

Studij interakcija amino-supstituiranih tetracikličkih imidazo [4,5-B] piridina s cinkovim i bakrovim(II) ionima pomoću spektrometrije masa

Martinac, Ingrid Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:784460>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ingrid Ana Martinac

**Studij interakcija amino-supstituiranih
tetracikličkih imidazo[4,5-*b*]piridina s cinkovim
i bakrovim(II) ionima pomoću spektrometrije
masa**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2025.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju pod mentorstvom dr. sc. Renate Kobetić, v. zn. sur. i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Marijane Pocrnić, v. zn. sur. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekata

Marijana Radić Stojković, HrZZ projekt IP-2018-01-4694

Marijana Hranjec, HrZZ projekt IP-2018-01-4379

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Renati Kobetić na povjerenju, susretljivosti, prenesenom znanju i pomoći tijekom izrade Diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji koja je uvijek uz mene na podršci i razumijevanju.

Zahvaljujem svojim prijateljima i dečku koji su bili uz mene kroz cijelo studiranje.

SADRŽAJ

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Spektrometrija masa	2
2.2. Derivati imidazo-piridina	16
2.3. Bakar.....	20
2.4. Cink.....	22
2.5. Mononuklearni Cu(II), Zn(II) kompleksi sa 2-aminoetilpiridinom i karboksilatom	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. Kemikalije	26
3.2. Instrumenti.....	26
3.3. Priprema otopina za analizu	26
3.4. Analiza uzoraka.....	28
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Analiza otopina spojeva pomoću ESI-MS	31
4.2. Analiza otopina bakrova(II)acetatata monohidrata i spojeva 1-4 pomoću MS.....	45
4.3. Analiza otopina cinkova acetata dihidrata i spojeva 1-4 pomoću MS.....	58
§ 5. ZAKLJUČAK	69
§ 6. LITERATURNI IZVORI	71
§ 7. ŽIVOTOPIS	LXXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

STUDIJ INTERAKCIJA AMINO-SUPSTITUIRANIH TETRACIKLIČKIH IMIDAZO[4,5-*b*]PIRIDINA S CINKOVIM I BAKROVIM(II) IONIMA POMOĆU SPEKTROMETRIJE MASA

Ingrid Ana Martinac

Nedavno je sintetiziran novi niz tetracikličkih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina kao potencijalnih antiproliferativnih sredstava. Na njihovu antiproliferativnu aktivnost protiv ljudskih stanica raka utjecalo je uvođenje odabranih amino bočnih lanaca na različite položaje na tetracikličkom skeletu, a posebno na položaj atoma dušika u jezgri piridina. Nekoliko spojeva pokazalo je izražene citostatske učinke u submikromolarnom području, posebice na stanice raka HCT116 i MCF-7. Izabrano je 4 novosintetiziranih spojeva za analizu nekovalentnih interakcija s metalnim ionima (cinkov i bakrov(II) ion) pomoću spektrometrije masa uz ionizaciju elektroraspršenjem. Na temelju dobivenih spektara predložene su strukture kompleksa izabranih spojeva s bakrovim(II) ionom i predložene su strukture kompleksa izabranih spojeva sa cinkovim(II) ionom. Rezultati ovog diplomskog rada mogli bi poslužiti za procjenu nekovalentnih interakcija izabranih spojeva s metalnim ionima (cinkov i bakrov(II) ion) u budućoj primjeni predmetnih spojeva u studijama djelovanja u stanici, ali i kao potencijalni novi spojevi za daljnja istraživanja i primjenu u medicini.

(85 stranica, 61 slika, 10 tablica, 28 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: ionizacija elektroraspršenjem, nekovalentne interakcije, spektrometrija masa

Mentor: dr. sc. Renata Kobetić, v.zn.sur.

Neposredni voditelj: mag. chem. Marijana Pocrnić, v. zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. izv. prof. dr. sc. Jana Pisk
3. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera,

Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Nemet

Datum diplomskog ispita: 29.1.2025.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

STUDY OF INTERACTIONS OF AMINO-SUBSTITUTED TETRACYCLIC IMIDAZO[4,5-B]PYRIDINES WITH ZINC AND COPPER(II) IONS USING MASS SPECTROMETRY

Ingrid Ana Martinac

A new series of tetracyclic imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives have been synthesized as potential antiproliferative agents. Their antiproliferative activity against human cancer cells was influenced by the introduction of selected amino side chains to different positions on the tetracyclic skeleton, especially to the position of the nitrogen atom in the pyridine core. Several compounds showed pronounced cytostatic effects in the submicromolar range, especially on HCT116 and MCF-7 cancer cells. 4 newly synthesized compounds were selected for analysis of non covalent interactions with metal ions (zinc and copper(II) ions) using mass spectrometry with electrospray ionization. The structures of the complexes of the selected compounds with copper(II) ion and structures of the complexes of the selected compounds with zinc(II) ion were proposed. The results of this thesis could be used to evaluate the non-covalent interactions of selected compounds with metal ions (zinc and copper(II) ions) for the eventual application of the compounds in question in studies of their action in the cell, but also as potential new compounds for further research and application in medicine.

(85 pages, 61 figures, 10 tables, 28 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: electrospray ionization, mass spectrometry, non-covalent interactions

Mentor: Dr. Renata Kobetić, Research Associate

Assistant mentor: mag. chem. Marijana Počrnjčić

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
2. Dr. Đani Škalamera, Associate Professor
3. Dr. Jana Pisk, Associate Professor

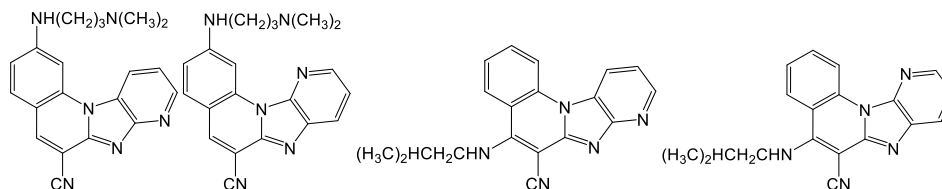
Substitute: Dr. Ivan Nemet, Assistant Professor

Date of exam: 29.1.2025.

§ 1. UVOD

Nedavno je sintetiziran novi niz tetracikličkih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina kao potencijalnih antiproliferativnih sredstava (Slika 1). Na njihovu antiproliferativnu aktivnost protiv ljudskih stanica raka utjecalo je uvođenje odabranih amino bočnih lanaca na različite položaje na tetracikličkom skeletu, a posebno na položaj atoma dušika u jezgri piridina. Nekoliko spojeva pokazalo je izražene citostatske učinke u submikromolarnom području, posebice na stanice raka HCT116 i MCF-7. Dobiveni rezultati potvrdili su značajan utjecaj položaja dušika u piridinskom prstenu na pojačanje antiproliferativne aktivnosti, posebno za derivate koji nose amino bočne lance na položaju 2.

Na interakcije s DNA (uključujući strukturu G-kvadrupleksa) i RNA utjecao je položaj amino bočnih lanaca na tetracikličkoj jezgri derivata imidazo[4,5-*b*]piridina i naboj liganda.¹ Stoga je cilj ovog rada proučiti potencijal vezanja biološki važnih iona metala (cinkov i bakrov(II)ion) sa novosintetiziranim spojevima. Strukture spojeva za koje će se ispitati potencijal vezanja cinkovog i bakrovog(II) iona se nalaze na slici 1.



Slika 1. Strukture tetracikličkih imidazo[4,5-*b*]piridina korištenih za ispitivanje potencijala vezanja cinkovog i bakrovog(II) iona

Spektrometrijom masa (MS)² okarakterizirat će se mogući novonastali kompleksi. Usporedit će se razlike i utjecaj položaja N atoma na interakciju s metalima te utjecaj na formiranje i stabilnost kompleksa u plinskoj fazi. Rezultati ovog diplomskog rada služit će za procjenu mogućih nekovalentnih interakcija spojeva na slici 1 s metalnim ionima (cinkov i bakrov(II) ion) u budućoj primjeni predmetnih spojeva u studijama djelovanja u stanici, ali i kao potencijalni novi spojevi za daljnja istraživanja i primjenu u medicini.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Spektrometrija masa

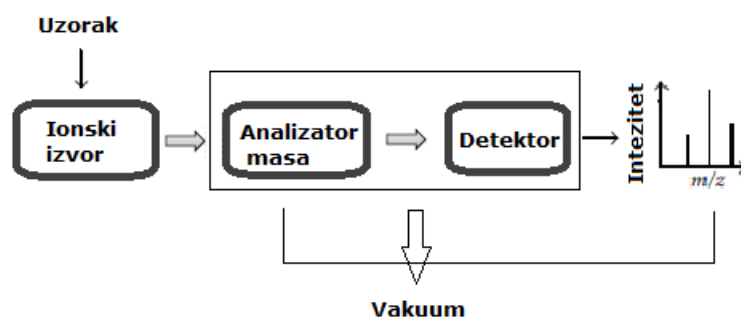
Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je moćna analitička tehnika koja ima kvalitativnu i kvantitativnu primjenu. Tijekom proteklih desetljeća doživjela je ogromna tehnološka poboljšanja koja su je učinila bitnim analitičkim alatom u kemiji, biokemiji, farmaciji i medicini.³ Veliki procvat je doživjela povezivanjem s plinskom kromatografijom i time je unaprijeđena analiza hlapljivih spojeva. Povezivanjem s tekućinskom kromatografijom omogućena je analiza nehlapljivih spojeva kao što su peptidi, oligosaharidi, fosfolipidi i dr. Otkrićem ionizacije elektroraspršenjem i matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem analiza je proširena i na spojeve s molekulskom masom od nekoliko stotina tisuća daltona kao što su sintetski polimeri i proteini. Stalnim unapređivanjem tehnike i instrumentacije postignuti su gotovo nevjerojatni rezultati obzirom na gornju granicu mjerljivih masa, osjetljivost i točnost. Granica detekcije spuštana je na razinu piko-, femto- i atomola, točnost u određivanju atomske mase bolja je od 10^{-9} u, dok je rezolucija s $13 m/\Delta m$ (Thomson, 1913) povećana na $8 \cdot 10^6 m/\Delta m$ (Marshall, 1998). Danas se spektrometrija masa koristi za određivanje izotopnog omjera atoma u uzorku, elementnog sastava uzorka, strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula, kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese i strukture i sastava čvrste površine.⁴

2.1.1. Osnove MS

Spektrometrija masa je analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a nakon toga se nastali ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z je bezdimenzijska veličina). Rezultati su prikazani kao maseni spektar odnosno dvodimenzionalni prikaz intenziteta signala (obilje ionskih vrsta) u odnosu na m/z . Najintenzivniji signal naziva se osnovni ili bazni signal, a može odgovarati signalu molekulskog ili fragmentnog iona. Koliko dobro su signali razlučeni ovisi o sposobnosti instrumenta da razlikuje i razluči ione mase m_1 (masa iona prekursora) i m_2 (masa iona produkta)⁴. Razlučivanje se izračunava prema jednadžbi:

$$R = \frac{m_1}{\Delta m} \quad (4)$$

Spektrometar masa se sastoji od sustava za uvođenje uzorka, ionskog izvora, analizatora mase i detektora kao što je shematski prikazano na slici 2. Uzorak se uvodi u ionizacijsku komoru gdje se molekule analita ioniziraju, a nastali ioni usmjeravaju u analizator masa gdje se odjeljuju u vremenu ili prostoru na temelju njihovog omjera m/z te detektiraju. Vakuum je potreban da bi se spriječila kolizija između iona i molekula, pri čemu može doći do nastajanja neželjenih produkata ili do gubitka naboja iona analita.⁴



Slika 2. Glavni dijelovi spektrometra masa⁴

2.1.2. Ionski izvori

Ionski izvor ima važnu ulogu u stvaranju nabijenih iona u plinskoj fazi koji dalje putuju kroz analizator i završavaju na detektoru. Ionizacijske tehnike se mogu podijeliti obzirom na fizičko-kemijska svojstva analita i na količinu unutarnje energije predane tijekom ionizacijskog procesa. Ionizacija elektronima i kemijska ionizacija prikladne su jedino za ionizaciju molekula analita u plinskoj fazi te je njihova primjena ograničena na dovoljno hlapljive i termički stabilne spojeve. Za tekućine se koristi ionizacija elektroraspršenjem, ionizacija termoraspršenjem i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku. Ukoliko se radi o krutinama često su potrebne dodatne preparacijske metode koje uključuju primjenu čvrste ili tekuće matrice. Desorpcija poljem ili laserom koristi čvrste matrice, a bombardiranje brzim atomima tekuće matrice.⁴

Ionizacija elektronima (engl. *electron ionization*, EI) jedna je od najuobičajenijih ionizacijskih tehnika za hlapljive i termički stabilne molekule mase do 10^3 Da. Tijekom Drugog svjetskog rata razvio ju je fizičar Arthur Jeffrey Dempster i tada koristi naziv elektronski udar. Unutar izvora iona se nalazi grijana žica izrađena od metala volframa ili renija. Zagrijavanjem žice emitiraju se elektroni koji se ubrzavaju potencijalom od 70 V i sudaraju se s molekulama analita u plinskoj fazi. Plinoviti uzorci uvode se direktno u izvor, a tekućine i krutine se griju kako bi im se povećao tlak para za analizu. Ovaj proces stvara pozitivno nabijene ione.⁴

Kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI) je meka ionizacijska tehnika koja je korisna kada se ne opaža signal molekulskog iona u masenom spektru elektronskog udara. Burnaby Munson i Frank H. Fieldsu 1966. godine prvi su uveli kemijsku ionizaciju. Razvili su ovu metodu kako bi poboljšali način na koji se vide molekule u spektrometriji masa. Kemijska ionizacija zahtjeva manje energije u usporedbi s elektronskom ionizacijom. Niža energija znači da se molekule ne raspadaju toliko, što olakšava detekciju cijele molekule.⁴

Ionizacija brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB) i spektrometrija masa sekundarnih iona (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS) su tehnike u kojima ioni u plinskoj fazi nastaju direktno iz kondenzirane faze. Uzorak se ne ionizira već se postojeći ioni iz tekuće matrice desorpcijom prevode u plinsku fazu. FAB je prikladna tehnika za analizu polarnih spojeva mase do 10000 Da kao što su peptidi i nukleotidi. Razlika između FAB-a i SIMS-a je u pripravi uzorka. Kod SIMS-a se ne koristi matrica već se zraka energetskih iona (Ar^+ , Cs^+ , N_2^+ , O_2^+) direktno usmjerava na površinu uzorka, pri čemu se desorbiraju neutralne i nabijene čestice.⁴

Desorpciju poljem (engl. *field desorption*, FD) je razvio znanstvenik H. D. Bakey 1969. godine. Glavna ideja je korištenje vrlo jakog električnog polja za stvaranje iona iz materijala koji se nalazi na čvrstoj površini. Površina je obično posebna vrsta žice sa sićušnim šiljcima od ugljika ili silicija koji se uzgajaju na voframovoj žici. Tehnika je prikladna za analizu polimera.⁴

Desorpcija plazmom (engl. *plasma desorption*, PD) je prikladna za analizu iona mase veće od 10000 Da. Uzorak istaložen na najlonsku foliju presvučen aluminijem izlaže se u ionskom izvoru visokoenergetskim fisijskim fragmentima ^{252}Cf . Bombardiranjem uzorka s nekoliko tisuća fragmenata ^{252}Cf u sekundi rezultira desorpcijom neutralnih vrsta i iona.⁴

Desorpcija laserom (engl. *laser desorption*, LD) koristi se u analizi čvrstih površina. Laserski puls se usmjerava na površinu uzorka i pritom se molekule analita desorbiraju i ioniziraju. Najčešće se koriste UV i IR laseri.⁴

Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionisation*, MALDI) je prvi put predstavljena 1985. godine od strane znanstvenika Franza Hillenkampa i Michaela Karasa. Razvili su ovu metodu kako bi mogli identificirati molekule, a posebno peptide. MALDI se koristi u analizi velikih molekula kao što su peptidi, proteini, oligonukleotidi, ugljikohidrati, lipidi te sintetski polimeri. Otopina uzorka

se miješa s velikim suviškom matrice (male organske molekule koje dobro apsorbiraju valnu duljinu laserskog zračenja) i nanosi na MALDI podlogu (metu). Nakon što otapalo ispari, čvrsta smjesa se ozrači laserskim pulsom pri čemu se uzorak desorbira i ionizira.⁴

Ionizacija termoraspršenjem (engl. *thermospray ionisation*, TSP) je vrsta ionizacije u masenoj spektrometriji pri atmosferskom tlaku u kojoj se ioniziraju uzorci direktno iz tekuće u plinovitu fazu. Ova tehnika je korisna u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom⁴.

Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) se koristi u analizi polarnih ili ionskih molekula masa do 1500 Da. Otopina analita se iz tekućinskokromatografske kolone uvodi u prostor za nebulizaciju gdje se uz pomoć plina (N_2) prevodi u raspršene kapljice. Kapljice nošene plinom ulaze u komoru za desolvataciju/vaporizaciju gdje se griju na 120 °C pri čemu molekule otapala i analita prelaze u plinsku fazu. Nakon toga slijedi ionizacija u kojoj se koristi elektroda kao izvor elektrona (engl. *corona discharge electrode*). Primarno nastali ioni (N_2^{*+} ili O_2^{*+}) sudarima s molekulama otapala daju ione plina reagensa koji ioniziraju molekule analiza reakcijama koje uključuju prijenos protona.^{4,5}

Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) je metoda ionizacije korištena u ovome radu i detaljnije objašnjena u poglavlju ESI-MS (engl. *electrospray ionization mass spectrometry*).

2.1.3. Analizatori masa

Nakon ionizacije, ioni se odjeljuju na temelju njihovih omjera m/z pomoću analizatora masa. Pet osnovnih karakteristika analizatora masa su:

1. Gornja granica mase: Predstavlja najveću vrijednost m/z koja se može mjeriti.
2. Brzina analize: Predstavlja brzinu mjerenja u određenom području m/z koja se izražava u jedinicama mase po sekundi (s^{-1}).
3. Propusnost: Predstavlja omjer broja iona koji stižu do detektora i broja iona nastalih u ionskom izvoru.
4. Točnost mase: Predstavlja razliku između teoretske i izmjerene vrijednosti m/z koja se izražava u dijelovima na milijun (ppm).
5. Razlučivanje: Sposobnost razdvajanja signala iona s malom razlikom u masama.

Analizator masa s magnetskim sektorom (engl. *magnetic sector*) koristi elektromagnet za odjeljivanje iona. Ioni nastali u ionizacijskom izvoru se ubrzavaju razlikom potencijala. Putanja iona kroz magnetski analizator predstavlja ravnotežu između dviju sila koje na njih djeluju, magnetska sila ($F_m = Bzev$) i centrifugalna sila ($F_c = mv^2/r$). B označava jakost magnetskog polja, a r radijus putanje iona. Da bi ioni stigli do detektora te dvije sile se moraju izjednačiti. Samo ioni koji u magnetskom polju opisuju putanje radijusa r dolaze do detektora. Ostali ioni udaraju u stijenke instrumenta i na taj način se neutraliziraju. Budući da se napon ubrzanja drži konstantnim ioni se odvajaju mijenjanjem jačine magnetskog polja i to obično od nižih prema višim vrijednostima pri čemu se detektiraju ioni od najmanjih prema većim masama.⁴

Linearna ionska stupica (engl. *linear ion trap*, LIT) sastoji se od četiri cilindrične elektrode na čijim krajevima su postavljene elektrode pod određenim potencijalom koje odbijaju ione. Ioni u takvoj stupici imaju ograničeno radijalno kretanje uslijed djelovanja kvadrupolnog polja. Pozitivan potencijal se primjenjuje za pozitivno nabijene ione, a negativan za negativno nabijene. Ioni se moraju zarobiti prije nego najlakši ioni izađu iz stupice. U stupici se ioni hlade kolizijom s inertnim plinom (Ar, N₂). Ioni se iz stupice izbacuju aksijalno ili radijalno.⁴

Ionska stupica (engl. *ion trap*, IT) se sastoji od gornje, donje i prstenaste elektrode. Kombinacija izmjeničnog i istosmjernog potencijala primijenjuje se ili samo na prstenastu elektrodu ili na sve elektrode pri čemu nastaje neka vrsta trodimenzijskog kvadrupola u čijem se središtu zarobe ioni svih omjera m/z . Pod utjecajem polja ioni rotiraju oko r i osciliraju oko osi z po putanji u obliku osmice. Unutar stupice ioni udaraju jedni u druge pa se tijekom vremena njihova putanja širi. Da bi se spriječio gubitak iona uslijed ekspanzije, u ionsku stupicu se uvodi helij koji uklanja višak energije. Mijenjanjem jačine izmjeničnog potencijala putanja iona određenog omjera m/z postaje nestabilna i on se kroz otvor na donjem nosaču uklanja iz stupice i usmjeruje prema detektoru.⁴

Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije (engl. *Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, FT-ICR MS) je tehnika u kojoj se omjer m/z određuje pomoću eksperimentalno mjerljive ciklotronske frekvencije iona, ω_c . U magnetskom polju ioni se kreću kružnom putanjom okomitom na smjer polja. Stabilna putanja iona predstavlja ravnotežu magnetske i centrifugalne sile koje djeluju na ion:

$$Bzev = \frac{mv^2}{r} \quad (4)$$

Ciklotronska frekvencija gibanja iona dana je izrazom:

$$\omega_c = \frac{v}{r} = \frac{zeB}{m} \quad (4)$$

Pri određenoj vrijednosti magnetskog polja ciklotronska frekvencija iona ovisi samo o omjeru m/z i neovisna je o brzini iona jer se radijus putanje povećava proporcionalno brzini. Ako radijus putanje postane veći od radijusa ionske ćelije ion se izbacuje. Da bi se ioni mogli detektirati nužno je njihovo koherentno gibanje. Ioni iste mase pobuđeni istom energijom gibat će se po istoj putanji i rotirati istom frekvencijom. Ako kružna gibanja pojedinačnih iona nisu u fazi, u prosjeku će se svaki naboj induciran na jednoj od detekcijskih elektroda poništiti jednakim i suprotnim nabojem induciranim na suprotnoj detekcijskoj elektrodi ionom koji se giba 180° izvan faze. Da bi se dobio mjerljivi signal, ione treba pobuditi u kratkom vremenu da bi se grupirali i bili u fazi. FT-MS koristi simultano pobuđivanje svih iona u ćeliji primjenom širokog područja frekvencija u vremenu od oko 1 μ s. Time se postiže koherentno gibanje iona čije putanje su blizu detekcijskih elektroda. Inducirani izmjenični naboj se prevodi u oscilirajući napon koji nakon pojačavanja i digitalne pretvorbe daje signal u vremenskoj domeni. Signal u vremenskoj domeni se prevodi Fourierovim transformacijama u signal u frekvencijskoj domeni i konačno u spektar masa.⁴

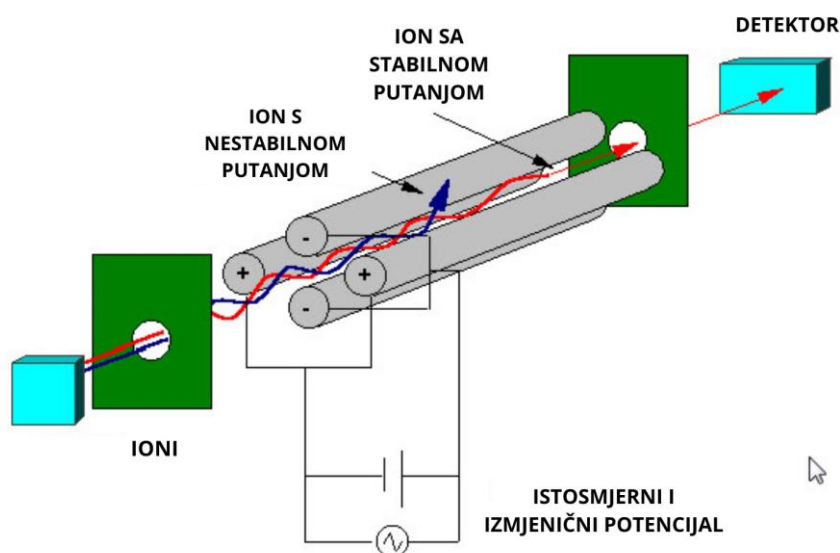
Elektronska stupica ili Orbitrap (engl. *Orbitrap*) se sastoji od središnje, vretenaste elektrode i vanjske, bačvaste elektrode. Pri analizi pozitivno nabijenih iona negativni potencijal od nekoliko kV primjenjuje se na središnju elektrodu, dok je vanjska na zemljinom potencijalu. Ioni određene kinetičke energije injektirani u analizator masa, zarobe se u elektrostatskom polju između elektroda. Stabilna putanja iona obuhvaća rotaciju oko središnje elektrode i harmonijsko titraje duž te elektrode. Frekvencija harmonijskih oscilacija neovisna je o kinetičkoj energiji iona i ovisi samo o omjeru mase i naboja iona:

$$\omega = \sqrt{\frac{zk}{m}} \quad (4)$$

k je zakrivljenost polja, a ω je frekvencija

Struja inducirana oscilacijama iona Fourierovim transformacijama se prevodi u spektar masa⁴

Kvadrupolni analizator masa (engl. *quadrupole*) je često korišten analizator zbog pristupačne cijene, mogućnosti brzog snimanja i povezivanja s kromatografskim tehnikama. Nedostatak mu je slabo razlučivanje. Ioni iz ionizacijskog izvora ubrzavaju se potencijalom od 5 do 15 V i usmjeravaju u kvadrupol koji se sastoji od četiri cilindrične elektrode spojene u paru (slika 3). Na elektrode se primjenjuje promjenljiv izmjenični (rf) i istosmjerni (dc) potencijal s pomakom u fazi od 180°. Oscilirajuće električno polje propušta samo ione određenog omjera m/z , odnosno ione koji se gibaju stabilnom putanjom. Ioni malog omjera m/z brže reagiraju na promjenu izmjeničnog potencijala i njihovo gibanje je određeno tim potencijalom. Na ione velikih masa utječe istosmjerni potencijal. Mijenjanjem veličine potencijala sukcesivno se detektiraju ioni različitih masa.⁴



Slika 3. Shematski prikaz kvadrupola⁶

Dostupni su i instrumenti s tri povezana kvadrupola u kojima su prvi i treći klasični kvadrupoli, a središnji ima funkciju kolizijske ćelije. U kolizijsku ćeliju se pri određenom tlaku uvodi kolizijski plin te ioni koji u nju ulaze podliježu sudarima. Ukoliko se radi o inertnom plinu ioni se fragmentiraju, a nastali fragmenti odjeljuju se u trećem kvadrupolu. Ako se u kolizijsku ćeliju uvodi reaktivni plin, nastali produkti reakcije ion-molekula detektiraju se u trećem kvadrupolu.⁴

Analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *time of flight*, TOF) odjeljuje ione na temelju različitih brzina i mjeri vrijeme potrebno ionu da prijeđe udaljenost od izvora do detektora. Na izlazu iz ionskog izvora ioni mase m i nabojnog broja z ubrzani potencijalom V imaju kinetičku energiju:

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = zeV \quad (4)$$

Vrijeme potrebno ionu da preleti udaljenost l :

$$t = \frac{l}{v} \quad (4)$$

Uvrštavanjem izraza za brzinu dobije se:

$$t = \sqrt{\frac{ml^2}{z2Ve}} \quad (4)$$

Udaljenost od izvora do detektora i primijenjen potencijal su konstante, e je univerzalna konstanta (naboj elektrona), vrijeme je proporcionalno korijenu omjera m/z . Bitno je da svi ioni krenu u isto vrijeme i TOF je prikladan za pulsne tehnike ionizacije. Nedostatak TOF-a je slabo razlučivanje koje se može poboljšati upotrebom reflektora (ionskog zrcala) koje se sastoji od niza prstenastih elektroda. Primjenom potencijala stvara se polje koje zakreće i odbija ione prema detektoru. Ioni veće energije ulaze dublje u ionsko zrcalo i dulje se zadržavaju, pa na detektor stižu u isto vrijeme kad i ioni istog omjera m/z , ali manje energije. Drugi način poboljšanja razlučivanja je odgođena pulsna ekstrakcija kod koje se ioni prvo separiraju prema njihovoj energiji u prostoru bez utjecaja polja, a zatim se primijeni ekstrakcijski puls koji daje više energije ionima koji su duže zadržani u izvoru. Time su ioni s ishodno manje energije primili više kinetičke energije pa na detektor dolaze u isto vrijeme kao i oni koji su u početku bili brži.⁴

U ovome radu koristio se kvadrupolni analizator mase u kombinaciji s analizatorom mase vremena leta, odnosno Q-TOF (engl. *quadrupole time of flight*) detaljnije objašnjen u poglavlju ESI-MS.

2.1.4. Detektori

Detektori su ključni u masenoj spektrometriji. Oni hvataju odvojene ione i pomažu u prikazivanju rezultata. Rezultati su spektri koji pokazuju relativnu zastupljenost svakog iona na temelju njegovog omjera mase i naboja.

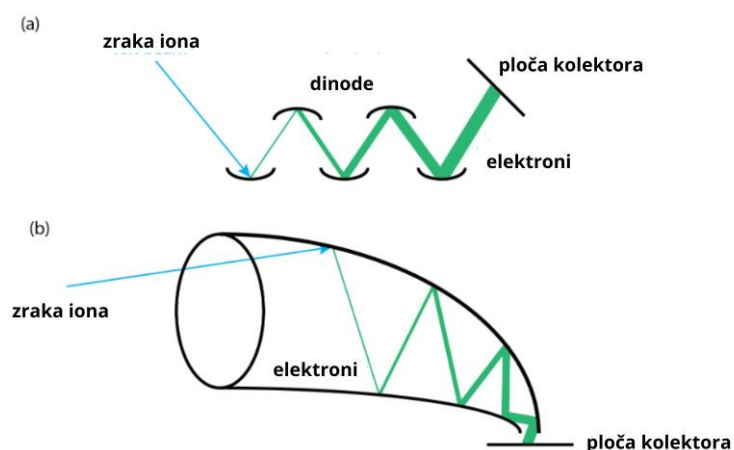
Svojstva kvalitetnog detektora su:

- Visoko pojačanje: Trebao bi povećati male signale kako bi se lakše čitali.
- Brzi odziv: Trebao bi brzo reagirati na udare iona.
- Nizak šum: Ne bi trebao uhvatiti signale koji nisu od iona.
- Visoka učinkovitost prikupljanja: Trebao bi uhvatiti što je moguće više iona.
- Niska cijena: Ne bi trebalo biti preskupo za izradu ili kupnju.
- Uska distribucija odgovora: Svaki put bi trebao dati dosljedne rezultate.
- Isti odgovor za sve mase: Trebao bi raditi jednako dobro za ione različitih veličina.
- Veliki dinamički raspon: Trebao bi podnijeti vrlo male i vrlo velike signale.
- Dugoročna stabilnost i dug vijek trajanja⁷

Danas se uglavnom koriste detektori koji povećavaju signal kao što su elektronski multiplikator i fotomultiplikator.²

Elektronski multiplikator

Ključni proces je sekundarna emisija elektrona. Kada ion ili elektron udari u površinu, on izbacuje druge elektrone s te površine. Izbačeni elektroni nazivaju se sekundarni elektroni. Broj sekundarnih elektrona ovisi o vrsti čestice koja udara u površinu, njezinoj energiji i karakteristikama površine. Unutar elektronskog multiplikatora postoje dijelovi koji se nazivaju dinode koje su često izgrađene od bakra ili berilija. Kada ion udari u prvu dinodu, oslobađa elektrone. Ti se elektroni fokusiraju i šalju na sljedeću dinodu stvarajući lančanu reakciju prikazanu na slici 4. Ovaj proces pojačava signal čineći ga više od milijun puta jačim. Postoje dvije glavne vrste: diskretna dinoda i kontinuirana dinoda. Multiplikatori s diskretnom dinodom imaju 12 do 24 dinode i mogu pojačati signale od 10000 do 100 milijuna puta.³ Snaga pojačavanja kod elektronskog multiplikatora je oko 10^7 .⁴

Slika 4. Elektronski multiplikator⁴

Fotomultiplikator

Čine ga dvije konverzijske dinode, fosforescentni zaslon i fotomultiplikator. Detektiraju se pozitivni i negativni ioni tako da se kationi usmjeravaju prema negativno nabijenoj dinodi, a anioni prema pozitivnoj dinodi. Nastali sekundarni elektroni ubrzavaju se prema fosforescentnom zaslonu gdje se prevode u fotone i detektiraju fotomultiplikatorom. Snaga pojačavanja je manja nego kod elektronskog multiplikatora: od 10^4 do 10^5 .⁴

2.1.5. ESI-MS

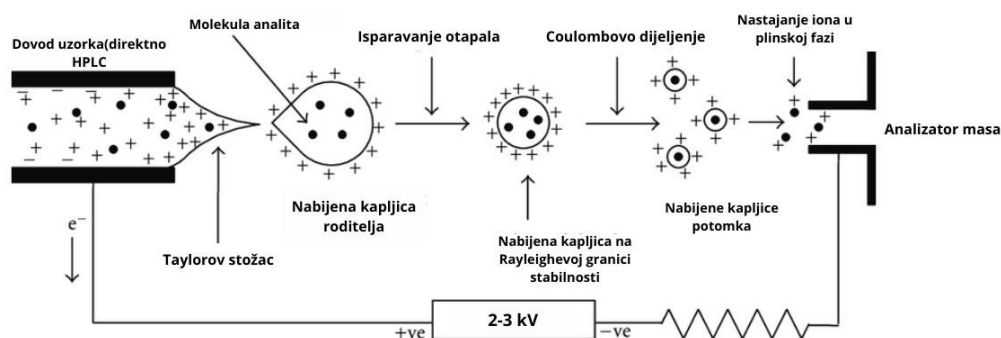
Kako bi se mogli određivati sastojci složenih smjesa spektrometar masa je često spojen s plinskim ili tekućinskim kromatografom. U takvim vezanim sustavima spektrometar masa ima funkciju detektora, a kromatograf se može promatrati kao sustav za dovođenje uzorka.⁴ U ovome radu je analiza uzoraka provedena spektrometrijom masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzorka pomoću Agilent 1290 Infinity II UHPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor odnosno, ESI-Q-TOF-MS (engl. *electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry*) na slici 5.



Slika 5. Instrument Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzoraka pomoću Agilent 1290 Infinity II UHPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor korišten za analizu uzoraka

Ionizacija elektroraspršenjem je blagi način ionizacije uzorka direktno iz otopine koji omogućuje analizu malih i velikih molekula, nenabijenih ili ionskih spojeva, nekovalentnih kompleksa te direktno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Otopina koja sadrži analit uvodi se u metalnu kapilaru na koju se pri atmosferskom tlaku primjenjuje jako električno polje (2–3 kV) pod čijim utjecajem se odvajaju pozitivni i negativni naboj u otopini (slika 6). Kada je kapilara priključena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Pri kritičnoj jakosti polja nastaje Taylorov stožac u kojem se kontinuirano proizvode kapljice obogaćene pozitivno nabijenim ionima koje pod utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putuju prema analizatoru spektrometra masa. Mijenjanjem polariteta moguće je proizvesti negativno nabijene kapljice. Početna veličina nabijenih kapljica nastalih elektroraspršenjem ovisi o nekoliko parametara kao što su protok otopine i svojstva otapala. Otapalo grijanjem isparava te se smanjuje veličina kapljica, ali naboj ostaje konstantan. Kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetošću postiže se Rayleighova granica stabilnosti. Unutar 100 μ s radijus ishodne kapljice dovoljno je blizu Rayleighovoj granici te Coulombovim dijeljenjem nastaju manje kapljice potomaka koje nose oko 2% mase i 15% naboja kapljice pretka. Daljnjim smanjivanjem kapljica potomka uslijed isparavanja otapala proces dijeljenja se ponavlja dva do

tri puta uz konstantno povećanje omjera pozitivnog naboja na površini kapljice i sparenih iona elektrolita u unutrašnjosti. Ustanovljeno je da je dijeljenje kapljice nesimetrično (engl. *jet fission*), pri čemu nastaju dvije vrste kapljica: velike, koje u sebi nose neželjene sparene ione elektrolita, i male iz kojih nastaju ioni u plinskoj fazi koji dalje putuju prema analizatoru masa. Postoje dva modela kojima se objašnjava nastajanje iona u plinskoj fazi: model ostatka naboja (Dole, 1968) i model isparavanja iona (Iribarne i Thomson 1976). Prema modelu ostatka naboja, nastaje iznimno mala kapljica, radijusa približno 1 nm, koja sadrži samo jedan ion. Isparavanjem posljednje molekule otapala nastaje ion u plinskoj fazi. Danas se smatra da velike molekule mase oko 3300 Da nastaju tim procesom. Prema drugom modelu, iz kapljica radijusa približno 8 nm, sa suviškom od približno 70 elementarnih naboja, ioni isparavaju prije nego li kapljica dostigne Rayleighovu granicu i započne dijeljenje. Smatra se da mali ioni u plinskoj fazi pretežno nastaju tim mehanizmom.⁴



Slika 6. Mehanizam ionizacije elektroraspršenjem⁸

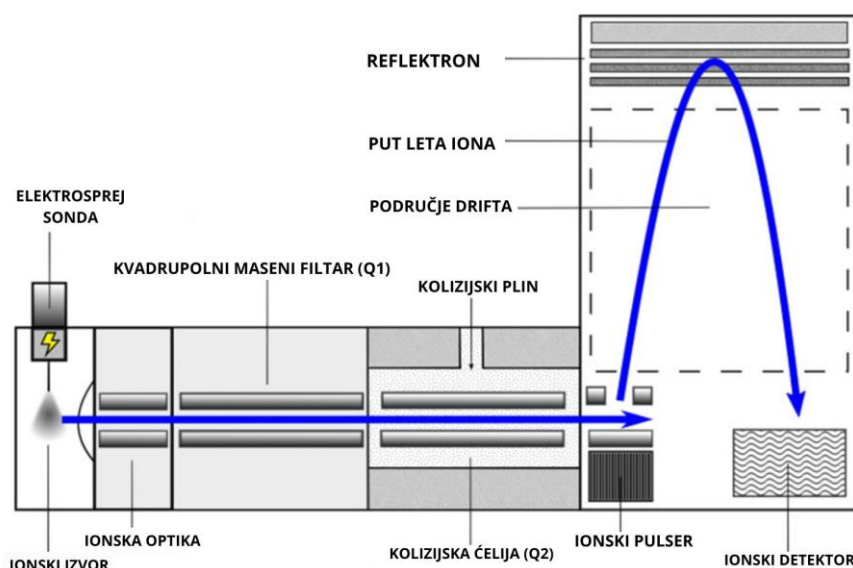
Polarna otapala kao što su metanol, voda i acetonitril obično se koriste za ESI-MS analizu. Neka nepolarna otapala s niskim vrelištem kao što su pentan ($t_v=36\text{ °C}$) i heksan ($t_v=68\text{ °C}$) korištena su kao rashladna sredstva u industriji smatra se da nisu pogodna za ESI-MS.⁹

Tablica 1. Otapala koja su pogodna za ESI-MS¹⁰

KOMPATIBILNA OTAPALA ZA ESI-MS	OTAPALA KOJA SU POGODNA U MALIM KOLIČINAMA	MODIFIKATORI OTAPALA/ADITIVI POGODNI ZA ESI-MS	MODIFIKATORI OTAPALA/ADITIVI KOJI NISU POGODNI ZA ESI (POGODNI SU JEDINO U MALIM KOLIČINAMA)
Acetonitril (CH ₃ CN)	Dimetilformamid (DMF) (HCON(CH ₃) ₂)	Hlapljive soli ili puferi kao što su amonijev acetat (NH ₄ CH ₃ COOH) i amonijev hidrogenkarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Trifluorooctena kiselina (TFA) (C ₂ HF ₃ O ₂)
Diklormetan (CH ₂ Cl ₂) s metanolom (CH ₃ OH)	Dimetilsulfoksid (DMSO) (CH ₃) ₂ SO)	Hlapljive kiseline kao što su mravlja kiselina (HCOOH) i octena kiselina (CH ₃ COOH)	Heptafluoromaslačna kiselina (C ₃ F ₇ COOH)
Dikloretan (C ₂ H ₄ Cl ₂)			Natrijev dodecil sulfat(SDS)(NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)
Tetrahidrofuran (THF) (C ₄ H ₈ O)			Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)
Etanol (C ₂ H ₅ OH)			Nehlapljive soli ili puferi kao što je natrijev klorid (NaCl)
Propanol (C ₃ H ₇ OH)			
Metanol (CH ₃ OH)			
Nitrometan (CH ₃ NO ₂)			
Toluen (C ₆ H ₅ CH ₃) s metanolom ili acetonitrilom (CH ₃ CN)			

Ion u plinskoj fazi nastao ionizacijom elektroraspršenjem dalje putuje prema analizatorima masa (kvadrupolni i analizator mase vremena leta) i detektoru. Q-TOF-MS(engl. *quadrupole time of flight mass spectrometry*) je analitička tehnika koja na koristan način kombinira prednosti dvaju različitih analizatora mase, koristeći visoku učinkovitost fragmentacije spojeva kvadrupolne tehnologije u kombinaciji s velikom brzinom analize i visokom sposobnošću razlučivosti mase za vrijeme leta.¹¹ Q-TOF-MS instrumentacija je vrlo slična trostruko-kvadrupolnom masenom spektrometru, iako je treći kvadrupol zamijenjen cijevi za mjerenje vremena leta. Prvi kvadrupol (Q1) može djelovati kao filtar mase za odabir specifičnih iona na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z) ili samo u radiofrekvencijskom (RF) načinu rada gdje se svi ioni prenose kroz kvadrupol. Drugi kvadrupol (Q2) djeluje kao kolizijska ćelija gdje ione bombardiraju neutralne molekule plina kao što su dušik ili argon, što rezultira fragmentacijom iona procesom poznatim kao disocijacija izazvana sudarom (engl. *collision-induced dissociation*, CID). Q2 također može djelovati samo u RF načinu rada bez naknadne fragmentacije iona. Nakon što napuste kvadrupol, ioni se ponovno ubrzavaju u područje

ionskog modulatora analizatora vremena leta gdje ih pulsira električno polje i ubrzavaju ortogonalno na njihov izvorni smjer. Svi ioni koji su stekli istu kinetičku energiju sada ulaze u let cijev koja je područje drifta bez polja gdje dolazi do razdvajanja mase. Ioni koji imaju manju masu imat će kraće vrijeme leta, dok će težim ionima trebati više vremena da prijeđu putanju leta prema detektoru. Moderni analizatori vremena leta također koriste reflektorski uređaj koji služi za korekciju disperzije kinetičke energije i prostornog širenja iona koji pokazuju isti m/z , ali imaju različite brzine. Ova reflektorska korekcija omogućuje ionima istog omjera m/z da dođu do detektora u isto vrijeme. Reflektoron također povećava duljinu putanje leta što poboljšava razlučivost mase (slika 7).



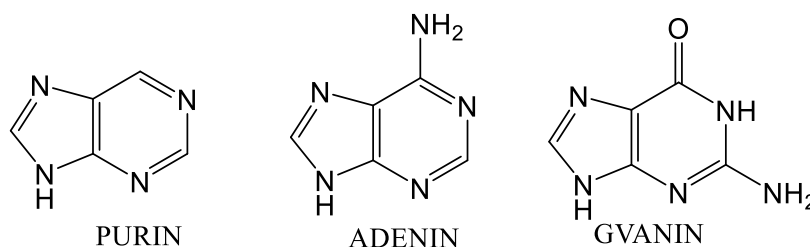
Slika 7. Shematski dijagram Q-TOF-MS¹²

Budući da Q-TOF-MS koristi kvadrupolnu tehnologiju u kombinaciji s vremenskim analizatorom, dvije različite vrste skeniranja mogu se koristiti za prikupljanje podataka. Prvi način rada poznat kao pojedinačni MS način rada koristi prvi i drugi kvadrupol samo u RF načinu rada kako bi omogućio precizno skeniranje mase nefragmentiranog iona prekursora. Q1 se također može koristiti za odabir određene mase ili raspona masa za prijenos na TOF analizator. Drugi način (MS/MS) može koristiti Q1 u RF ili masovnom filtru za prijenos iona u ćeliju sudara (Q2) gdje se javlja CID. Ioni koji slijede i svi nefragmentirani ioni prekursori se zatim prenose u TOF analizator gdje se precizno mjeri masa. Izmjena između ovih načina rada omogućuje Q-TOF-MS da istovremeno prikupi informacije o prekursoru i proizvodu iona.¹²

Detekcija iona se postiže sustavom detektora koji pretvaraju signal vremena u digitalni oblik koji pretvara vrijeme leta iona u maseni signal.¹³

2.2. Derivati imidazo-piridina

Derivati imidazo-piridina su posebne kemijske strukture koje nalikuju purinima (slika 8). Purini su prirodne tvari koje se nalaze u našim tijelima, poput DNK. Budući da su slični, ti derivati mogu biti vrlo korisni u izradi novih lijekova. Vrlo su važni u medicini jer mogu pomoći u liječenju mnogih bolesti. Oni su poput posebnih građevnih blokova koje znanstvenici koriste za stvaranje lijekova.¹



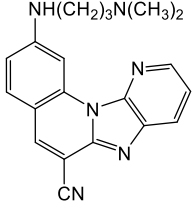
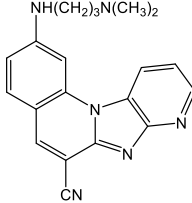
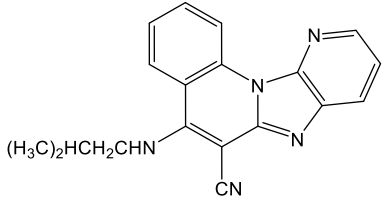
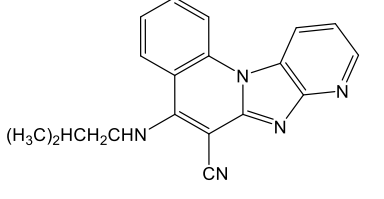
Slika 8. Struktura purina i njegovih derivata¹⁴

Derivati imidazo-piridina mogu spriječiti pravilan rad stanica raka inhibicijom protein-kinaza koje pomažu stanicama u djeljenju, mogu pomoći kod bolesti koje utječu na mozak i živce, smanjuju upalu. Neki od derivata djeluju na GABA receptor, koji je dio komunikacijskog sustava mozga. Oni pomažu boljem radu mozga djelujući kao pozitivni alosterički modulatori, što znači da pojačavaju funkciju receptora. Mogu djelovati kao inhibitori aromataze koji pomažu smanjiti proizvodnju estrogena te je to korisno u liječenju određenih vrsta raka dojke. Kao inhibitori metaloproteinaze mogu zaustaviti enzime koji razgrađuju proteine i to je korisno u sprječavanju oštećenja tkiva. Mogu se interkalirati s DNK/RNK utječući na to kako stanice čitaju genetske informacije. Djeluju kao inhibitori protonske pumpe koji pomažu u smanjenju želučane kiseline za liječenje čira. Među različitim vrstama derivata imidazo-piridina posebni su imidazo[4,5-*b*]piridin i imidazo[4,5-*c*]piridin.¹

2.2.1. Amino-supstituirani tetraciklički imidazo[4,5-*b*]piridini

Tetraciklički derivati imidazo[4,5-*b*]piridina su kemijski spojevi koje čine četiri povezana prstena. M. Hranjec i suradnici sintetizirali su ove spojeve kako bi ispitali mogu li zaustaviti rast stanica raka, odnosno njihovo antiproliferativno djelovanje.¹ Spojevi su dizajnirani s različitim amino bočnim lancima koji s obzirom na položaj mogu ujecati na način na koji se spoj ponaša. Rezultati ispitivanja su pokazali daje važan položaj atoma dušika (N) u piridinskom dijelu strukture jer se pokazalo da položaj N atoma utječe na djelovanje spoja na stanice raka. Spojevi **1**, **2**, **3** i **4** su korišteni za ispitivanje potencijala vezanja bakrovog i cinkovog(II) iona u ovome radu i nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Strukture tetracikličkih derivate imidazo[4,5-*b*]piridina korištenih za ispitivanje potencijala vezanja cinkovog i bakrovog(II) iona i njihova molarna masa¹

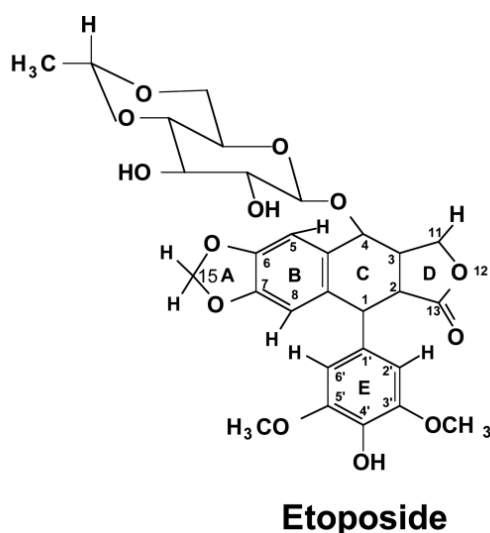
ŠIFRA	SPOJ	$M/\text{g mol}^{-1}$
1	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 	344,41
2	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 	344,41
3		315,37
4		315,37

Spojevi **1** i **2** su regioizomeri, kao i spojevi **3** i **4**. Regioizomeri imaju isti redoslijed vezivanja ali se razlikuju po položaju atoma u prostoru što dovodi do razlike u njihovim kemijskim

svojstvima. Regioizomeri sa različitim položajima heteroatoma i funkcionalnih skupina mogu pokazivati različite sposobnosti koordinacijskog povezivanja. To može značajno utjecati na njihove biološke aktivnosti, odnosno na njihove međumolekulske interakcije s metalnim ionima.¹⁵ Iz tog razloga su ovi spojevi izabrani za ispitivanje interakcija s cinkovim i bakrovim(II) ionima kako bi se usporedile razlike i utjecaj položaja N atoma na interakciju s metalnim ionima te utjecaj na formiranje i stabilnost nastalih kompleksa.

2.2.2. Antiproliferativna aktivnost u in vitro

Lijek koji se već dulje vrijeme koristi u liječenju raka je etopozid (slika 9). Etopozid je kemoterapeutik koji se koristi u liječenju raka zbog svoje sposobnosti da ometa replikaciju DNK i inducira staničnu smrt. Njegov primarni mehanizam djelovanja uključuje ciljanje topoizomeraze II, enzima koji je ključan za replikaciju DNK i diobu stanica. Ovaj mehanizam u konačnici rezultira nakupljanjem oštećenja DNK, izazivajući staničnu smrt, što je posebno učinkovito u liječenju raka jer se cilja na stanice koje se brzo dijele.¹⁶ Novosintetizirani spojevi pokazali su se učinkovitiji i imali su bolje djelovanje na dvije vrste stanica raka HCT116 (stanice raka debelog crijeva) i MCF-7 (stanice raka dojki). Učinkovitost ovih spojeva je mjerena u malim količinama (u submikromolarnom području) što znači da su snažni i u malim dozama.



Slika 9. Struktura etopozida¹⁷

DNK i RNK su molekule u stanicama koje nose genetske informacije. Način na koji se spojevi vežu na DNK i RNK ovisi o tome gdje se nalaze amino bočni lanci i naboju. Afinitet vezanja opisuje koliko se čvrsto spoj veže za DNK i RNK molekule te jače vezanje ima veću

vjerojatnost da će utjecati na stanicu. Studija je pokazala da novosintetizirani spojevi imaju umjeren do visok afinitet vezanja.¹ Antiproliferativna aktivnost novosintetiziranih spojeva testirana je na stanicama HCT116, MCF-7, H 460 (stanice raka pluća) u uvjetima *in vitro*. Rezultati su prikazani u tablici 3 i uspoređeni s lijekom etopozidom.

Tablica 3. Antiproliferativna aktivnost testiranih spojeva i $\log P$ vrijednosti¹

Compd	R ₁	R ₂	IC ₅₀ ^a (μM)				clogP ^b
			HCT116	MCF-7	H460	HEK 293	
5a	F	H	5 ± 1.4	≥100	≥100	n.t. ^c	2.86
5b	F	H	≥100	≥100	≥100	n.t.	2.86
6	NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	0.4 ± 0.08	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.08	3.34
7	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	0.5 ± 0.02	0.4	0.3 ± 0.05	0.5 ± 0.2	4.26
8	piperidine	H	5.5 ± 1.5	3 ± 0.9	≥100	n.t.	3.87
9	piperazine	H	0.4 ± 0.06	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.08	0.7 ± 0.4	2.47
10	NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H	2.3 ± 0.5	12 ± 4.5	11 ± 1.7	4 ± 0.09	3.34
11	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	3 ± 1.7	3 ± 2	12 ± 4	n.t.	4.26
12	piperidine	H	10 ± 2.7	5 ± 4.5	49 ± 0.01	n.t.	3.87
13	piperazine	H	0.9 ± 0.8	3.1 ± 1.2	7 ± 0.7	n.t.	2.47
20	H	Cl	3 ± 3	6 ± 4	≥100	n.t.	3.30
21	F	Cl	3 ± 0.06	2 ± 0.6	≥100	n.t.	3.44
22	H	Cl	0.1 ± 2	2 ± 0.4	4.6 ± 1.6	1.6 ± 0.1	3.30
23	F	Cl	3.5 ± 2	2 ± 0.8	≥100	n.t.	3.44
24	H	NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0.9 ± 0.03	2.9 ± 1.3	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2	3.72
25	H	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	≥100	≥100	≥100	>100	4.64
26	H	piperidine	47 ± 0.6	16 ± 1.3	≥100	n.t.	4.08
27	H	piperazine	3.6 ± 0.3	4.7 ± 0.5	1.8 ± 1	n.t.	2.68
28	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	3 ± 0.2	1.8 ± 0.3	5.4 ± 0.4	n.t.	5.78
29	piperidine	piperidine	1 ± 0.8	0.5 ± 0.2	≥100	>100	5.04
30	piperazine	piperazine	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.4	0.2 ± 0.1	2.25
31	H	NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	0.8 ± 0.1	3.2 ± 0.5	2 ± 0.1	2.6 ± 0.7	3.72
32	H	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	14 ± 2.7	14 ± 3.5	17.5 ± 0.7	>100	4.64
33	H	piperidine	≥100	≥100	≥100	n.t.	4.08
34	H	piperazine	3.5 ± 1.2	3 ± 2.8	7 ± 0.6	n.t.	2.68
35	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	3.7 ± 0.4	2 ± 0.7	7.6 ± 0.5	n.t.	5.78
36	piperidine	piperidine	1.8 ± 0.1	3.6 ± 0.6	7 ± 3.5	n.t.	5.04
37	piperazine	piperazine	≥100	≥100	≥100	>100	2.25
Etoposide	—	—	5 ± 2	1 ± 0.7	0.1 ± 0.04	—	—

^a IC₅₀; the concentration that causes 50% growth inhibition.

^b clogP; calculated logP values were obtained by using ChemDraw Professional 15.0.; c) not tested.

12 derivata se istaknulo svojom antiproliferativnom aktivnošću ili citotoksičnim djelovanjem na nekancerogene stanice HEK 293 (stanice bubrega ljudskog embrija). Cilj je bio utvrditi antiproliferativna svojstva s obzirom na položaj amino supstituenata i N atoma u piridinskom prstenu. Većina ovih spojeva pokazali su dobru antiproliferativnu aktivnost prema stanicama raka, no bez značajne selektivnosti među stanicama raka. Iznimke su spojevi 5a, 10, 24, 31, 13 i 22 koji su pokazali bolju aktivnost prema stanicama HCT116 u odnosu na druge stanice raka. Nekoliko spojeva je pokazalo bolje djelovanje, posebno prema stanicama HCT116, u usporedbi sa lijekom etopozidom. Velik utjecaj na poboljšanje antiproliferativne aktivnosti imao je položaj N atoma unutar piridinskog prstena. Regioizomeri 6, 7 i 9 s amino supstituentima na položaju 2 imali su bolju aktivnost u usporedbi sa spojevima 10, 11 i 13. Njihove IC₅₀ vrijednosti su bile u nanomolarnom području koncentracije (0,3–0,9 mM). Vrijednost IC₅₀

kritični je parametar u farmakologiji i toksikologiji, a predstavlja koncentraciju tvari potrebnu za inhibiciju biološkog procesa za 50 %. Ove vrijednosti pomažu u predviđanju interakcija između lijekova i odabiru održivih kandidata za lijekove.¹⁸ Pozicija N atoma nije imala značajan utjecaj na antiproliferativnu aktivnost kod 5-amino supstituiranih regioizomera. Regioizomer pod rednim brojem 30 ima bolju aktivnost u usporedbi s regioizomerom pod rednim brojem 37 koji uopće nije pokazao inhibicijski efekt. S obzirom na lipofilnost derivata imidazo[4,5-*b*]piridina, vrijednosti *clogP* su porasle uvođenjem N izobutyla (bočnog lanca) na svim pozicijama u tetracikličkom skeletu, a smanjenje lipofilnosti je uočeno nakon uvođenja piperazinskog prstena.¹ O koeficijentu radiobe, *logP*, između oktan-1-ola i vode ovisi čitav niz čimbenika odgovornih za djelovanje lijeka u organizmu, kao što su npr. raspodjela lijeka u organizmu, vezanje lijeka za receptor, prolazak lijeka kroz biološke membrane itd. Ovaj parametar postao je opće prihvaćen za kvantitativni opis lipofilnog karaktera biološki učinkovitih spojeva te jedan od najvažnijih parametara u dizajniranju novih lijekova, odnosno utvrđivanju biološke učinkovitosti sintetiziranih spojeva. Zbog tako velike važnosti koeficijenta razdiobe, zadnjih dvadesetak godina razvijen je velik broj empirijskih i teorijskih pristupa određivanja, odnosno izračunavanja vrijednosti *logP*.¹⁹ Za ispitivanje interakcija s cinkovim i bakrovim(II) ionima u ovom radu su korišteni spojevi pod rednim brojem 6, 10, 25 i 32 u tablici 3.

2.3. Bakar

Bakar je poslije željeza vjerojatno tehnički najvažniji metal, elektronske konfiguracije $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ i s njime se svakodnevno susrećemo. U prirodi se nalazi kao elementarna tvar, ali se pretežno javlja u obliku sulfidnih ruda. To su halkopirit ($\text{CuFeS}_2 = \text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{Fe}_2\text{S}_3$), halkozin (Cu_2S) i kovelin (CuS). Iz tih ruda se dobiva više od 80% bakra. Osim sulfidnih ruda nalazi se i u obliku oksida, kuprit (Cu_2O), malahit ($\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$) i azurit ($\text{Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$). Bakar je metal karakteristične svijetlocrvenkaste boje, relativno mekan, ali vrlo žilav i rastezljiv. Može se izvlačiti u tanke žice. Upotreba bakra zasniva se na njegovoj izvanrednoj električnoj i toplinskoj vodljivosti, otpornosti prema koroziji i dobrim mehaničkim osobinama. Nakon srebra, bakar ima najveću električnu vodljivost u usporedbi s drugim metalima.²⁰ Također, on je esencijalni element u prehrani, jedan je od najzastupljenijih metalnih elemenata u ljudskom tijelu, iako je toksičan u velikim količinama. Pokazuje bogatu koordinacijsku kemiju, prvenstveno u jednovalentnom i dvovalentnom oksidacijskom stanju. Spojevi bakra pronašli su opsežnu praktičnu upotrebu, uključujući katalizatore u homogenim i heterogenim reakcijama,

kao fungicidi, pesticidi i konzervansi za drvo, kao pigmenti za boje i gline i u važnim nedavno otkrivenim visokotemperaturnim supravodičima. Kompleksni spojevi bakra poznati su u oksidacijskim stanjima od 0 do +4. Oksidacijska stanja +2 i +1 su najčešća, ali oksidacijsko stanje +2 dominira. Poznat je samo mali broj Cu^{3+} kompleksa, a Cu^0 i Cu^{4+} kompleksi su jako rijetki. Koordinacijski brojevi i geometrija bakrovih kompleksa variraju s oksidacijskim stanjem. Većina karakteriziranih Cu^{3+} kompleksa ima kvadratno-planarnu geometriju, kao što je i uobičajeno za prijelazne metale s d^8 elektronskom konfiguracijom. Za sferno simetrični d^{10} Cu^+ ion, uobičajene geometrije su dvokoordinatne linearne, trokoordinatne trigonalne planarne i četverokoordinatne tetraedarske. Uočena su neka odstupanja od ove idealne geometrije osobito s kelirajućim ligandima. Izolirano je i karakterizirano nekoliko pentakoordinatnih Cu^+ kompleksa. Cu^+ spojevi su dijamagnetični i bezbojni i lako se oksidiraju u Cu^{2+} spojeve. Ion Cu^{2+} (d^9) obično se nalazi u tetragonalnoj koordinacijskoj okolini, s četiri kratke ekvatorijalne veze i dvije duže aksijalne veze (Jahn-Teller efekt), iako su poznati i neki četverokoordinatni tetraedarski i planarni kompleksi. Budući da je Cu^{2+} manji i više nabijen od Cu^+ , jače interagira s molekulama vode. Rezultat je veća stabilnost Cu^{2+} u vodenim otopinama od Cu^+ (unatoč stabilnoj konfiguraciji d^{10}). Prisutnost mekih liganada kao što su donori sumpora ili nezasićeni donori dušika mogu stabilizirati ion Cu^+ . N-donor i O-donor ligandi su vrlo česti u Cu^{2+} kemiji i pokrivaju širok raspon vrsta liganda, na primjer N-donor ligandi uključuju amonijak i kelate poput etilendiamina, nitrito skupine, azide, dušikom vezane cijanate i aromatske amine kao što su piridini i imidazoli. Također postoji niz Cu^{2+} kompleksa sa S-donorskim ligandima.²¹ Cu^{2+} ima bogatu i svestranu koordinacijsku kemiju i tvori brojne komplekse s N-,O- i S-donorskim ligandima. Ako ovi ligandi imaju dodatne skupine za vodikove veze, elektrostatske, hidrofobne ili π - π interakcije slaganja, mogu se koristiti za povećanje afiniteta vezanja ili za dodjelu selektivnosti i ciljnog prepoznavanja specifičnih sekvenci DNA, konformacija ili struktura višeg reda. Dok se Cu^{2+} ioni koordiniraju s fosfatnim skupinama i nukleobazama (posebno GC parovi) kompleksi se mogu dodatno vezati za DNA putem nekovalentnih interakcija kojima upravlja koordinacijska geometrija i priroda liganda.²²

2.4. Cink

U Zemljinoj kori cinka ima otprilike stotinu puta više nego bakra. Glavne rude su mu sfalerit (ZnS) i smitsonit (ZnCO₃). Elektronska konfiguracija cinka je [Ar]3d¹⁰4s². U svim spojevima cink ima stupanj oksidacije +2.¹¹ Svježe rezani cink je sjajni metal plavičastog sjaja koji brzo potamni na vlažnom zraku. Cink se koristi za zaštitu željeza galvanizacijom, primjerice na brodovima ili cijevima koje se nalaze u moru, koristi se za razne legure poput mjedi koja je mješavina cinka i bakra. Ovisno o udjelu cinka može biti crveno-zlatne, zlatno-žute i žute boje, dok srebrno-bijela postaje kada je udio cinka veći od 45%.²³ Cink se nalazi i u ljudskom organizmu (2–3 mg) i to najviše u mišićima i kostima, a u manjim količinama u jetri, zubima, kosi, koži i dr. Nalazi se u mnogim enzimima i kao njihov kofaktor sudjeluje u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, lipida i proteina, a važan je i za sintezu nukleinskih kiselina potrebnih za rast i razvoj stanica. Bitan je i za imunološki sustav jer ima ulogu u stvaranju bijelih krvnih stanica u koštanoj srži, sazrijevanju T-limfocita i stvaranju antitijela.²⁴ Budući da cink ima ispunjenu d-ljusku, njegovi spojevi su bezbojni i dijamagnetični. Ima jednu zajedničku značajku s prijelaznim elementima, a to je njegova sklonost stvaranju velikog broja stabilnih kompleksa s O-donorskim, N-donorskim i S-donorskim ligandima kao i s halogenidima, pseudohalidima i cijanidom. Koordinacijski brojevi cinkovih(II) kompleksa se kreću od 2 do 8 a neki primjeri su prikazani u tablici 4.²⁵

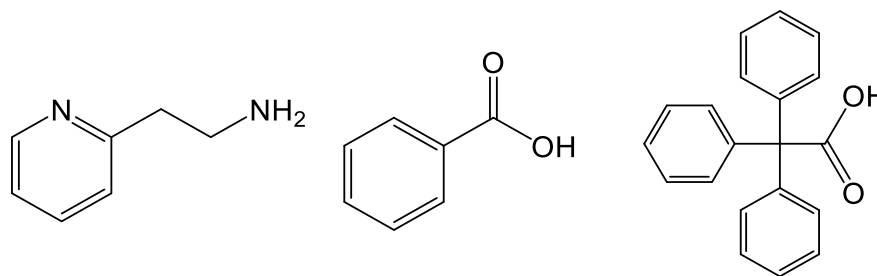
Tablica 4. Stereokemija cinkovih(II) kompleksa²⁴

KOORDINACIJSKI BROJ	STEREOKEMIJA	PRIMJER
2	LINEARNA	ZnCl ₂
3	PLANARNA	[ZnMe(NPh ₃) ₂]
4	TETRAEDAR PLANARNA	[ZnCl ₄] ²⁻ [Zn(TPP)] ²⁺
5	TRIGONSKO BIPIRAMIDALNA KVADRATNO PIRAMIDALNA	[Zn(tren)NCS] ⁺ [Zn(acac) ₂ OH ₂]
6	OKTAEDAR	[Zn(en) ₃] ²⁺
7	PENTAGONSKA BIPIRAMIDA	[Zn(15-kruna-5)(OH ₂) ₂] ²⁺
8	DODEKAEDAR	[Zn(NO ₃) ₄] ²⁻

(Me=metil, Ph₃=fosfin, TPP=tetrafenilporfirin, tren=tris(2-aminoetil)amin, acac=acetilaceton, en=etilendiamin)

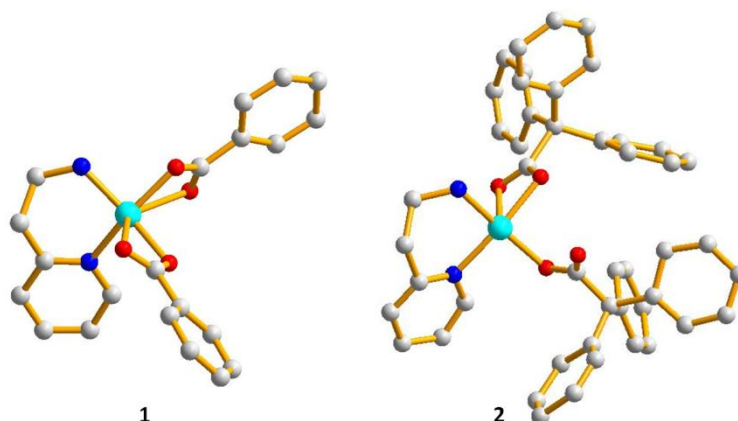
2.5. Mononuklearni Cu(II), Zn(II) kompleksi sa 2-aminoetilpiridinom i karboksilatom

Metalni kompleksi s različitim okruženjem liganda stekli su veliku važnost zbog njihove brojne upotrebe u kemiji i biologiji. Među njima kompleksi cinka i bakra imaju ključnu ulogu umjetnih nukleaza i kao farmaceutski agensi. Utvrđeno je da se ti kompleksi vežu s biomolekulama kao što su nukleinske kiseline (DNK i RNK). Nekoliko mononuklearnih jednostavnih i mješovitih kompleksa bakra i cinka pripremani su i korišteni kao sredstva protiv raka.²⁶ Mononuklearni kompleksi bakra(II) i cinka(II) sintetizirani su korištenjem 2-aminoetilpiridina (engl. *2-aminoethyl pyridine*, 2-AEP) kao liganda te benzojeve kiseline (engl. *benzoic acid*, BA) i trifeniloctene kiseline (engl. *triphenylacetic acid*, TPAA) kao pomoćni ligandi (slika 12). Monokristalna XRD (engl. *X-ray diffraction analysis*) kompleksa otkrila je različite geometrije nastalih kompleksa.



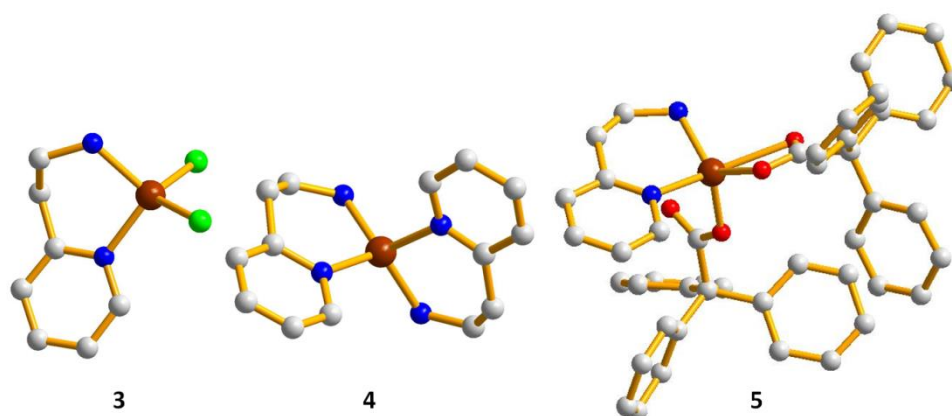
Slika 12. Strukture 2-aminoetilpiridin(2-AEP), benzojeva kiselina(BA) i trifeniloctena kiselina(TPAA)²⁵

Kompleks 1 sastava $[\text{Cu}(2\text{-AEP})(\text{BA})_2]$ (2-AEP=2-aminoetilpiridin,BA=benzojeva kiselina) ima oktaedarsku geometriju. Ovu koordinaciju omogućuju dva N atoma iz 2-aminoetilpiridina, zajedno s četiri atoma O iz dvije molekule benzoata. Kompleks 2 sastava $[\text{Cu}(2\text{-AEP})(\text{TPAA})_2]$ (TPAA=trifeniloctena kiselina) ima kvadratno-piramidalnu geometriju. Ova koordinacija dolazi od dva N atoma iz 2-aminoetilpiridina, zajedno sa četiri atoma O iz dvije trifenilacetatne molekule. Kompleksi 1 i 2 se nalaze na slici 13.



Slika 13. Strukture kompleksa $[\text{Cu}(2\text{-AEP})(\text{BA})_2]$ i kompleksa $[\text{Cu}(2\text{-AEP})(\text{TPAA})_2]$ ²⁵

Kompleks 3 sastava $[\text{Zn}(2\text{-AEP})(\text{Cl})_2]$ ima tetraedarsku geometriju koja se sastoji od jedne molekule 2-aminoetilpiridina i dva kloridna iona. Kompleks 4 sastava $[\text{Zn}(2\text{-AEP})_2](\text{ClO}_4)_2$ također ima tetraedarsku geometriju za koju su odgovorne dvije molekule 2-aminoetilpiridina i dvije molekule perklorata. Kompleks 5 sastava $[\text{Zn}(2\text{-AEP})(\text{TPAA})_2]$ ima kvadratno-piramidalnu geometriju. Koordinacija je određena pomoću dva N atoma iz 2-aminoetilpiridina, zajedno sa četiri atoma O od dvije trifenilacetatne molekule. Kompleksi 3,4 i 5 se nalaze na slici 14.



Slika 14. Strukture kompleksa $[\text{Zn}(2\text{-AEP})(\text{Cl})_2]$, $[\text{Zn}(2\text{-AEP})_2](\text{ClO}_4)_2$ i $[\text{Zn}(2\text{-AEP})(\text{TPAA})_2]$ ²⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Cinkov acetat dihidrat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, SigmaAldrich, Merck

Bakrov(II) acetat monohidrat, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Kemika

Metanol, CH_3OH , visoke čistoće (MS grade), Carlo Erba, Španjolska

Mravlja kiselina, HCOOH , visoke čistoće (MS grade), Carlo Erba, Španjolska

Acetonitril, CH_3CN , visoke čistoće (MS grade), Carlo Erba, Španjolska

Ultračista voda, dobivena pomoću Mili-Q Advantage A10 sustava za pročišćavanje, Merck, Njemačka

Spojevi 1–4 su pripremljeni su prema postupku opisanom u radu B. Lončar i suradnici.¹

3.2. Instrumenti

Analiza uzoraka provedena je spektrometrijom masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzoraka pomoću Agilent 1290 Infinity II UHPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor.

3.3. Priprema otopina za analizu

Spoj 1 mase 0,54 mg otopljen je u 1 mL metanola. U alikvot od 30 μL dodano je 300 μL metanola. Konačna koncentracija spoja 1 iznosi $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Otopina cinkovog acetata dihidrata pripremljena je otapanjem 1,06 mg $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 3 mL metanola i konačna koncentracija iznosi $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Zatim su pripremljene otopine cinkovog acetata dihidrata i spoja 1 volumena 300 μL u omjerima prikazanim u tablici 1.

Tablica 1. Pripremljene otopine cinkova acetata dihidrata i spoja **1** u različitim volumnim omjerima

(Zn ²⁺):(spoj 1)	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
V(spoj 1) / μL	26,75	26,75	26,75	26,75	26,75
V(Zn ²⁺) / μL	26,25	13,125	86,25	52,50	78,75
V(CH ₃ OH) / μL	247,00	260,125	187,00	220,75	194,55

Otopina bakrovog(II)acetata monohidrata pripremljena je otapanjem 1,07 mg Cu(CH₃COO)₂×H₂O u 3 mL metanola i konačna koncentracija iznosi 1,79×10⁻³ mol dm⁻³. Zatim su pripremljene otopine bakrovog(II)acetata monohidrata i spoja **1** volumena 300μL u omjerima prikazanim i tablici 2.

Tablica 2. Pripremljene otopine bakrova(II) acetata monohidrata i spoja **1** u različitim volumnim omjerima

(Cu ²⁺):(spoj 1)	1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
V(spoj 1) / μL	26,75	26,75	26,75	26,75	26,75
V(Cu ²⁺) / μL	23,46	11,73	8,98	46,93	70,39
V(CH ₃ OH) / μL	249,79	261,52	254,27	226,32	202,86

Otopina spoja **2** pripremljena je otapanjem 0,92 mg spoja **2** u 1 mL metanola i konačna koncentracija iznosi 2,67×10⁻³ mol dm⁻³. Otopina spoja **3** pripremljena je otapanjem 0,94 mg spoja **3** u 1 mL metanola i konačna koncentracija iznosi 2,98×10⁻³ mol dm⁻³. Otopina spoja **4** pripremljena je otapanjem spoja **4** u 1 mL metanola i konačna koncentracija iznosi 2,72×10⁻³ mol dm⁻³. U tablici 3 se nalaze volumeni koji su potrebni da se pripreme otopine cinkovog acetata dihidrata sa spojevima **2**, **3** i **4** u omjeru 1:2 volumena 300 μL.

Tablica 3. Pripremljene otopine cinkovog acetata dihidrata sa spojevima **2**, **3** i **4** u volumnom omjeru 1:2, volumeni spojeva **2**, **3** i **4** iznose 100 μL

	(Zn ²⁺):(spoj 2)=1:2	(Zn ²⁺):(spoj 3)=1:2	(Zn ²⁺):(spoj 4)=1:2
V(Zn ²⁺) / μL	83,44	93,13	85
V(CH ₃ OH) / μL	116,56	106,87	115

U tablici 4 se nalaze volumeni koji su potrebni da se pripreme otopine bakrovog(II) acetata monohidrata sa spojevima **2**, **3** i **4** u volumnom omjeru 1:2 volumena 300 μL .

Tablica 4. Pripremljene otopine bakrovog(II) acetata monohidrata sa spojevima **2**, **3** i **4** u volumnom omjeru 1:2, volumeni spojeva **2**, **3** i **4** iznose 100 μL

	(Cu ²⁺):(spoj 2)=1:2	(Cu ²⁺):(spoj 3)=1:2	(Cu ²⁺):(spoj 4)=1:2
V(Cu ²⁺) / μL	75	83,24	76
V(CH ₃ OH) / μL	125	116,76	124

3.4. Analiza uzoraka

Analiza uzoraka je provedena spektrometrijom masa visokog razlučivanja Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzoraka pomoću Agilent 1290 Infinity II UHPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor. Otopine uzoraka bile su uvedene u instrument injektiranjem 5 μL otopine uzorka uz protok mobilne faze 0,4 mL min⁻¹. Korištene su dvije mobilne faze, čisti metanol te mobilna faza koja se sastoji od 0,1% mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrilu (B), u volumnom omjeru A:B 50:50. Cjelokupni spektri su snimani uz pozitivnu ionizaciju (ESI⁺ mode) u području vrijednosti m/z 100–3000, a CID (MS/MS) eksperimenti su snimani u području m/z 50–1300. Kao protočni plin i plin za desolvaciju korišten je dušik. Fragmentacija analita provedena je pri kolizijskim energijama 10 V, 20 V, 30 V i 40 V. Parametri snimanja prikazani su u tablici 5.

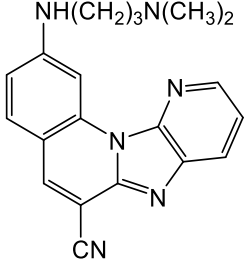
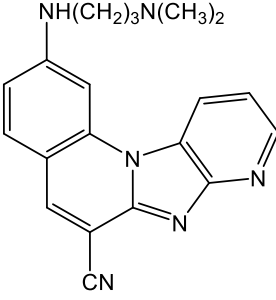
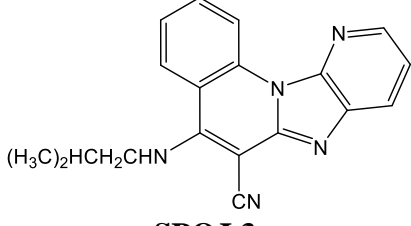
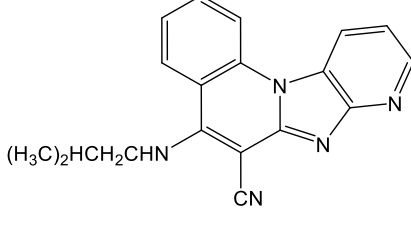
Tablica 5. Parametri snimanja spektara metodom spektrometrije masa

Temperatura protočnog plina	200 °C
Protok protočnog plina	17 L min ⁻¹
Temperatura plina za desolvaciju	350 °C
Protok plina za desolvaciju	11 L min ⁻¹
Tlak raspršivača	25 psi
Potencijal kapilare	3500 V

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Nedavno je sintetiziran niz tetracikličkih derivata imidazo[4,5-*b*]piridina kao potencijalnih antiproliferativnih sredstava. Nekoliko spojeva pokazalo je izražene citostatske učinke u submikromolarnom području, posebice na stanice raka HCT116 i MCF-7. Dobiveni rezultati potvrdili su značajan utjecaj položaja dušika u piridinskom prstenu na pojačanje antiproliferativne aktivnosti, posebno za derivate koji nose amino bočne lance na položaju 2. Cilj ovog rada je proučavanje potencijala vezanja biološki važnih iona metala (cinkov i bakrov(II)ion) sa spojevima **1**, **2**, **3** i **4** MS-om. Rezultati ovog diplomskog rada bi služili za procjenu mogućih nekovalentnih interakcija spojeva u tablici 6 s metalnim ionima (cinkov i bakrov(II)ion) u budućoj primjeni predmetnih spojeva u studijama djelovanja u stanici ali i kao potencijalni novi spojevi za daljnja istraživanja i primjenu u medicini.

Tablica 6. Strukture spojeva korištenih za ispitivanje potencijala vezanja cinkovog i bakrovog(II) iona i njihova imena koji odgovaraju strukturama spojeva 6, 10, 25 i 32 u tablici 3 antiproliferativnih aktivnosti

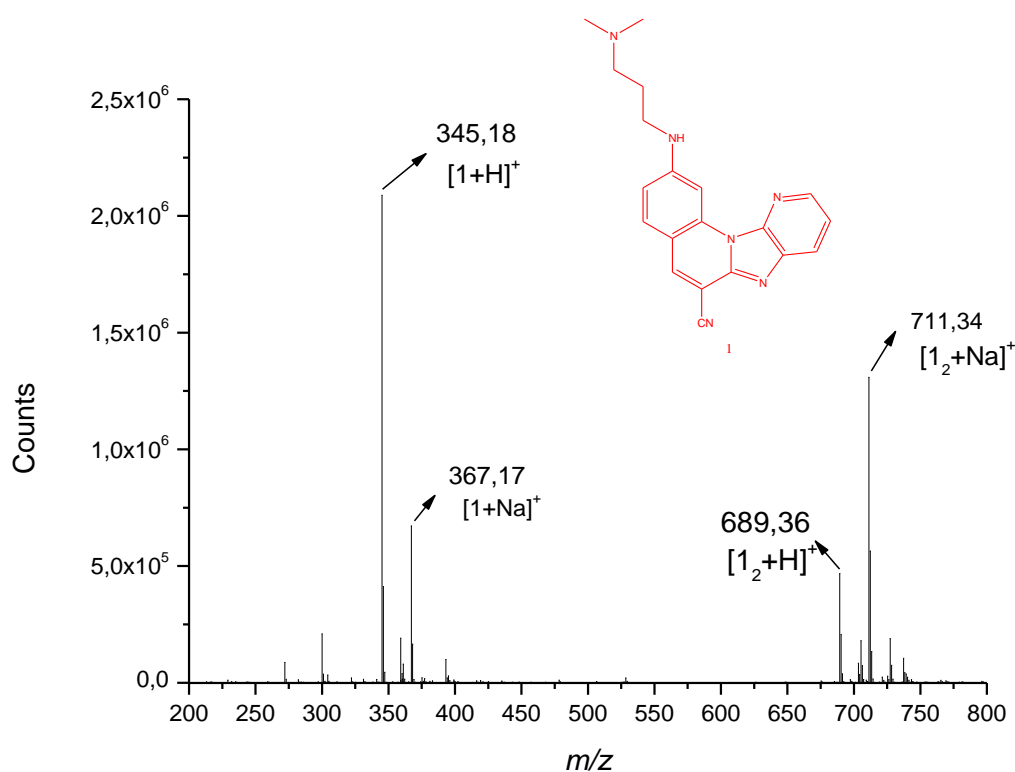
STRUKTURA	IME
 <p style="text-align: center;">SPOJ 1</p>	2-[(3-(<i>N,N</i> -dimetilamino)propil)amino]pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril
 <p style="text-align: center;">SPOJ 2</p>	2-[(3-(<i>N,N</i> -dimetilamino)propil)amino]pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril
 <p style="text-align: center;">SPOJ 3</p>	5-(<i>N</i> -izobutilamino)pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril
 <p style="text-align: center;">SPOJ 4</p>	5-(<i>N</i> -izobutilamino)pirido[3',2':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

4.1. Analiza otopina spojeva pomoću ESI-MS

Pripremljene su otopine spojeva **1**, **2**, **3** i **4** u metanolu te analizirane pomoću ESI-MS u pozitivnom modu. Važniji signali su asignirani koristeći tandemni MS/MS. Strukture pojedinih fragmenata određene su na osnovu MS/MS rezultata.

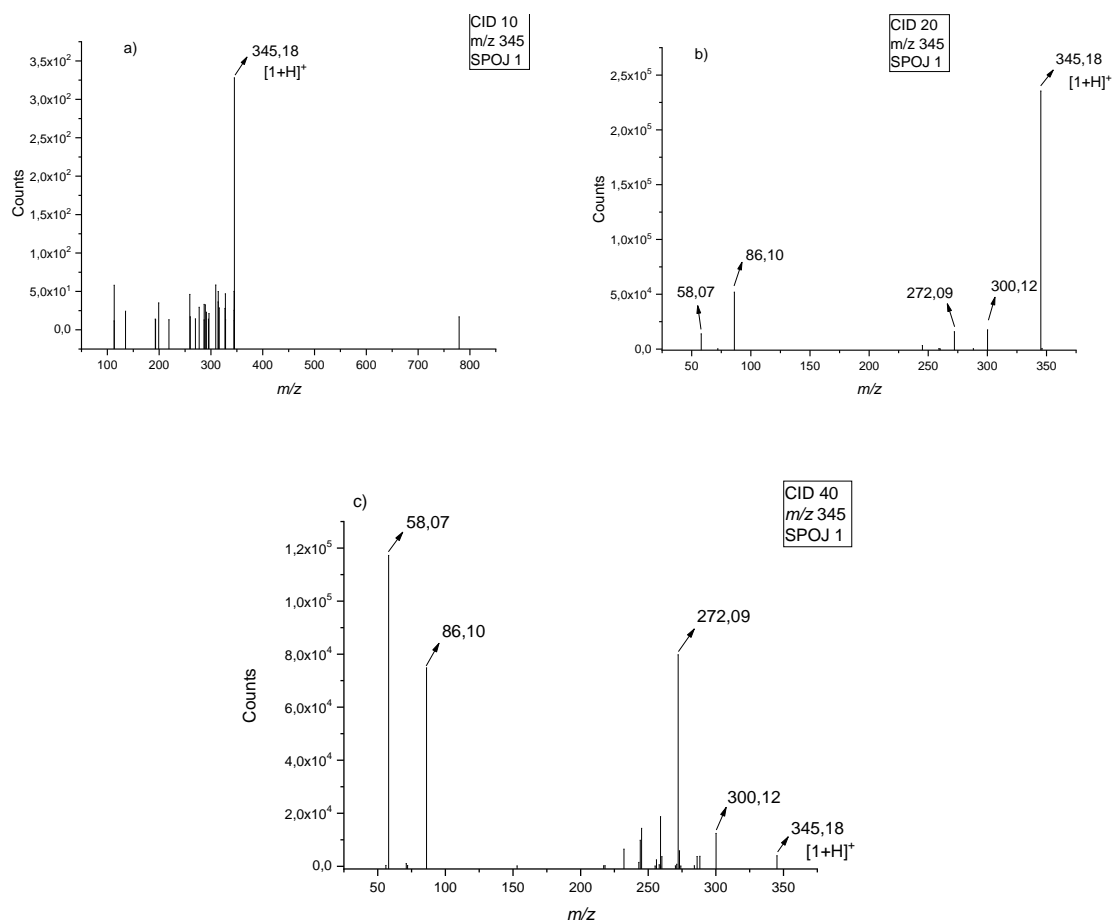
4.1.1. Analiza spoja **1**

Spoj **1** ($M_r=344,41 \text{ g mol}^{-1}$) je otopljen u MeOH i primijenjen je postupak snimanja cjelokupnog spektra (ukupne ionske struje) u pozitivnom ionizacijskom načinu. U cjelokupnom spektru opažen je signal za molekularni ion, ali i niz signala koji odgovaraju novonastalim specijama kao rezultat nekovalentnih interakcija između iona u otopini. Specije su asignirane i potvrđene uspoređivanjem eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele. Strukture pojedinih specija određene su na osnovu MS/MS rezultata.



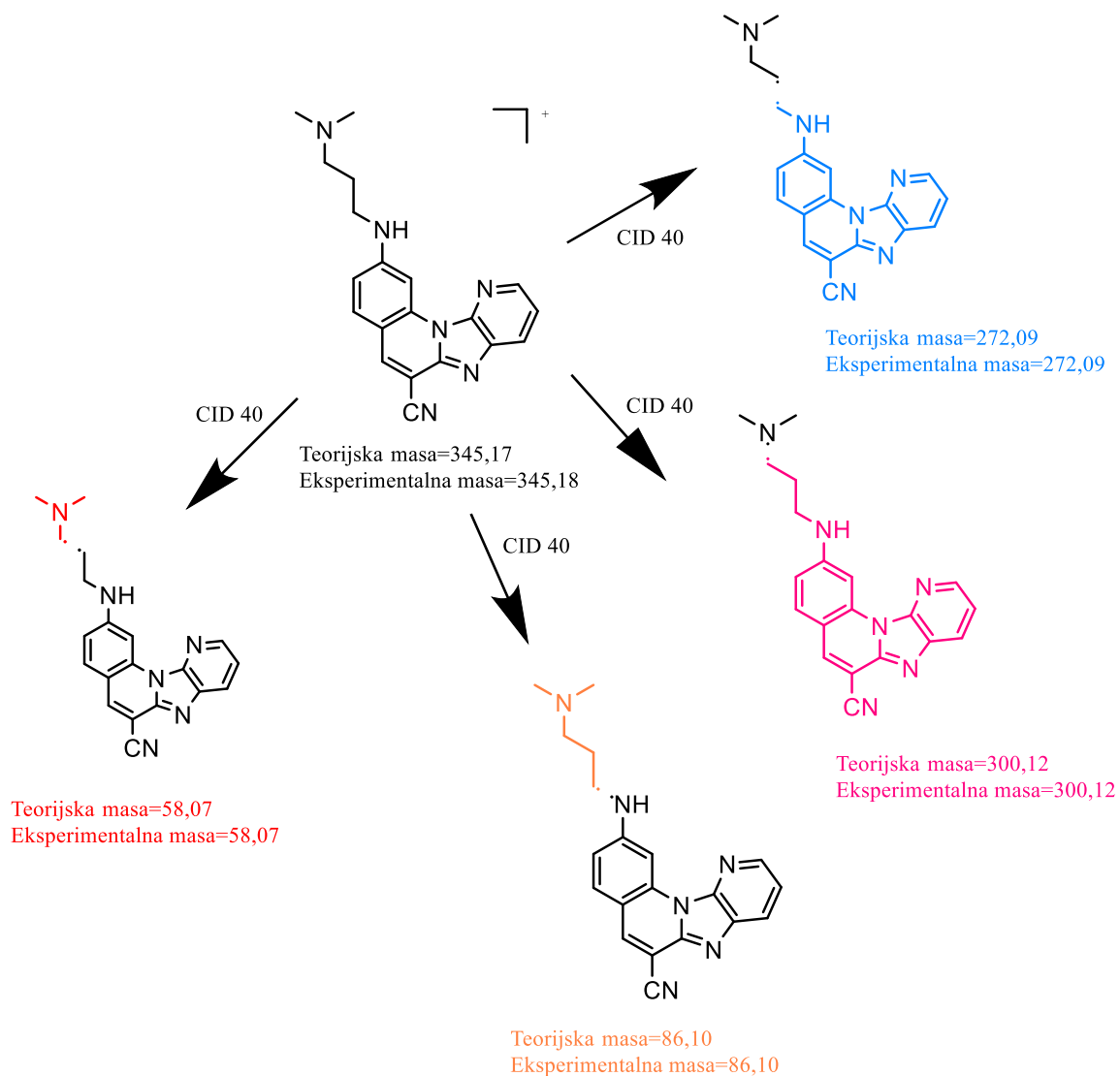
Slika 15. Spektar spoja **1** otopljenog u MeOH koncentracije $c=1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 200 do 800 i pozitivnom načinu snimanja uz mobilnu fazu metanol

Na slici 15 asignirane su sve značajnije specije opažene u cjelokupnom spektru za spoj **1** otopljenom u MeOH. Opaženo je da su glavni signali adukti spoja **1**. Signal kod 345,18 m/z je asigniran kao protonirana molekula spoja **1**, a kod 689,36 m/z kao protonirani dimer spoja **1**. Signal kod 367,17 m/z je asigniran kao adukt spoja **1** s natrijevim ionom, a kod 711,34 m/z kao adukt dviju molekula spoja **1** sa natrijevim ionom.



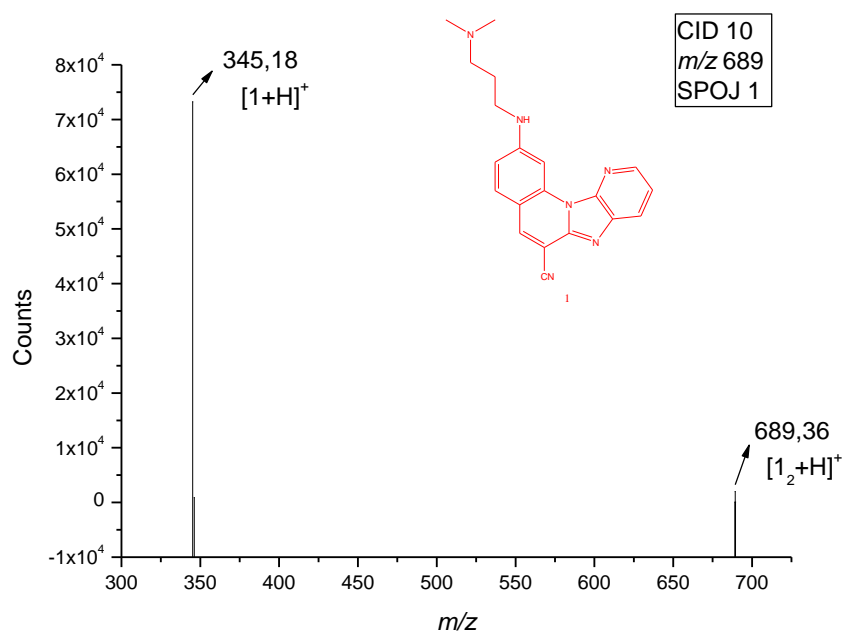
Slika 16. MS/MS spektri signala kod m/z 345,18 spoja **1** otopljenog u MeOH pri različitim kolizijskim energijama a) 10 V b) 20 V c) 40 V

Usporedbom fragmentacije signala protonirane molekule kod m/z 345,18 na slici 16 pri različitim kolizijskim energijama opaženo je da kod nižih kolizijskih energija (10 V) nema fragmentacije, a kod viših (>20) je fragmentacija izražena. Predložen je fragmentacijski put signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **1** na temelju dobivenih fragmentacijskih signala na slici 17. Signali asignirani na slici 16 odgovaraju strukturama na slici 17.



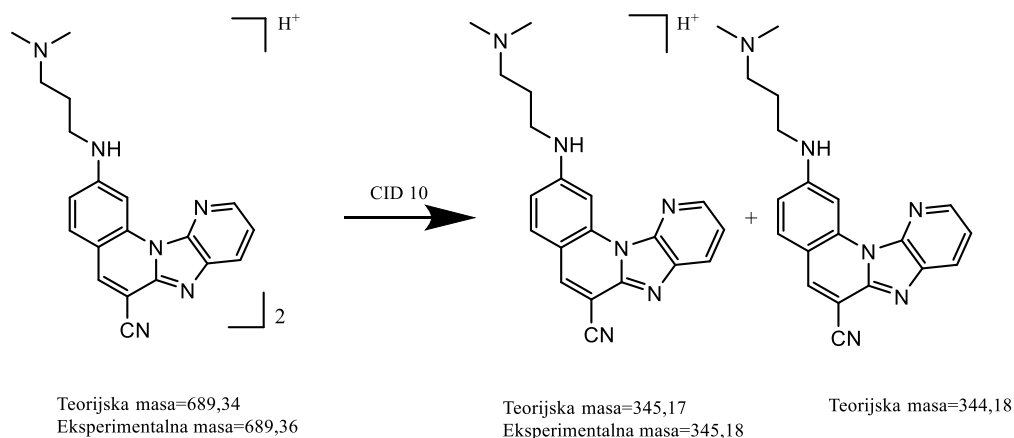
Slika 17. Fragmentacijski put signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **1**

Opaženo je da se fragmentacija odvija isključivo na amino bočnom lancu na različitim mjestima što je i očekivano zbog velike stabilnosti imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena.

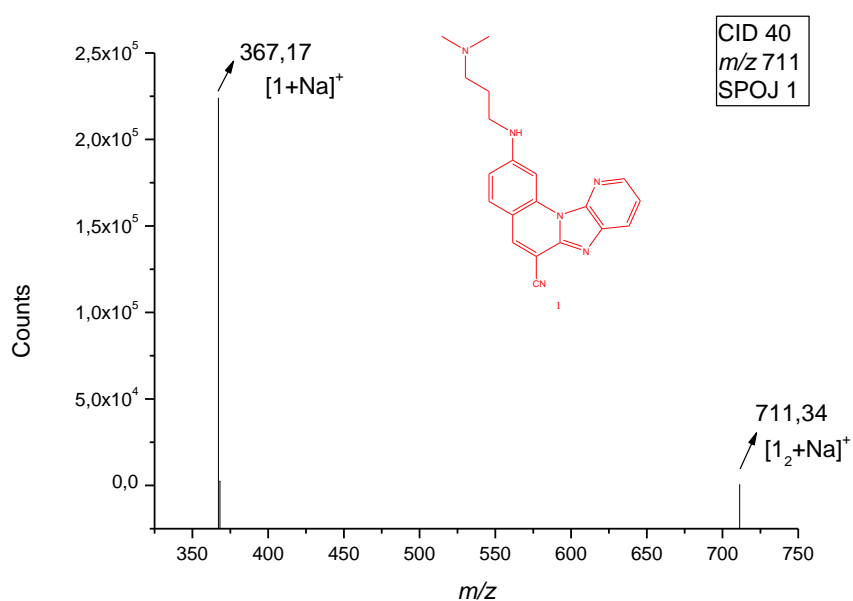


Slika 18. MS/MS spektar fragmentiranog signala kod m/z 689,36 pri kolizijskoj energiji od 10 V

Signal kod m/z 689,36 je asigniran kao protonirani dimer spoja **1** što je i opaženo u spektru na slici 18 jer je uočen signal kod m/z 345,18 koji odgovara protoniranoj molekuli spoja **1**. Odnosno došlo je do fragmentacije signala kod m/z 689,36 na protoniranu molekulu spoja **1** i neutralnu molekulu spoja **1**. Za fragmentaciju signala kod m/z 689,36 asigniranog kao protonirani dimer spoja **1** bila je dovoljna kolizijska energija od 10 V. Na slici 19 je prikazana fragmentacija signala kod m/z 689,36. Očekivano je da će dušik koji se nalazi na amino bočnom lancu imati najveći afinitet prema protonu a ne dušik koji je dio imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena zbog velike stabilnosti prstena.



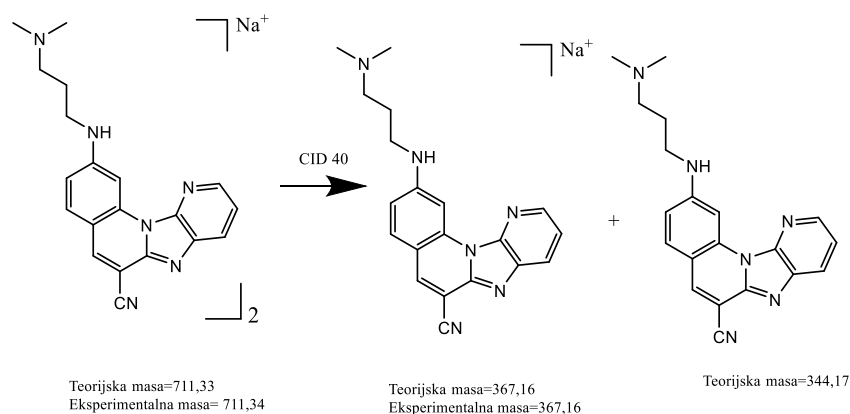
Slika 19. Fragmentacija signala kod m/z 689,36 asigniranog kao protonirani dimer spoja **1** pri kolizijskoj energiji od 10 V



Slika 20. MS/MS spektar fragmentiranog signala kod m/z 711,34 pri kolizijskoj energiji od 40 V

Signal kod m/z 711,34 je asigniran kao adukt dvije molekule spoja **1** s natrijevim ionom što je i opaženo u spektru na slici 20 jer je uočen signal kod m/z 367,17 koji je asigniran kao adukt molekule spoja **1** s natrijevim ionom. Odnosno došlo je do fragmentacije signala kod m/z 711,34 na adukt molekule spoja **1** s natrijevim ionom i na neutralnu molekulu spoja **1**. Za fragmentaciju

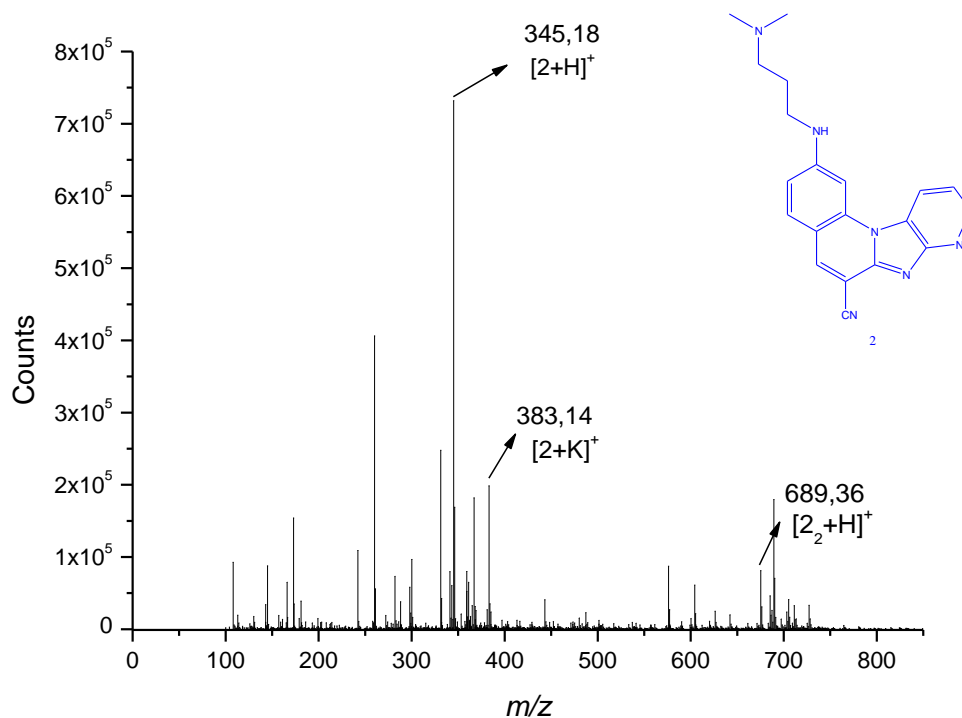
signala kod m/z 711,34 bila je potrebna kolizijska energija od 40 V. Pri nižim kolizijskim energijama nije došlo do fragmentacije signala kod m/z 711,34 što znači da je on vrlo stabilan. U usporedbi sa signalom kod m/z 689,36 kod kojeg je već pri 10 V došlo do fragmentacije, signal kod m/z 711,34 je stabilniji. Na slici 21 je prikazana fragmentacija signala kod m/z 711,34.



Slika 21. Fragmentacija signala kod m/z 711,34 asigniranog kao natrijev adukt molekule spoja **1** i natrijevog iona pri kolizijskoj energiji od 40 V

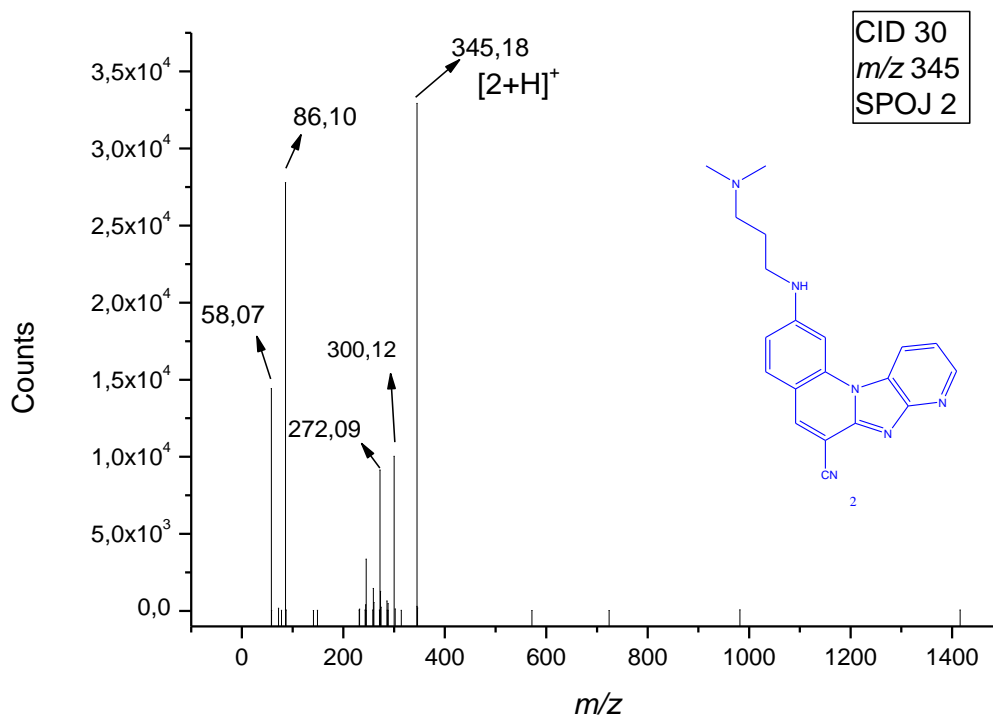
4.1.2. Analiza spoja **2**

Spoj **2** ($M_r=344,41$ g mol⁻¹) je otopljen u MeOH i primijenjen je postupak snimanja cjelokupnog spektra (ukupne ionske struje) u pozitivnom ionizacijskom načinu snimanja. U cjelokupnom spektru opažen je signal za molekulski ion, ali i niz signala koji odgovaraju novonastalim specijama kao rezultat nekovalentnih interakcija iona koji se nalaze u otopini. Specije su asignirane i potvrđene uspoređivanjem eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele. Strukture pojedinih specija određene su na osnovu MS/MS rezultata.



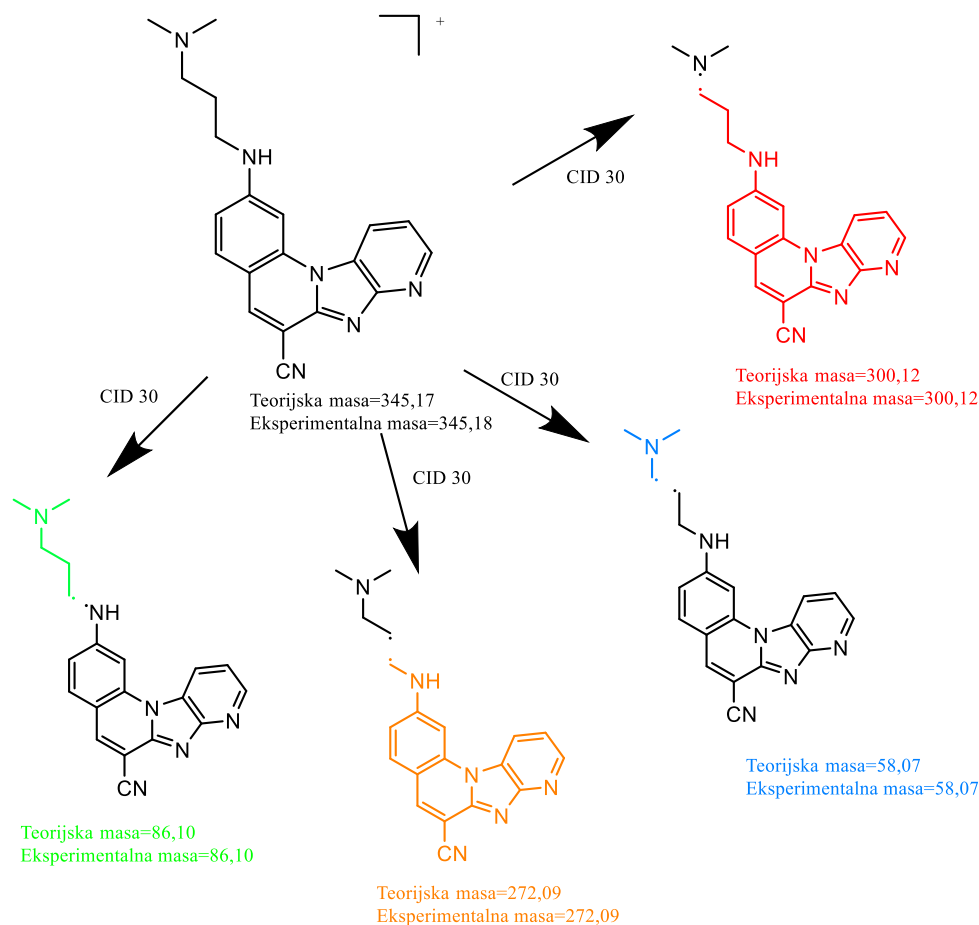
Slika 22. Spektar spoja **2** otopljenog u MeOH koncentracije $c=2,67 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ u području m/z 0 do 850 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

Spojevi **1** i **2** imaju istu molarnu masu, ali različit položaj dušikovog atoma u piridinskom prstenu što znači da su regioizomeri. Uspoređivanjem slike 15 i slike 22 uočeno je da cijelokupni spektri spoja **1** i **2** nisu u potpunosti jednaki ali postoje signali u kojima se poklapaju. Također razlikuju se u izraženosti određenih signala. Spoj **1** nije imao toliko izražen signal kod m/z 383,14 koji je asigniran kao adukt molekule spoja **1** s kalijevim ionom, dok se kod spoja **2** taj signal bolje uočava. Kod fragmentacije protonirane molekule spoja **2**, odnosno signala kod m/z 345,18, bila je potrebna kolizijska energija veća od 20 V kao i kod fragmentacije protonirane molekule spoja **1** (signala kod m/z 345,18). spoj **1**.



Slika 23. MS/MS spektar signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **2** otopljenog u MeOH koncentracije $2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri kolizijskoj energiji od 30 V

MS/MS spektar signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **2** ima izražene jednake signale kao i MS/MS spektar signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **1**. Na temelju toga je prikazan fragmentacijski put signala kod m/z 345,18 spoja **2** i nalazi se na slici 24.

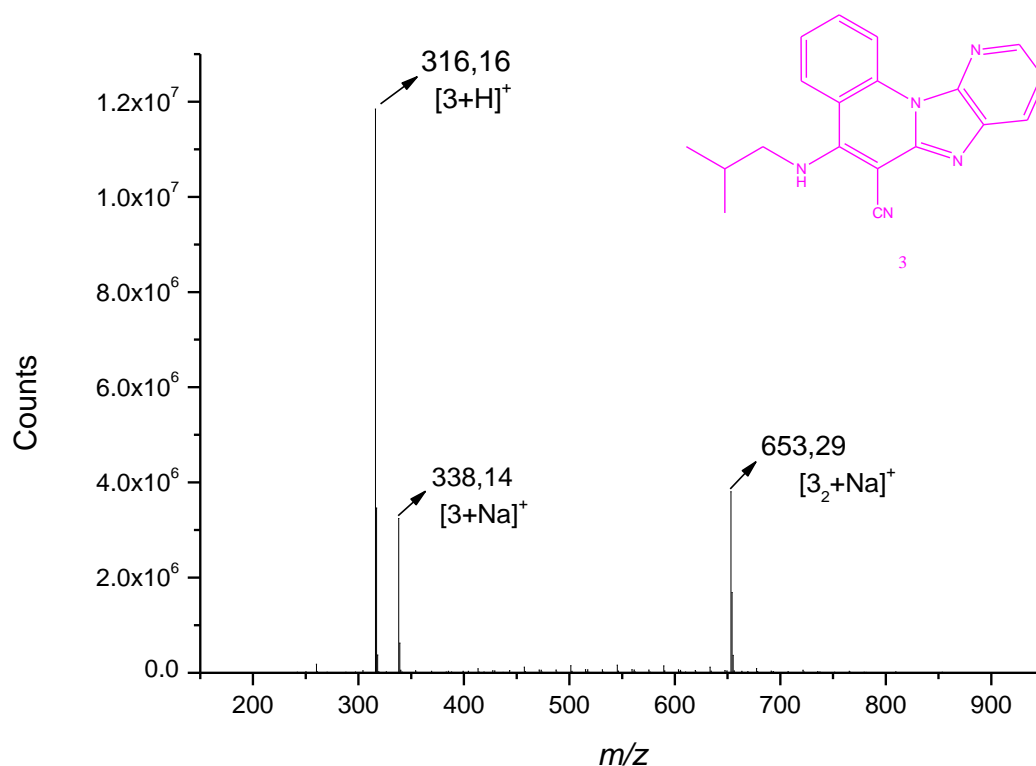


Slika 24. Fragmentacijski put signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **2**

Fragmentacija signala kod m/z 345,18 asigniranog kao protonirana molekula spoja **2** se isključivo događa na amino bočnom lancu kao i kod spoja **1**. Time se može dodatno potvrditi stabilnost imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena.

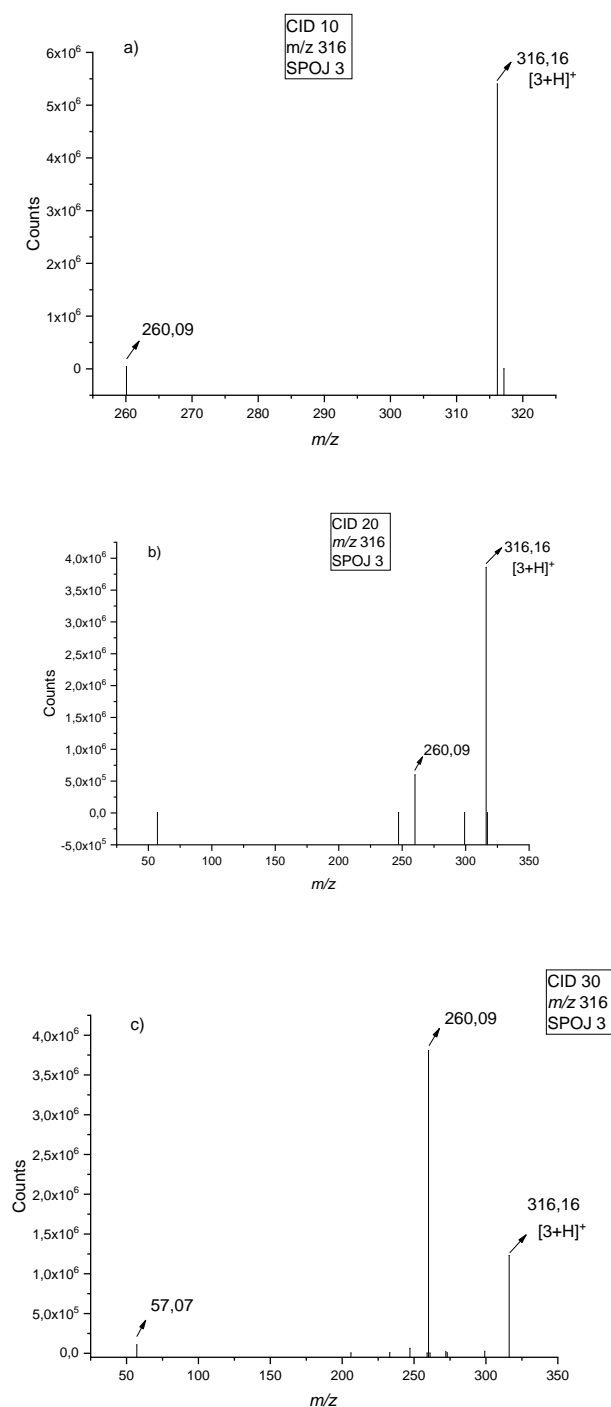
4.1.3. Analiza spoja **3**

Spoj **3** ($M_r=315,37 \text{ g mol}^{-1}$) je otopljen u MeOH i primijenjen je postupak snimanja cjelokupnog spektra (ukupne ionske struje) u pozitivnom ionizacijskom načinu snimanja. U cjelokupnom spektru opažen je signal za molekularni ion, ali i niz signala koji odgovaraju novonastalim specijama kao rezultat nekovalentnih interakcija između iona koji se nalaze u otopini. Specije su asignirane i potvrđene uspoređivanjem eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele. Strukture pojedinih specija određene su na osnovu MS/MS rezultata.



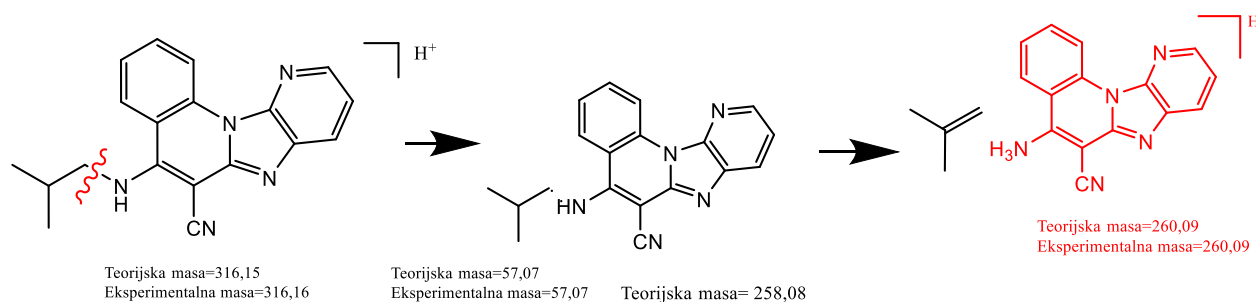
Slika 25. Spektar spoja **3** otopljenog u MeOH koncentracije $c=2,98 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ u području m/z 0 do 950 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u omjeru 50:50

Na slici 25 asignirani su svi značajniji signali uočeni za spoj **3** otopljen u MeOH. Opaženo je da prevladava protonirana molekula spoja **3** i adukt molekule spoja **3** i natrijevog iona. Signal kod 316,16 m/z je asigniran kao protonirana molekula spoja **3**, a kod 653,29 m/z kao adukt dviju molekula spoja **3** s natrijevim ionom. Signal kod 338,14 m/z je asigniran kao adukt molekule spoja **3** s natrijevim ionom.



Slika 26. MS/MS spektri signala kod m/z 316,16 asigniranog kao protonirana molekula spoja **3** otopljenog u MeOH koncentracije $2,98 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ pri različitim kolizijskim energijama a) 10 V b) 20 V c) 30 V

Fragmentacija signala kod m/z 316,16 asigniranog kao protonirana molekula spoja **3** je najbolje uočena pri kolizijskoj energiji od 30 V na slici 26. Predložen je fragmentacijski put signala kod m/z 316,16 spoja **3** na temelju dobivenih fragmentacijskih signala na slici 27.

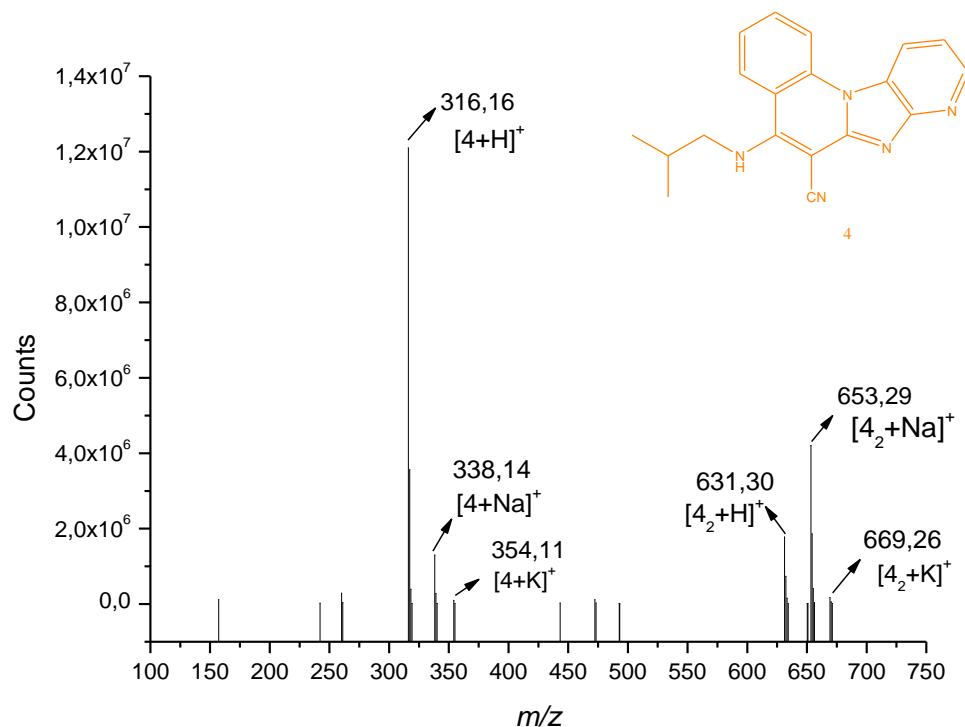


Slika 27. Fragmentacijski put signala kod m/z 316,16 asigniranog kao protonirana molekula spoja **3**

Na temelju fragmentacije signala kod m/z 345, 18 asigniranog kao protonirana molekula kod spojeva **1** i **2** uočeno je da se ona isključivo događa na amino bočnom lancu zbog velike stabilnosti imidazo[4,5-*b*]piridinskog prstena. Kod spoja **3** je također očekivana fragmentacija na tom mjestu u molekuli što je i uočeno na temelju dobivenog MS/MS spektra. Na slici 27 je u prvom koraku prikazana fragmentacija na označenom mjestu. Teorijska masa fragmenata u potpunosti nije odgovarala dobivenoj masi u MS/MS spektru te je zaključeno da je u drugom koraku došlo do prijenosa H^+ iona radi nastajanja stabilnijih specija.

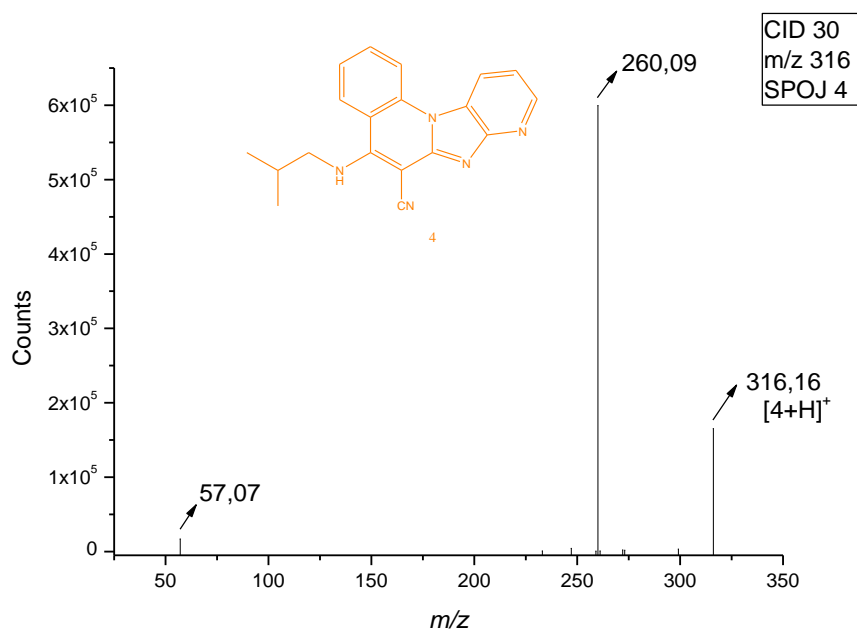
4.1.4. Analiza spoja 4

Spoj **4** ($M_r=315,37 \text{ g mol}^{-1}$) je otopljen u MeOH i primijenjen je postupak snimanja cjelokupnog spektra (ukupne ionske struje) u pozitivnom ionizacijskom načinu snimanja. U cjelokupnom spektru opažen je signal za molekulski ion, ali i niz signala koji odgovaraju novonastalim specijama kao rezultat nekovalentnih interakcija između iona koji se nalaze u otopini. Specije su asignirane i potvrđene uspoređivanjem eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele. Strukture pojedinih fragmenata određene su na osnovu MS/MS rezultata.

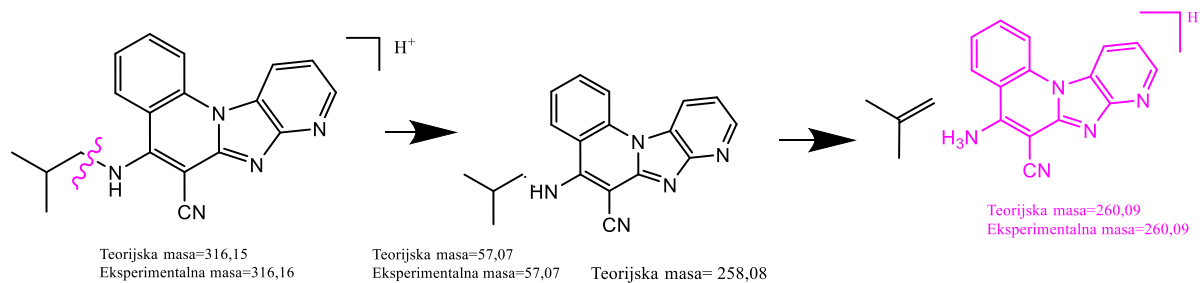


Slika 28. Spektar spoja **4** otopljenog u MeOH koncentracije $c=2,72 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ u području m/z 100 do 750 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

Spoj **3** i spoj **4** imaju istu molarnu masu, a različit položaj dušikovog atoma u piridinskom prstenu što znači da su regioizomeri. Uspoređivanjem slike 25 i slike 28 uočeno je da cijelokupni spektri spoja **3** i **4** nisu u potpunosti jednaki ali postoje signali u kojima se poklapaju. Također razlikuju se u izraženosti određenih signala. Spoj **3** nije imao toliko izražen signal kod m/z 354,11 koji je asigniran kao adukt molekule spoja **3** s kalijevim ionom i signal kod m/z 669,26 koji je asigniran kao adukt dviju molekula spoja **3** s kalijevim ionom u usporedbi sa spojem **4**. Kod fragmentacije signala kod m/z 316,16 spoja **4** bila je potrebna kolizijska energija veća od 20 V kako bi se bolje uočili signali kao i kod fragmentacije signala kod m/z 316,16 spoja **3**.



Slika 29. MS/MS spektar signala kod m/z 316,16 asigniranog kao protonirana molekula spoja **4** otopljenog u MeOH koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri kolizijskom energijom od 30 V



Slika 30. Fragmentacijski put signala kod m/z 316,16 asigniranog kao protonirana molekula spoja **4**

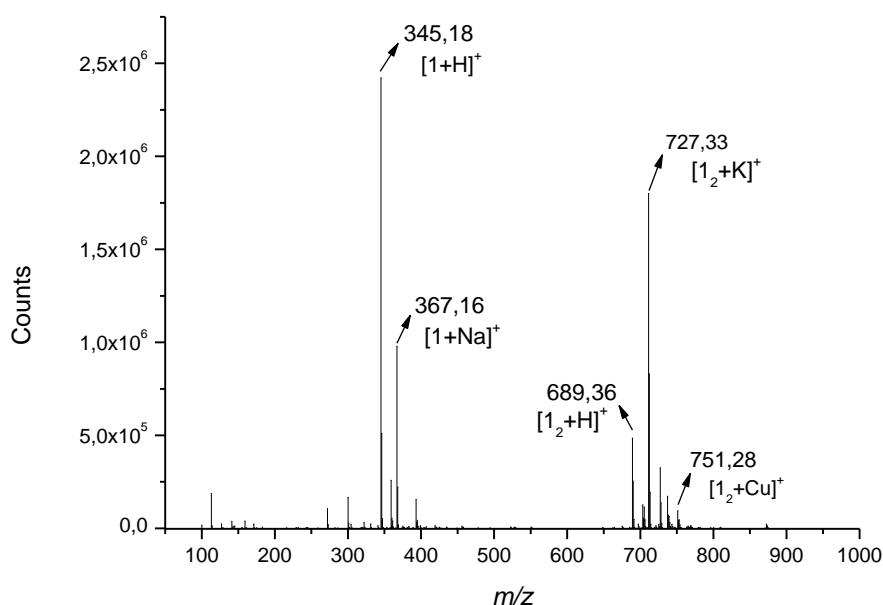
Na slici 30 predložen je fragmentacijski put signala kod m/z 316,16 asigniranog kao protonirana molekula spoja **4** koji također vrijedi i za spoj **3**.

4.2. Analiza otopina bakrova(II)acetata monohidrata i spojeva 1-4 pomoću MS

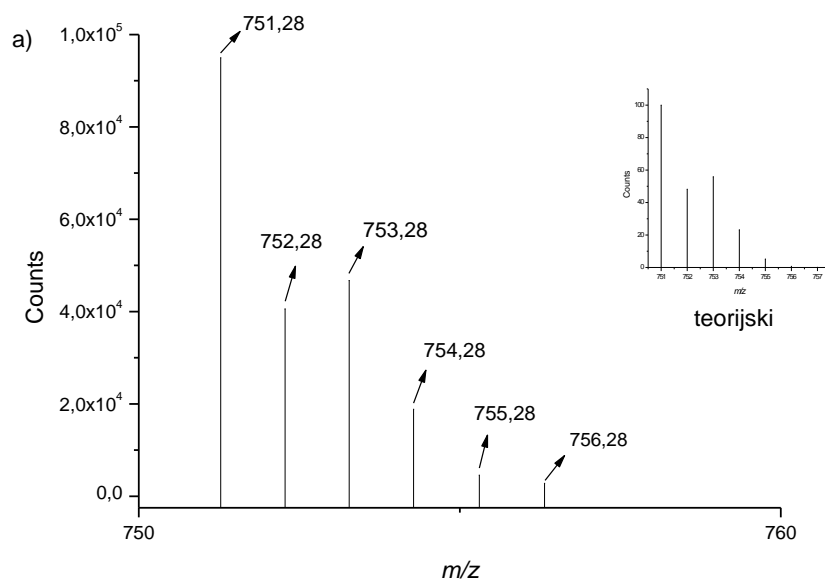
Snimljeni su cjelokupni spektri otopina bakrova(II) acetata monohidrata i spojeva 1-4 u pozitivnom ionizacijskom načinu snimanja (ESI⁺). Specije su asignirane i potvrđene uspoređivanjem eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele. Strukture pojedinih specija određene su na osnovu MS/MS rezultata.

4.2.1. Analiza otopine bakrova(II)acetata monohidrata i spoja 1

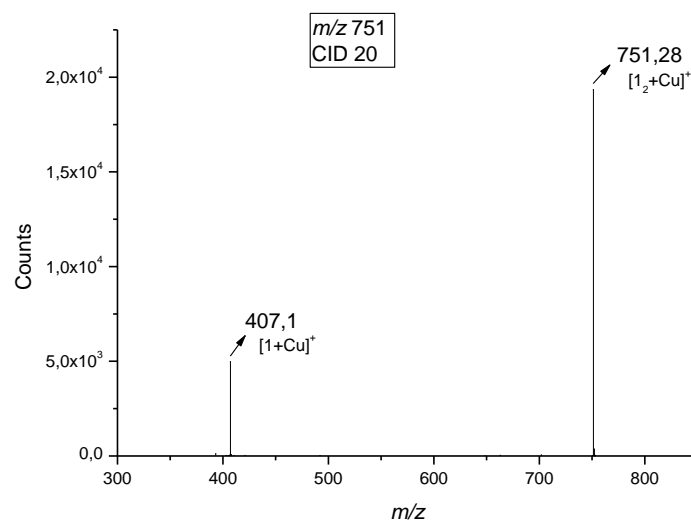
Snimljen je cjelokupni spektar otopine bakrova(II)acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 1 koncentracije $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ u pozitivnom načinu snimanja. Označene su najizraženije vrijednosti u spektru. Signal kod 345,18 m/z je asigniran kao protonirana molekula spoja 1, a kod 689,36 m/z kao protonirani dimer spoja 1. Signal kod 367,16 m/z je asigniran kao adukt spoja 1 s natrijevim ionom. Signal kod 727,33 m/z je asigniran kao adukt dviju molekula spoja 1 s kalijevim ionom. Signal kod 751,28 m/z je asigniran kao kompleks spoja 1 s bakrovim(II) ionom.



Slika 31. Cjelokupni spektar otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 1 koncentracije $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ u području $m/z = 0$ do 1000 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi metanolu

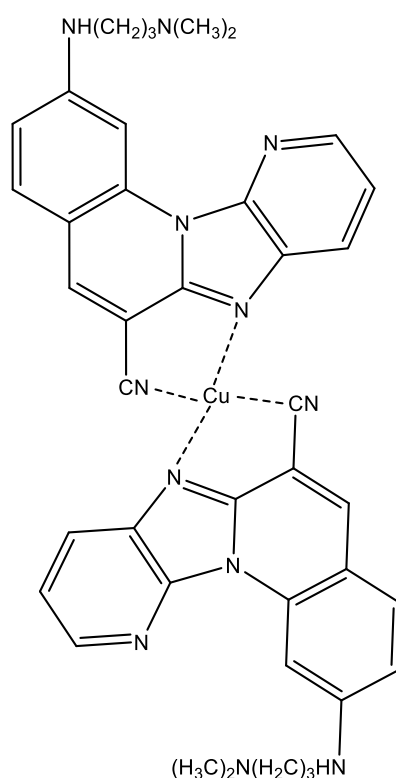


Slika 32. Uvećani dobiveni spektar i teorijski prikaz izotopne raspodjele signala m/z 751,28 asigniran kao kompleks spoja **1** s bakrovim(II) ionom u otopini bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **1** koncentracije $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 750 do 760 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi metanolu



Slika 33. MS/MS spektar signala kod m/z 751,28 asigniranog kao kompleks spoja **1** s bakrovim(II) ionom u otopini bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **1** koncentracije $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 300 do 850 u pozitivnom načinu snimanja pri kolizijskom energijom od 20 V

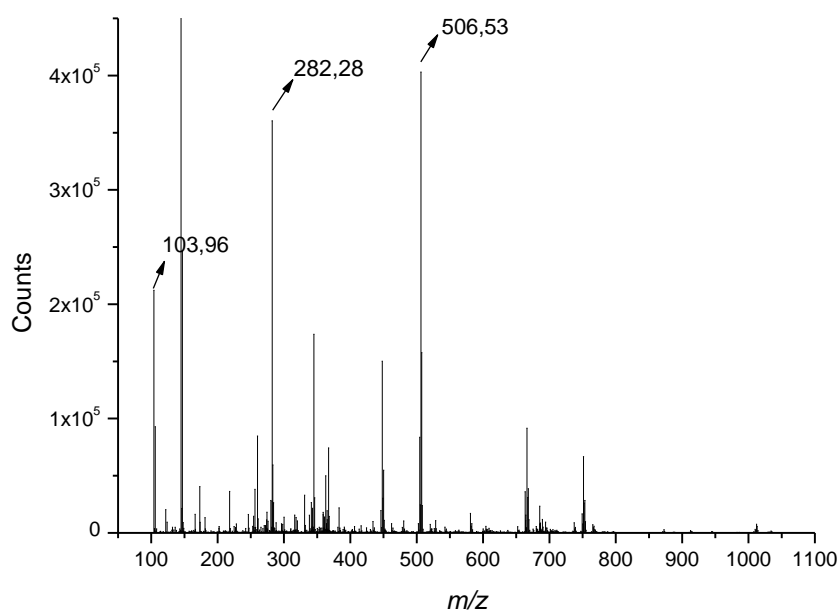
Dobiveni spektar izotopne raspodjele signala kod 751,28 m/z odgovara kompleksu spoja **1** s bakrovim(II) ionom jer se podudara sa teorijskom izotopnom raspodjelom. Također je utvrđeno da se radi o kompleksu sastavljenom od dviju molekula spoja **1** i bakrovim(II) ionom iz slike 32. Fragmentacijom signala kod 751,28 m/z pojavio se signal 407,1 m/z koji odgovara kompleksu molekule spoja **1** s bakrovim(II) ionom. Biološki ligandi najčešće ostvaruju veze s metalima preko atoma dušika, kisika ili sumpora. Oni koordiniraju metalni centar na strogo određen način te ovisno o uvjetima koji prevladavaju grade komplekse različite geometrijske strukture. Predložena je struktura kompleksa na slici 34.



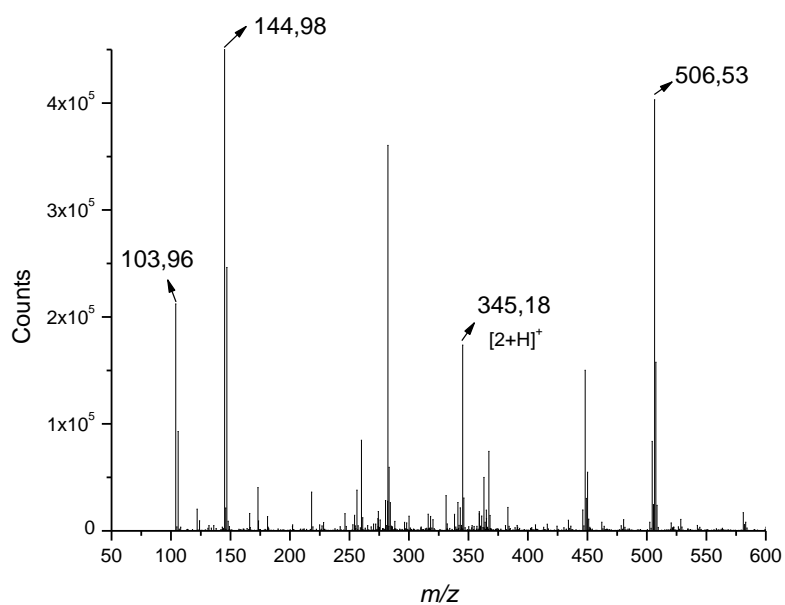
Slika 34. Predložena struktura kompleksa spoja **1** s bakrovim(II) ionom

4.2.2. Analiza otopine bakrova(II)acetata monohidrata i spoja 2

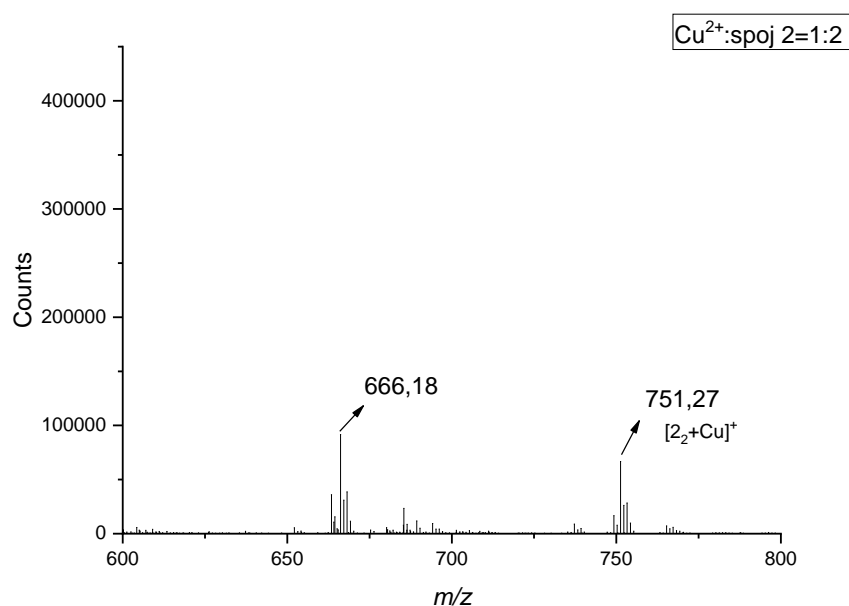
Snimljen je cjelokupni spektar otopine bakrova(II)acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 2 koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u pozitivnom načinu snimanja. Označene su najizraženije vrijednosti u spektru. Prikazan je uvećani dio spektra u području m/z 50 do 600 (slika 20) i u području m/z 600 do 800 (slika 21) kako bi se bolje uočili i lakše asignirali opaženi signali. S obzirom na to da spojevi 1 i 2 imaju jednaku molarnu masu očekuje se sličan izgled spektra, međutim cjelokupni spektri spoja 1 i spoja 2 s bakrovim(II) ionom se dosta razlikuju zbog toga što su regioizomeri te to utječe na nekovalentne interakcije između iona u otopini. Signali u kojima se podudaraju nisu jednako izraženi i uočeni su signali u kojima se razlikuju. Signal kod $345,18 \text{ m/z}$ je asigniran kao protonirana molekula spoja 2, a signal kod $751,27 \text{ m/z}$ je asigniran kao kompleks spoja 2 s bakrovim(II) ionom.



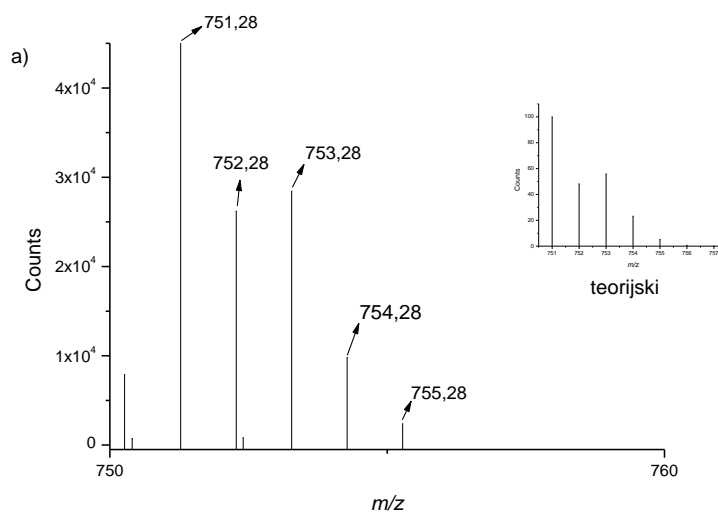
Slika 35. Cjelokupni spektar otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 2 koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 50 do 1100 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



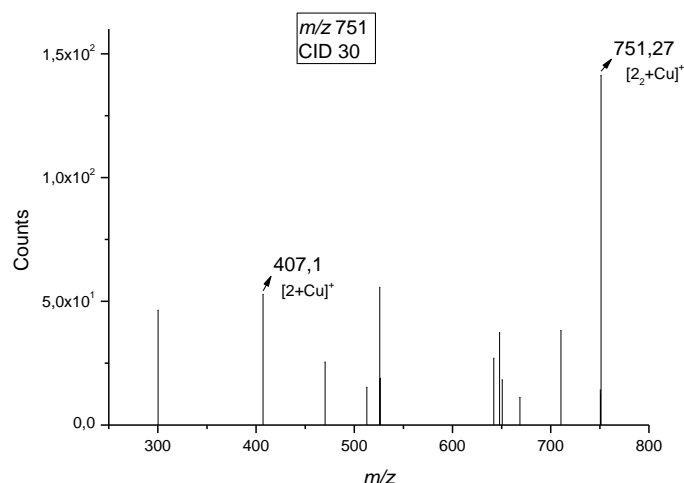
Slika 36. Uvećani dio spektra otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **2** koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 50 do 600 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



Slika 37. Uvećani dio spektra otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **2** koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 600 do 800 u pozitivnom načinu snimanja

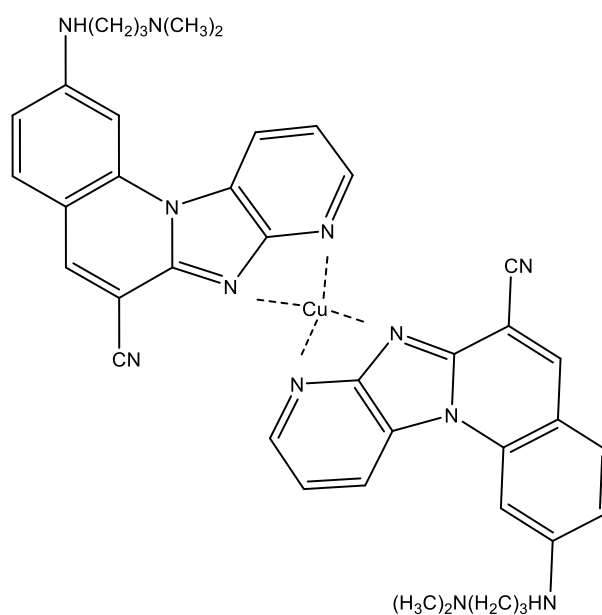


Slika 38. Uvećani dobiveni spektar i teorijski prikaz izotopne raspodjele signala kod m/z 751,28 asigniranog kao kompleks spoja **2** s bakrovim(II) ionom u otopini bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **2** koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 750 do 760 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



Slika 39. MS/MS spektar signala kod m/z 751,27 otopine bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **2** koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 250 do 800 u pozitivnom načinu snimanja pri kolizijskom energijom od 30 V

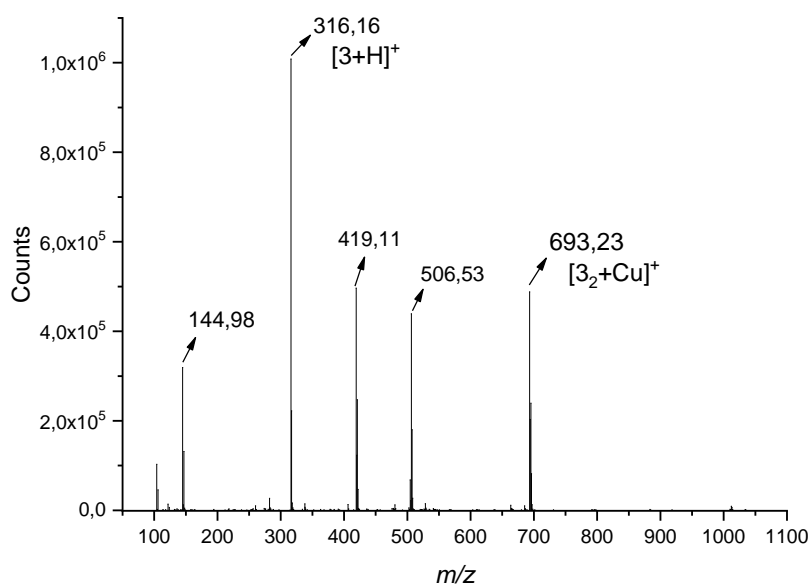
Signal kod 751,28 m/z odgovara kompleksu spoja **2** s bakrovim(II) ionom jer se podudara sa teorijskom izotopnom raspodjelom. Također je utvrđeno da se radi o kompleksu sastavljenom od dviju molekula spoja **2** i bakrovog(II) iona iz slike 38. Fragmentacijom signala kod 751,28 m/z pojavio se signal kod 407,1 m/z koji je asigniran kao kompleks molekule spoja **2** s bakrovim(II) ionom. Predložena je struktura kompleksa na slici 40.



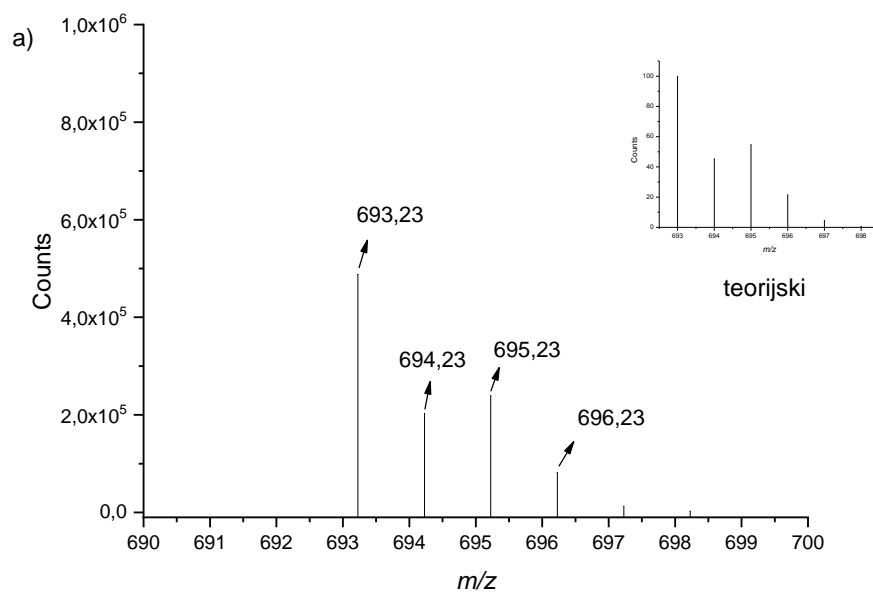
Slika 40. Predložena struktura kompleksa spoja **2** s bakrovim(II) ionom

4.2.3. Analiza otopine bakrova(II) acetata monohidrata i spoja 3

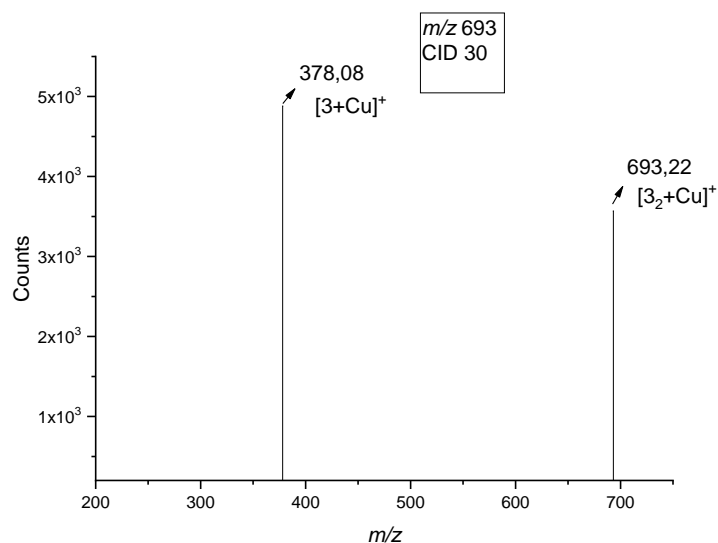
Snimljen je cjelokupni spektar otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u pozitivnom načinu snimanja. Označene su najizraženije vrijednosti u spektru. Signal kod $316,16 \text{ m/z}$ je asigniran kao protonirana molekula spoja **3**, a signal kod $693,23 \text{ m/z}$ je asigniran kao kompleks spoja **3** s bakrovim(II) ionom.



Slika 41. Cjelokupni spektar otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 50 do 1100 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

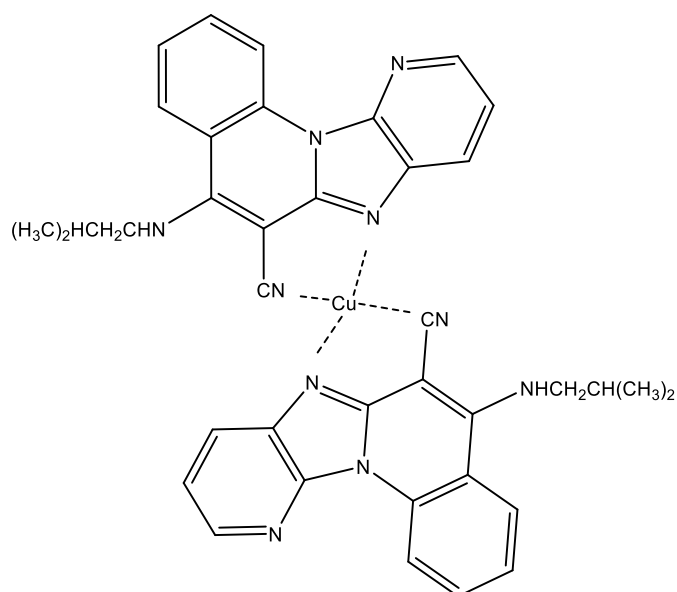


Slika 42. Uvećani dobiveni spektar i teorijski spektar izotopne raspodjele signala kod m/z 693,23 asigniranog kao kompleks spoja **3** s bakrovim(II) ionom u otopini bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 690 do 700 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



Slika 43. MS/MS spektar signala kod m/z 693,22 otopine bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 200 do 750 u pozitivnom načinu snimanja pri kolizijskom energijom od 30 V

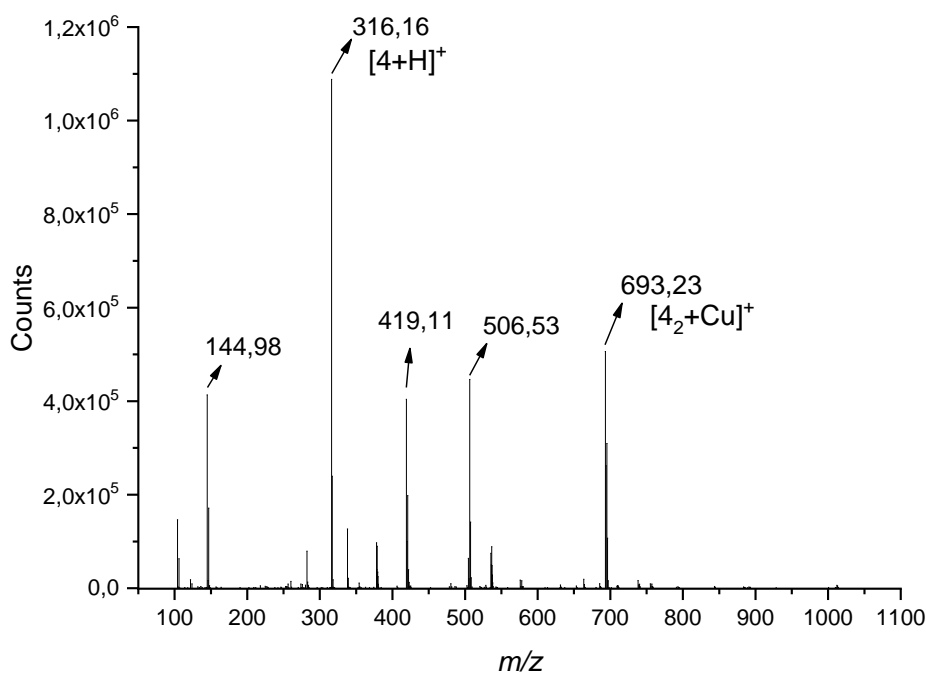
Signal kod 693,22 m/z asigniran kao kompleks spoja **3** s bakrovim(II) ionom jer se podudara sa teorijskom izotopnom raspodjelom. Također je utvrđeno da se radi o kompleksu sastavljenom od dviju molekula spoja **3** i bakrovog(II) iona iz slike 42. Fragmentacijom signala kod 693,22 m/z (CID 30 V) pojavio se signal kod 378,08 m/z koji odgovara kompleksu molekule spoja **3** s bakrovim(II) ionom. Predložena je struktura kompleksa na slici 44.



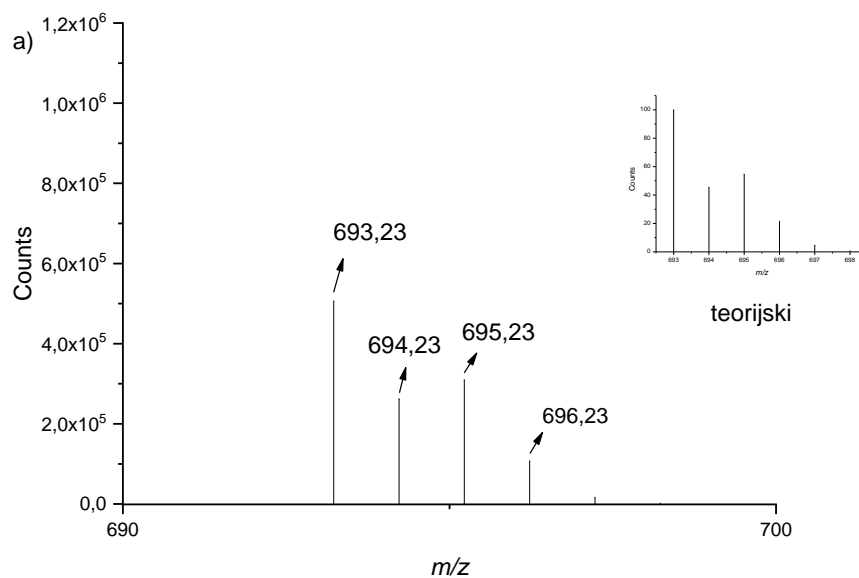
Slika 44. Predložena struktura kompleksa spoja **3** s bakrovim(II) ionom

4.2.4. Analiza otopine bakrova(II)acetata monohidrata i spoja 4

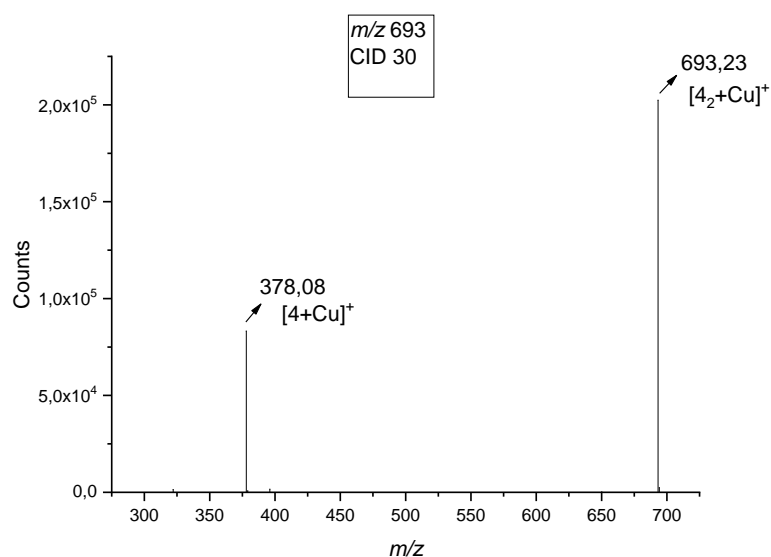
Snimljen je cjelokupni spektar otopine bakrova(II)acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 4 koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i u pozitivnom načinu snimanja. Označene su najizraženije vrijednosti u spektru. Signal kod $316,16 \text{ m/z}$ je asigniran kao protonirana molekula spoja 4, a signal kod $693,23 \text{ m/z}$ je asigniran kao kompleks spoja 4 s bakrovim(II) ionom.



Slika 45. Cjelokupni spektar otopine bakrova(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 4 koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 50 do 1100 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

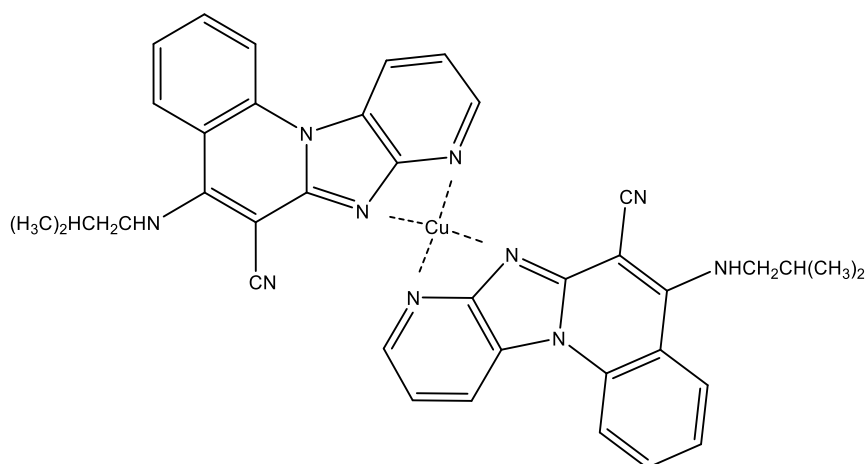


Slika 46. Uvećani dobiveni spektar i teorijski spektar izotopne raspodjele signala kod m/z 693,23 asigniranog kao kompleks spoja **4** s bakrovim(II) ionom u otopini bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **4** koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 690 do 700 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



Slika 47. MS/MS spektar signala kod m/z 693,22 asigniranog kao kompleks spoja **4** s bakrovim(II) ionom u otopini bakrovog(II) acetata monohidrata koncentracije $1,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **4** koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 250 do 750 u pozitivnom načinu snimanja pri kolizijskom energijom od 30 V

Dobiveni spektar izotopne raspodjele signala kod 693,22 m/z odgovara kompleksu spoja **4** s bakrovim(II) ionom jer se podudara sa teorijskom izotopnom raspodjelom. Također je utvrđeno da se radi o kompleksu sastavljenom od dviju molekula spoja **4** i bakrovog(II) iona iz slike 46. Fragmentacijom signala kod 693,22 m/z pojavio se signal kod 378,08 m/z koji odgovara kompleksu molekule spoja **4** s bakrovim(II) ionom. Predložena je struktura kompleksa na slici 48.



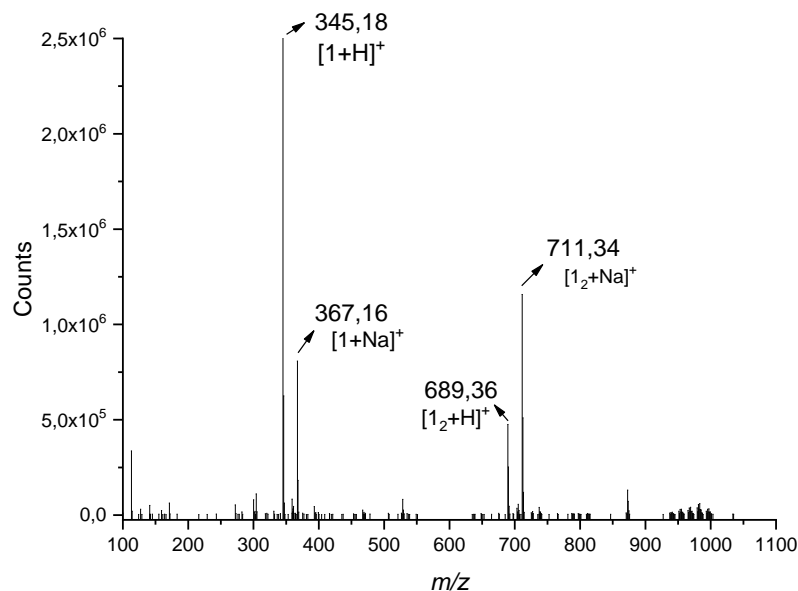
Slika 48. Predložena struktura kompleksa spoja **4** s bakrovim(II) ionom

4.3. Analiza otopina cinkova acetata dihidrata i spojeva 1-4 pomoću MS

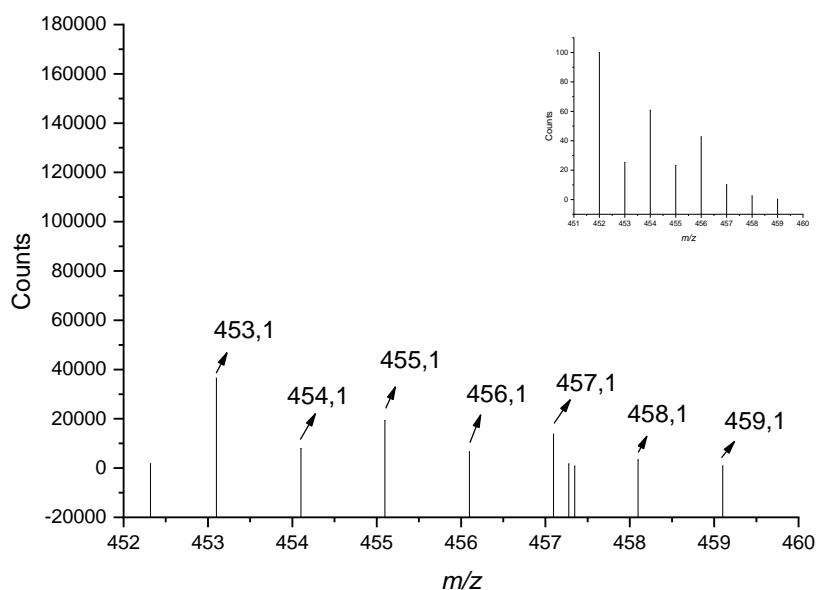
Snimljeni su cjelokupni spektri otopina cinkova acetata dihidrata i spojeva 1-4 u pozitivnom ionizacijskom načinu snimanja (ESI⁺). Signali su asignirani i strukture su pretpostavljene uspoređivanjem eksperimentalne i teoretske izotopne raspodjele.

4.3.1. Analiza otopine cinkova acetata dihidrata i spoja 1

Snimljen je cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ i spoja 1 koncentracije $1,4 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ u pozitivnom načinu snimanja. Signal kod 345,18 *m/z* je asigniran kao protonirana molekula spoja 1, a signal kod 689,36 *m/z* je asigniran kao protonirani dimer spoja 1. Signal kod 367,16 *m/z* je asigniran kao adukt molekule spoja 1 s natrijevim ionom, a signal kod 711,34 *m/z* je asigniran kao adukt dviju molekula spoja 1 s natrijevim ionom. U spektru se vidi niz signala manjeg intenziteta i neki od njih su fragmentirani pri kolizijskoj energiji od 10, 20 i 30 V i nije bilo moguće točno odrediti kojoj speciji odgovaraju. Točno bi se moglo odrediti daljnjim fragmentiranjem signala odnosno pomoću MS/MSⁿ.

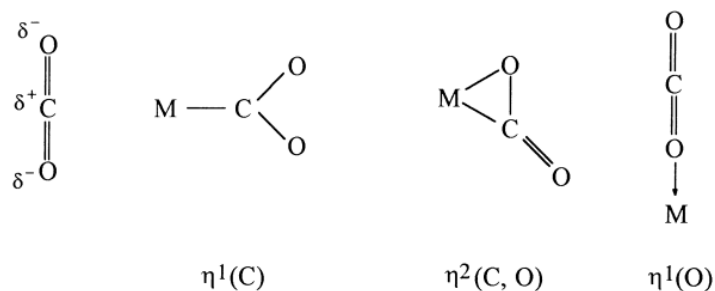


Slika 49. Cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ i spoja 1 koncentracije $1,4 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³ u području *m/z* 100 do 1100 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi metanolu



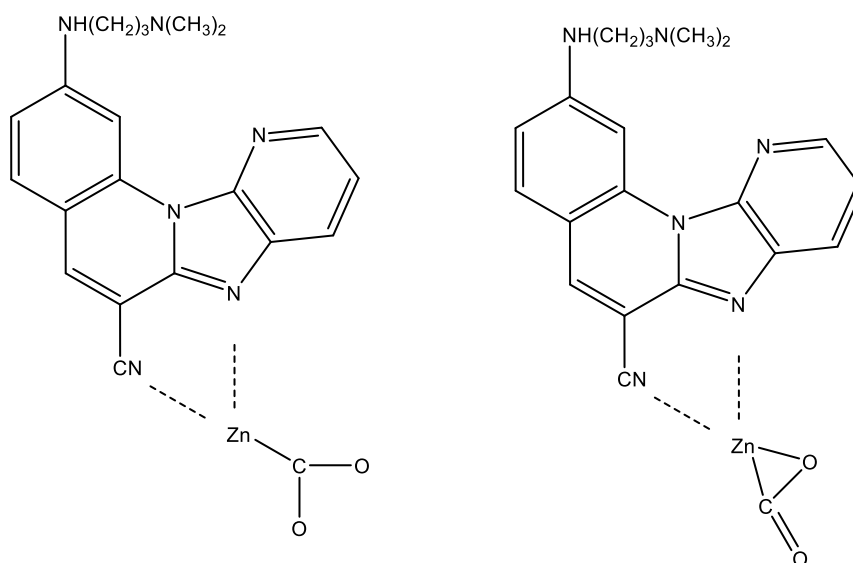
Slika 50. Uvećani dio spektra i teorijski spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **1** koncentracije $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 452 do 460 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj metanolu

Izotopna raspodjela signala kod $453,1 m/z$ na slici 50 je asignirana kao kompleks koji se sastoji od jedne molekule spoja **1**, cinkovog(II) iona i molekule ugljikovog(IV) oksida jer se poklapa sa teorijskom izotopnom raspodjelom. Maseni spektar cinkovog acetata dihidrata daje uvid u njegova strukturna i kemijska svojstva i otkriva stvaranje različitih ionskih vrsta, koje su ključne za razumijevanje njegovog ponašanja u različitim uvjetima. U ionskom izvoru dolazi do prelaska otopine cinkovog acetata dihidrata u plinsku fazu i nastaju složeniji ioni, odnosno klasteri. Jedna od specija koja je uočena u spektru otopine cinkova acetata dihidrata je $\text{Zn}_2(\text{OAc})_2^+$. Raspadom $\text{Zn}_2(\text{OAc})_2^+$ nastaju ioni kćeri i jedan od njih je $\text{Zn}(\text{CO}_2)^+ m/z 108$.²⁷ Molekula CO_2 je linearna troatomska molekula. Različite elektronegativnosti kisika i ugljika dovode do negativne polarizacije na atomima kisika i djelomični pozitivni naboj na ugljikovom atomu. Molekula CO_2 pokazuje nekoliko različitih položaja koji bi mogli komunicirati s metalnim središtem na različite načine koji se nalaze na slici 51.



Slika 51. CO₂ i njegovi mogući načini koordinacije u središtu prijelaznog metala

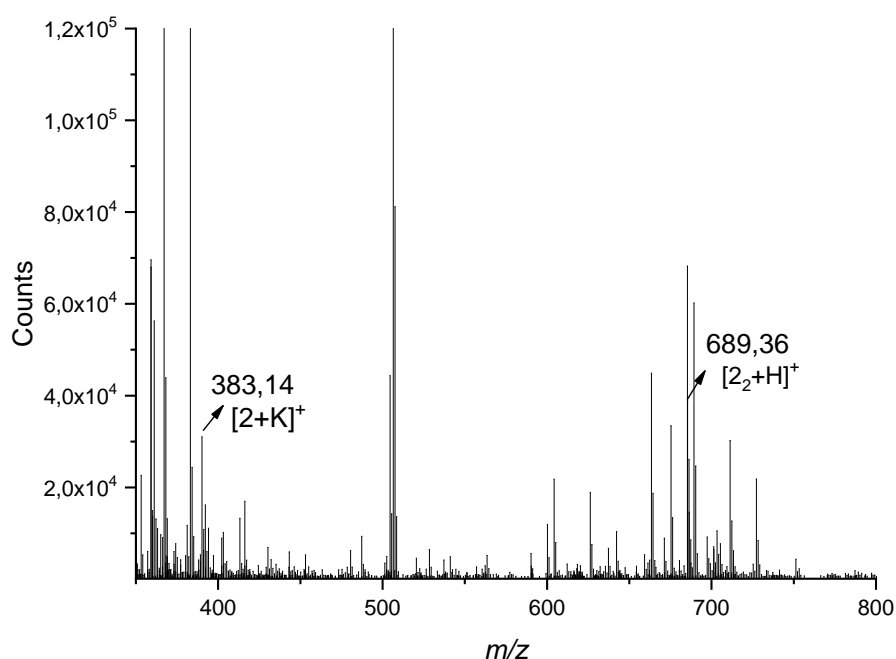
Kod $\eta^1(\text{C})$ načina povezivanja postoji jaka, dvoelektronska stabilizacija i interakcija prijenosa naboja između d_z^2 tipa orbitale (koja je dvostruko popunjena) i π^* orbitale CO₂ koja je prazna. Kod $\eta^2(\text{C}, \text{O})$ bočnog načina koordinacije $d\pi$ orbitala interagira s dvoelektronskom stabilizacijskom interakcijom π^* orbitale CO₂.²⁸ Na temelju toga su predložene strukture kompleksa spoja **1** s cinkovim(II) ionom na slici 52.



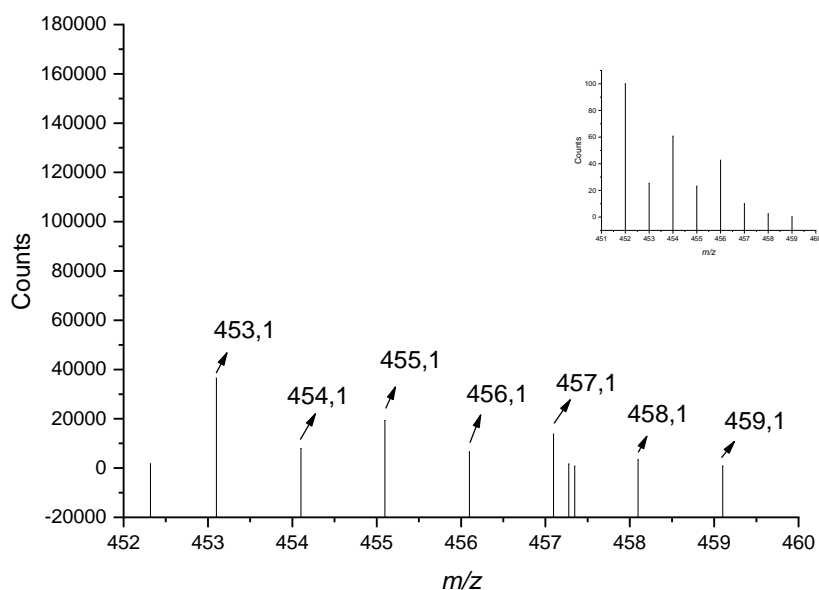
Slika 52. Predložene strukture kompleksa spoja **1** s cinkovim(II) ionom

4.3.2. Analiza otopine cinkova acetata dihidrata i spoja 2

Snimljen je cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 2 koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u pozitivnom načinu snimanja. Signal kod $383,14 \text{ m/z}$ je asigniran kao adukt molekule spoja 2 s natrijevim ionom, a signal kod $689,36 \text{ m/z}$ je asigniran kao protonirani dimer spoja 2. Signal kod $506,53 \text{ m/z}$ je fragmentiran pri kolizijskoj energiji od 10, 20 i 30 V i nije bilo moguće točno odrediti kojoj speciji odgovara. Točno bi se moglo odrediti daljnjim fragmentiranjem signala odnosno pomoću MS/MSⁿ

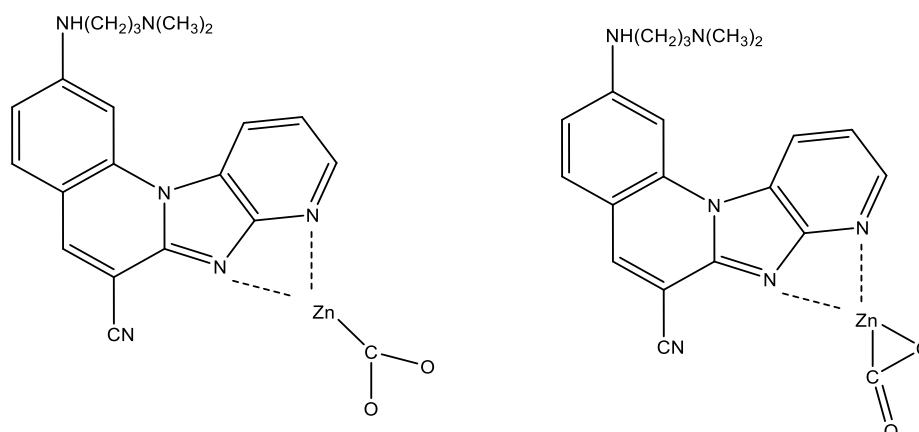


Slika 53. Cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 2 koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 300 do 800 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



Slika 54. Uvećani dio spektra i teorijski spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **2** koncentracije $2,67 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 452 do 460 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

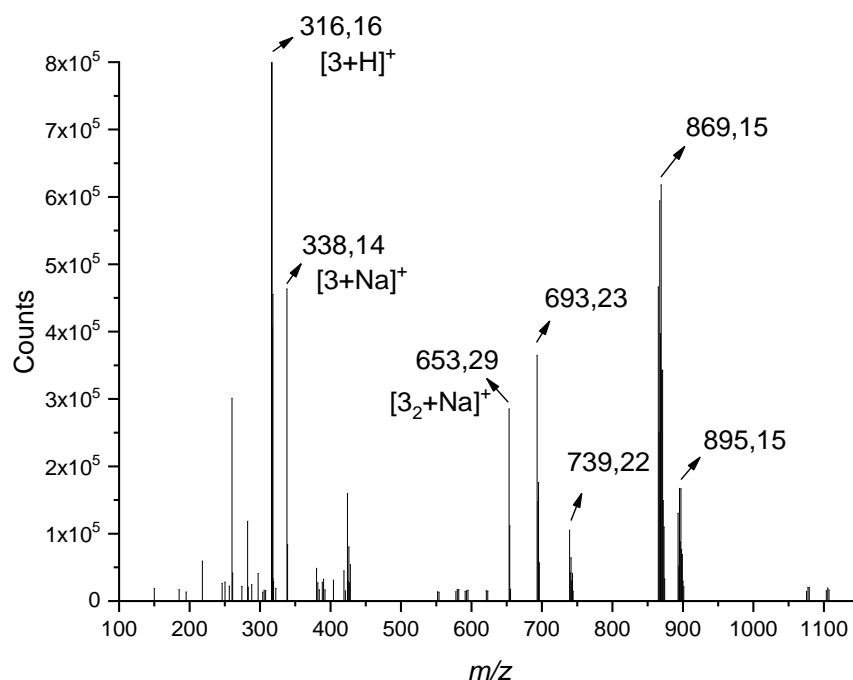
Izotopna raspodjela signala kod 453,1 m/z na slici 54 je asignirana kao kompleks koji se sastoji od jedne molekule spoja **2**, cinkovog(II) iona i molekule ugljikovog(IV)oksida jer se poklapa s teorijskom izotopnom raspodjelom. Takav kompleks je također uočen kod otopine cinkova acetata dihidrata i spoja **1**.



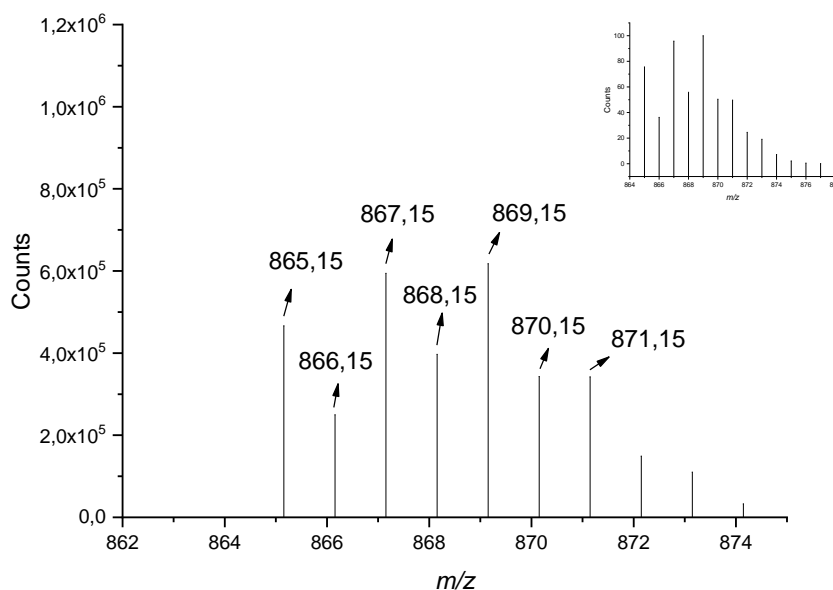
Slika 55. Predložene strukture kompleksa spoja **2** s cinkovim(II) ionom

4.3.3. Analiza otopine cinkova acetata dihidrata i spoja 3

Snimljen je cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u pozitivnom načinu snimanja. Signal kod $316,16 \text{ m/z}$ je asigniran kao protonirana molekula spoja **3**. Signal kod $338,14 \text{ m/z}$ je asigniran kao adukt molekule spoja **3** s natrijevim ionom, a signal kod $653,29 \text{ m/z}$ je asigniran kao adukt dviju molekula spoja **3** s natrijevim ionom. Signali pri m/z 739,22, 869,15 i 895,15 su fragmentirani pri kolizijskoj energiji od 10, 20 i 30 V i nije bilo moguće točno odrediti kojoj speciji odgovaraju. Točno bi se moglo odrediti daljnjim fragmentiranjem signala odnosno pomoću MS/MSⁿ.

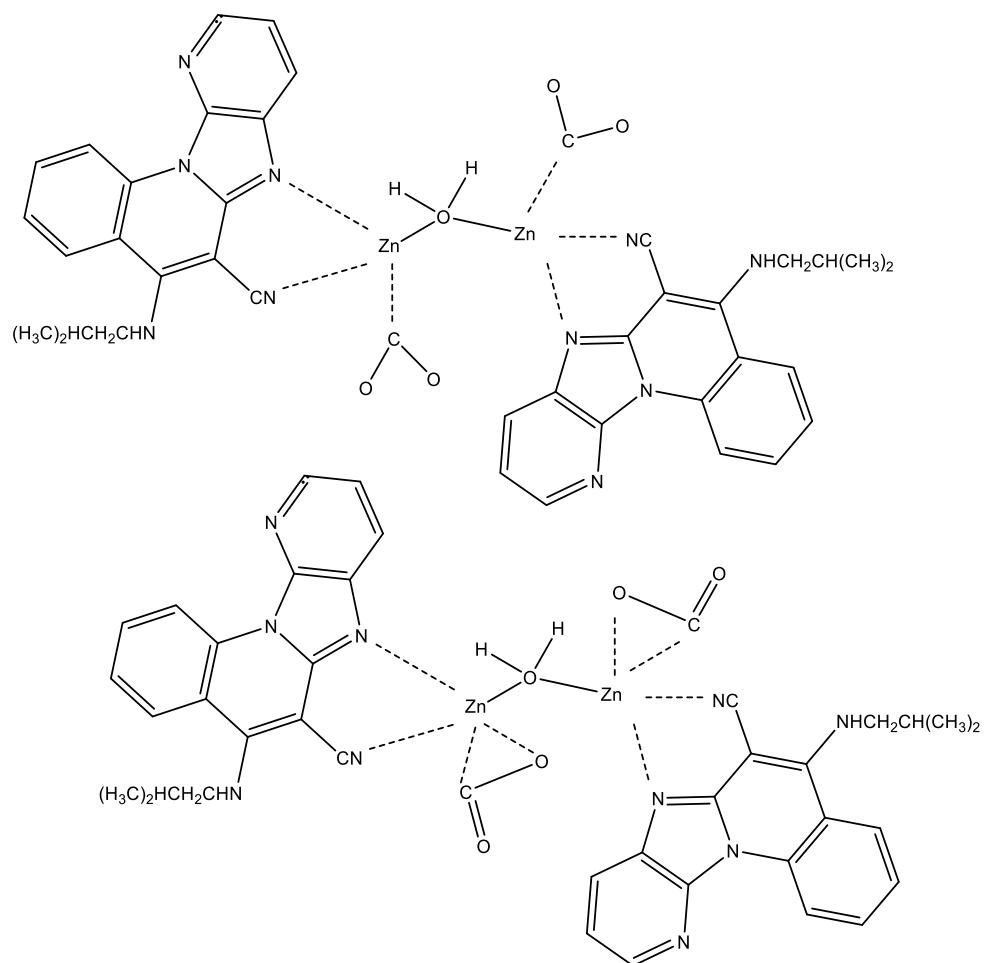


Slika 56. Cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 100 do 1150 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u omjeru 50:50



Slika 57. Uvećani dio spektra otopine i teorijski spektar cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **3** koncentracije $2,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 862 do 875 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

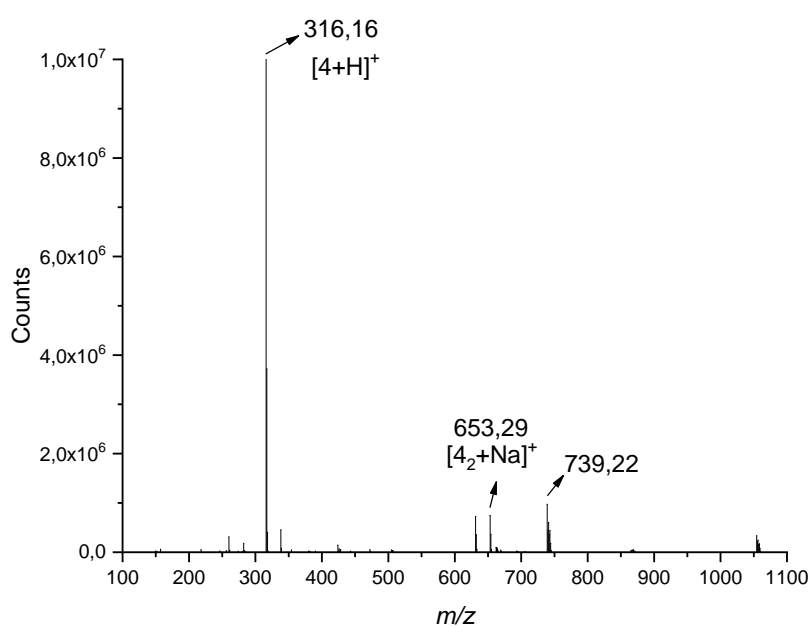
Izotopna raspodjela signala kod $865,15 \text{ } m/z$ na slici 57 je asignirana kao kompleks koji se sastoji od dvije molekule spoja **3**, dva iona cinka(II), dvije molekule ugljikovog(IV)oksida i molekule vode jer se poklapa sa teorijskom izotopnom raspodjelom. U ionskom izvoru dolazi do prelaska otopine cinkovog acetata dihidrata u plinsku fazu i nastaju složeniji ioni, odnosno klasteri. Jedna od specija koja je uočena u spektru otopine cinkova acetata dihidrata je $\text{Zn}_2(\text{OAc})_2^+$. Raspadom $\text{Zn}_2(\text{OAc})_2^+$ nastaju ioni kćeri i jedan od njih je $\text{Zn}(\text{CO}_2)^+ \text{ } m/z$ 108. Molekula CO_2 je linearna troatomska molekula. Različite elektronegativnosti kisika i ugljika dovode do negativne polarizacije na atomima kisika i djelomični pozitivni naboj na ugljikovom atomu. Molekula CO_2 pokazuje nekoliko različitih položaja koji bi mogli komunicirati s metalnim središtem na različite načine koji se nalaze na slici 51. Predložena je struktura kompleksa koji odgovara signalu kod $865,15 \text{ } m/z$ na slici 58.



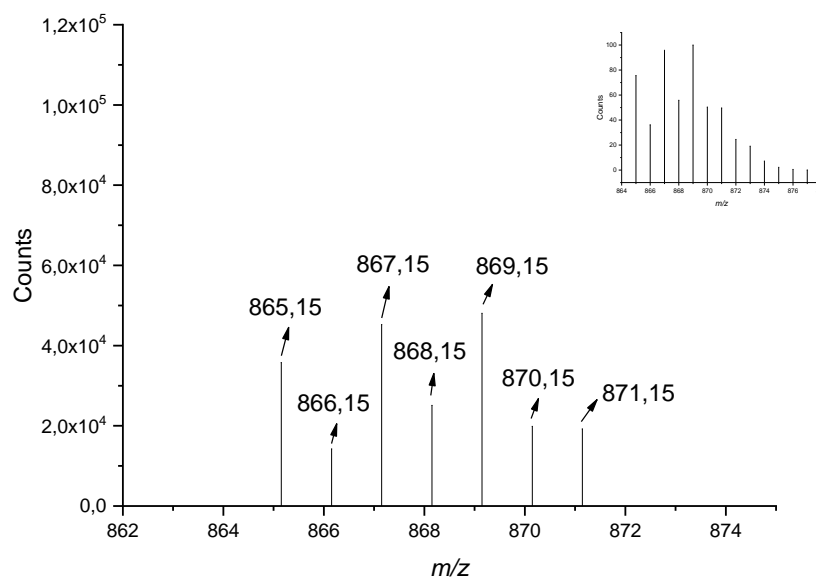
Slika 58. Predložene strukture kompleksa spoja **3** s cinkovim(II) ionom

4.3.4. Analiza otopine cinkova acetata dihidrata i spoja 4

Snimljen je cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 4 koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u pozitivnom načinu snimanja. Signal kod $316,16 \text{ m/z}$ je asigniran kao protonirana molekula spoja 4, a signal kod $653,29 \text{ m/z}$ je asigniran kao adukt dviju molekula spoja 4 s natrijevim ionom. Signal kod $739,22 \text{ m/z}$ je fragmentiran pri kolizijskoj energiji od 10, 20 i 30 V i nije bilo moguće točno odrediti kojoj speciji odgovara. Točno bi se moglo odrediti daljnjim fragmentiranjem signala odnosno pomoću MS/MSⁿ.

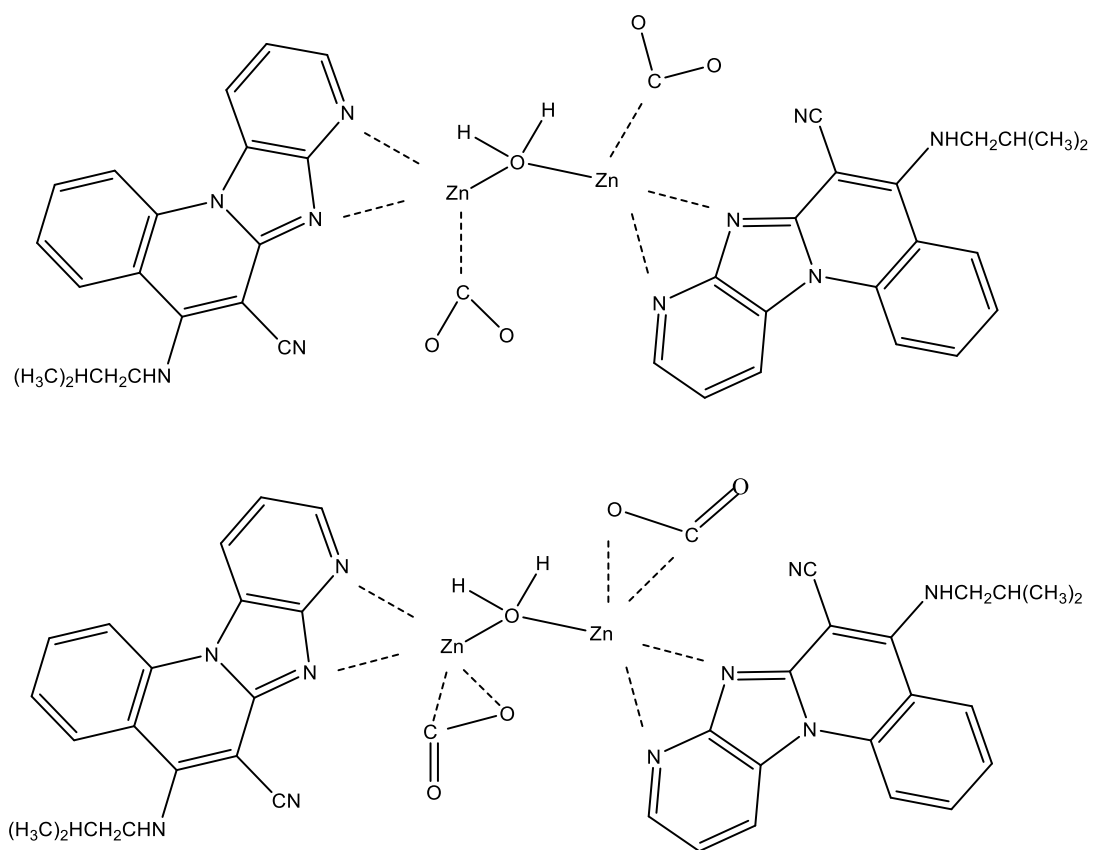


Slika 59. Cjelokupni spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 4 koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja 4 u omjeru 1:2 u području m/z 100 do 1100 u pozitivnom načinu snimanja u mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50



Slika 60. Uvećani dio spektra i teorijski spektar otopine cinkova acetata dihidrata koncentracije $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i spoja **4** koncentracije $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ u području m/z 862 do 875 u pozitivnom načinu snimanja i mobilnoj fazi 0,1% mravlja kiselina u vodi i acetonitrilu u volumnom omjeru 50:50

Izotopna raspodjela signala kod 865,15 m/z na slici 60 je asignirana kao kompleks koji se sastoji od dvije molekule spoja **4**, dva iona cinka(II), dvije molekule ugljikovog(IV)oksida i molekule vode jer se poklapa s teorijskom izotopnom raspodjelom. Takav kompleks je također uočen kod otopine cinkova acetata dihidrata i spoja **3**.

Slika 61. Predložene strukture kompleksa spoja **4** s cinkovim(II) ionom

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovome istraživanju analizirane su nekovalentne interakcije između novosintetiziranih spojeva (1–4) i metalnih iona, bakrovog i cinkovog(II) iona, pomoću spektrometrije masa. Pripremljene su otopine spojeva 1–4, otopina cinkova acetata dihidrata i otopina bakrovog(II)acetata monohidrata u metanolu. Zatim su pripremljene nove otopine koje se sastoje od metalnih iona (Cu^{2+} i Zn^{2+}) i spojeva 1–4 u različitim omjerima. Analiza uzoraka je provedena spektrometrijom masa visokog razlučivanja koristeći Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-flight (Q-TOF) uz direktno uvođenje uzoraka pomoću Agilent 1290 Infinity II UHPLC sustava uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor. Prvo su analizirane otopine spojeva 1, 2, 3 i 4 u metanolu. U spektrima otopina spojeva 1, 2, 3 i 4 uočeni su signali koji su asignirani kao protonirane molekule spojeva (1–4), protonirani dimeri molekula spojeva (1–4), adukti molekula spojeva (1–4) s natrijevim i kalijevim ionom i adukati dviju molekula spojeva (1–4) s natrijevim i kalijevim ionom. Pretpostavljene strukture su dodatno potvrđene pomoću MS/MS spektara. Analizom spektara koji se odnose na otopine molekula spojeva (1–4) i bakrovog(II) iona uočeno je nastajanje kompleksa koji se sastoji od dviju molekula spoja (1–4) i bakrovog(II) iona. Nastajanje takvog kompleksa također je potvrđeno iz MS/MS spektara. Predložene su strukture kompleksa spojeva (1–4) i bakrovog(II) iona na temelju afiniteta bioloških liganda koji najčešće ostvaruju veze s metalima preko atoma dušika. Analizom spektara koji se odnose na otopine molekula spojeva (1–4) i cinkovog(II) iona uočeni su signali koji su bili prisutni i u otopinama samih spojeva (1–4) u metanolu. Uočeno je nastajanje kompleksa koji se sastoji od molekule spoja 1, cinkovog(II) iona i ugljikovog(IV) oksida (također vrijedi i za spoj 2) i kompleksa koji se sastoji od dviju molekula spoja 3, dva iona cinka(II), molekule vode i dvije molekule ugljikovog(IV) oksida (također vrijedi i za spoj 4). Nastajanje takvih kompleksa dolazi od ponašanja kemikalija prilikom prelaska u plinsku fazu. Kada su kemikalije u obliku plina, ponašaju se na vrlo komplicirane načine i mogu formirati velike skupine iona koji se nazivaju klasteri. U ionskom izvoru dolazi do prelaska otopine cinkovog acetata dihidrata u plinsku fazu i nastaju složeniji ioni, odnosno klasteri. Jedna od specija koja je uočena u spektru otopine cinkova acetata dihidrata je $\text{Zn}_2(\text{OAc})_2^+$. Raspadom $\text{Zn}_2(\text{OAc})_2^+$ nastaju ioni kćeri i jedan od njih je $\text{Zn}(\text{CO}_2)^+$. Molekula CO_2 je linearna troatomska molekula. Različite elektronegativnosti kisika i ugljika dovode do negativne

polarizacije na atomima kisika i djelomični pozitivni naboj na ugljikovom atomu. Molekula CO₂ pokazuje nekoliko različitih položaja koji bi mogli komunicirati s metalnim središtem na različite načine te su na temelju toga predložene strukture kompleksa spojeva (1-4) s cinkovim(II) ionom. Masenom spektrometrijom nije moguće utvrditi koji je način vezanja molekule CO₂ i metalnog iona u pitanju te su predložene dvije mogućnosti. Rezultati ovog diplomskog rada mogli bi poslužiti za procjenu mogućih nekovalentnih interakcija spojeva (1-4) s metalnim ionima (cinkov i bakrov(II) ion) u budućoj primjeni predmetnih spojeva u studijama djelovanja u stanici ali i kao potencijalni novi spojevi za daljnja istraživanja i primjenu u medicini.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. B. Lončar, N. Perin, M. Mioč, I. Boček, L. Grgić, M. Kralj, S. Tomić, M. Radić Stojković, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **217** (2021) 113342–113360.
2. F. Chen, B. Gülbakan, S. Weidmann, S. R. Fagerer, A. J. Ibáñez, R. Zenobi, *Mass Spectrom. Rev.* **35** (2016) 48.
3. L. Berdié, I. Casals, I. Fernández, O. Jáuregui, R. M. Marimon, J. Perona, P. Teixidor, *Handbook of Instrumental techniques from CCI TUB*, Barcelona, Vol 5, str. 1–8.
4. N. Galić, *Spektrometrija masa*, skripta, PMF, Zagreb, 2004
5. S. Medhe, *Ionization Techniques in Mass Spectrometry: A Review*, *Mass Spectrom Purif Tech*, 2018, str. 126–132.
6. <https://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial> (datum pristupa 27.10.2024.)
7. SharadMedhe, Mass Spectrometry: Detectors Review. *Chemical and Biomolecular Engineering.*, 2018, str. 51-58.
8. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig31_225050758 (datum pristupa 27.10. 2024.)
9. Z. Huang, Ya-Nan Yao, Wen Li, Bin Hu, *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, 2019., str. 105–112.
10. <https://www.chem.ualberta.ca/~massspec/ESIisol.htm> (datum pristupa 27.10.2024.)
11. Glish GL, Burinsky DJ., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* **19** (2008) 161–72.
12. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA, *Journal of Mass Spectrometry* **36** (2001) 849–865.
13. Gross JH. *Mass Spectrometry A Textbook*, Springer; 2017, str. 266–268.
14. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 4.

15. C. Verma, A. Singh, P. Singh, K. Y. Rhee, A. Alfantazi, *Coordination Chemistry Reviews* **515** (2024) 215966–215991
16. Tung T. Le, Meiling Wu, Joyce H. Lee, James Inman, James Berger, Michelle D.Wang, *Nat Chem Biol* **19** (2023) 641–650.
17. R. P. Bender, M. J. Jablonsky, M. Shadid, I. Romaine, N. Dunlap, C. Anklin, D. E. Graves, N. Osheroff, *Biochemistry* **47** (2008) 4501–4509
18. Nadege, Blanchard, Lysiane, Richert, P., Coassolo, T., Lave, *Current Drug Metabolism* **5** (2024) 147–156.
19. 19.V.Vučković, *Teorijske osnove i pristupi u QSAR modeliranju*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2016. str. 23.
20. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija II.DIO*, Školska knjiga, Zagreb 1995, str. 1067–1100.
21. R. Bruce King, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol 2, John Wiley and Sons, New Jersey, 2005, str. 829–839
22. A. Erxleben, *Coordination Chemistry Reviews*, **360** (2018) 92–121.
23. V.Smrkulj, *Korozijska otpornost mjedi u atmosferskim uvjetima*, Diplomski rad, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 13–19
24. B. Rođak, *Određivanje cinka u uzorcima dodataka prehrani primjenom plamene apsorpcijske spektrofotometrije*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 2
25. R. Bruce King, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol 8, John Wiley and Sons, New Jersey, 2005, str. 4434–4450
26. <https://www.researchsquare.com/article/rs-4173894/v1> (datum pristupa 16.9.2024.)
27. G . C. DiDonato, K. L. Bursch, *Inorg. Chem.* 1986, 25, str. 1551–1556
28. X. Yin, J. R. Moss, *Coordination Chemistry Reviews*, **181** (1999) 27–59.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ingrid Ana Martinac

Datum rođenja: 12. ožujak 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola Vladimira Nazora, Zagreb

2012.–2016. XV. Gimnazija, Zagreb

2016.–2022. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)