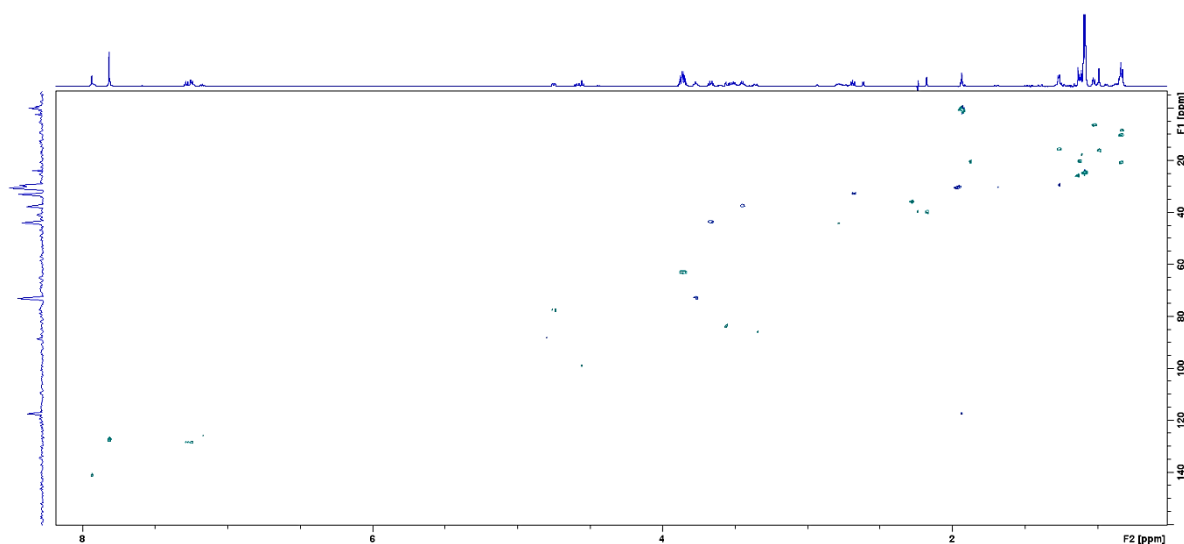
Slika D36. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja 3-9-a.



Tablica D7. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-9-a** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .

spoj 3-9-a		
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
15	–	165,93
16	–	131,55
17;21	8,03	129,61
18;20	7,84	127,28
19	–	138,43
22	7,95	140,96
22a	–*	–
22b	–	–
23	–	178,14
24	3,66	43,68
25	1,94	30,50
26	2,69	32,79
27	–	142,10
28;32	7,26	128,38
29;31	7,26	128,38
30	7,17	125,83
33	4,34	61,00
34	1,36	13,50

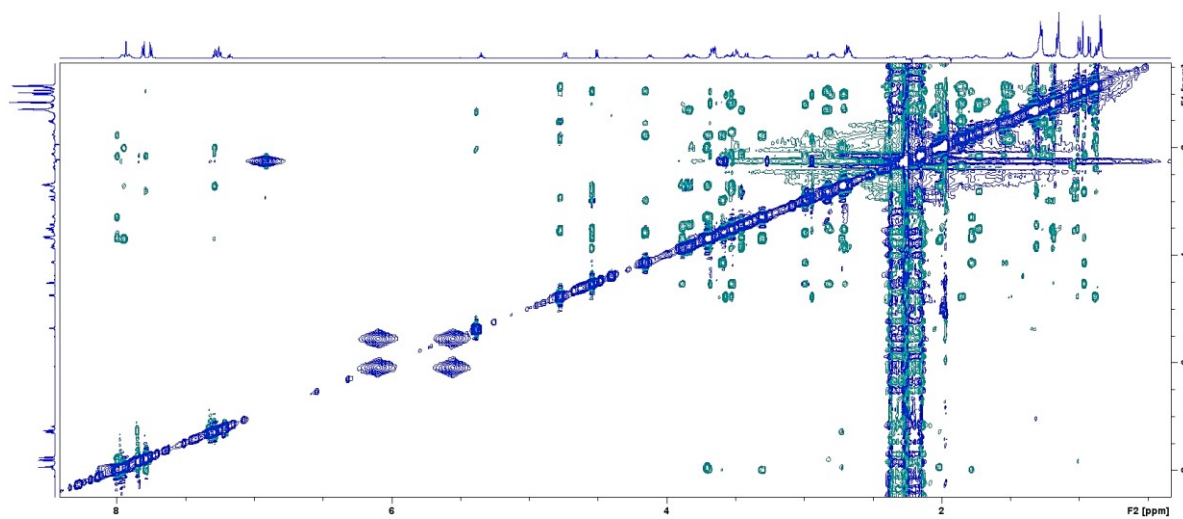
\*signal nije opažen

Slika D37. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja **3-9-b**.

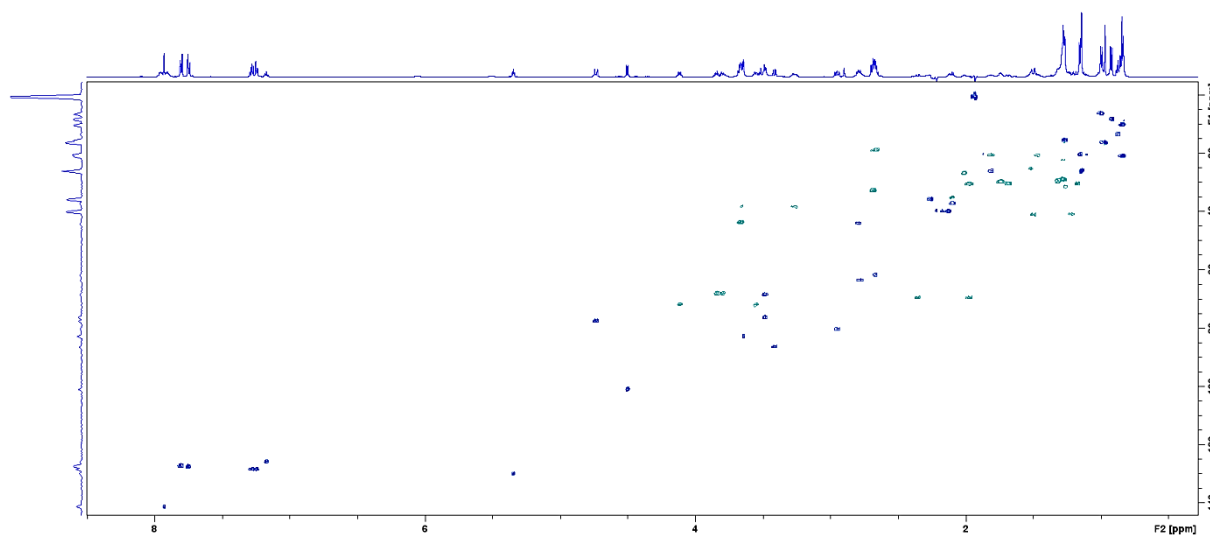
Tablica D8. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR za spoj **3-9-b** asignirani u acetonitrilu- $\text{d}_3$ .

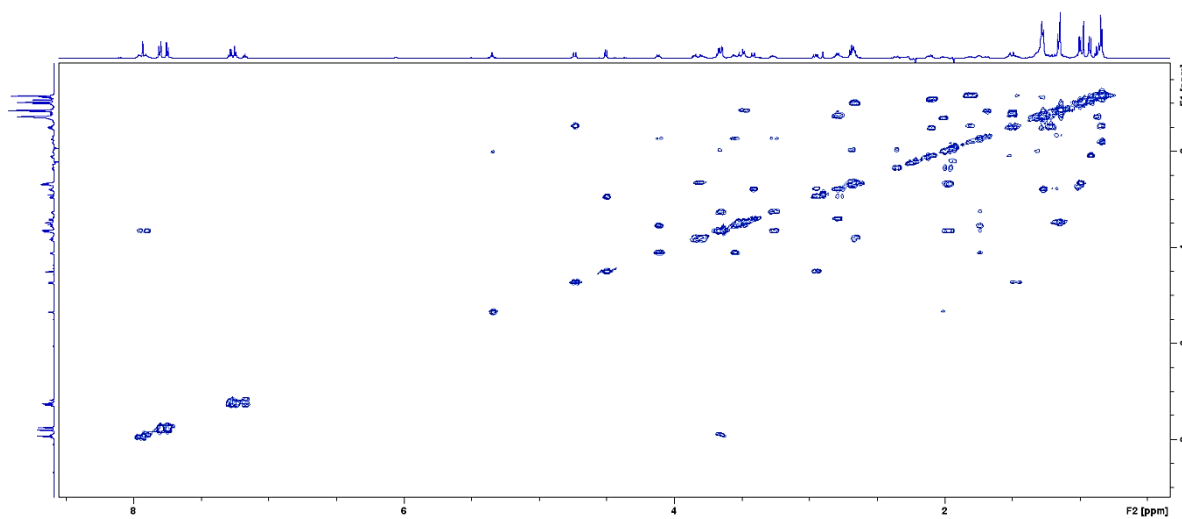
spoj 3-9-b					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	–	177,2	<b>2'OH</b>	–*	–
<b>2</b>	2,78	44,24	<b>3'</b>	2,76	62,70
<b>2Me</b>	1,26	15,64	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,18	39,86
<b>3</b>	3,36	86,03	<b>4'eq; 4'ax</b>	1,70; 1,24	30,27
<b>4</b>	2,08	37,60	<b>5'</b>	3,49	68,67
<b>4Me</b>	0,83	8,48	<b>5'Me</b>	1,12	20,34
<b>5</b>	3,56	83,75	<b>3a</b>	3,77	72,85
<b>6</b>	–	72,92	<b>3b</b>	1,96	30,18
<b>6Me</b>	1,13	25,95	<b>3c</b>	3,45	37,51
<b>6OH</b>	–*	–	<b>3d</b>	7,24	–
<b>7eq; 7ax</b>	1,50; 1,30	40,70	<b>15</b>	–	166,28
<b>8</b>	1,84	26,10	<b>16</b>	–	136,09
<b>8Me</b>	0,84	20,85	<b>17;21</b>	7,81	127,34
<b>9eq; 9ax</b>	2,40; 2,12	69,50	<b>18;20</b>	7,81	127,34
<b>9a-N</b>	2,28	35,88	<b>19</b>	–	136,81
<b>10</b>	2,73	62,82	<b>22</b>	7,94	141,11
<b>10Me</b>	1,02	6,37	<b>22a</b>	–*	–
<b>11</b>	3,50	76,09	<b>22b</b>	7,92	–
<b>11OH</b>	–*	–	<b>23</b>	–	178,10
<b>12</b>	–	74,20	<b>24</b>	3,66	43,68
<b>12Me</b>	0,99	16,28	<b>25</b>	1,98	30,33
<b>12OH</b>	–*	–	<b>26</b>	2,69	32,84
<b>13</b>	4,75	77,52	<b>27</b>	–	142,06
<b>14eq; 14ax</b>	1,82; 1,47	20,70	<b>28;32</b>	7,25	128,41
<b>14Me</b>	0,84	10,20	<b>29;31</b>	7,28	128,41
<b>1'</b>	4,55	98,98	<b>30</b>	7,17	125,82
<b>2'</b>	4,58	71,4	<b>33</b>	–	169,7
			<b>34</b>	1,88	20,52

\*signal nije opažen

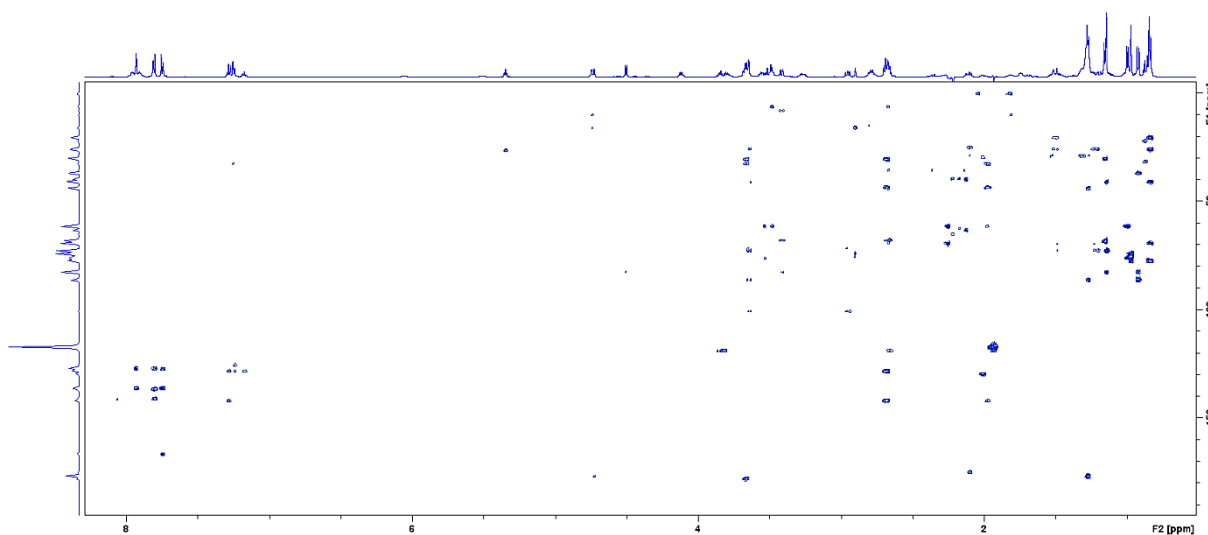


Slika D38. Spektar NOESY spoja 3-9-c.

Slika D39. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spoja 3-9-c.



Slika D40. Spektar COSY spoja 3-9-c.

Slika 41. Spektar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spoja 3-9-c.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Paula Pranjić

Datum rođenja: 28. veljače 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Milke Trnine, Križ

2011–2015 Opća gimnazija, Srednja škola Ivan Švear, Organizacijska jedinica Križ

2015–2019 Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2019– Diplomski studij kemije, smjer: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016–2019 Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)

2018, 2019 Članica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. P. Pranjić, I. Habinovec, I. Mikulandra, E. Hošnjak, P. Novak, *Isolation and Structural Characterization of Novel 3-trifluoromethoxyphenyl- and 3-(3-phenylpropyl)-macrozones and Their Diastereoisomers Using LC-SPE/cryo NMR*, 5<sup>th</sup> Adriatic NMR Conference, Primošten, 2021. Book of Abstracts, str. 66.

### Radno iskustvo

siječanj 2021. – veljača 2021. Stručna praksa, Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

listopad 2021. – Rad u analitičkom laboratoriju, PLIVA, Zagreb