

# NMR spektroskopija stereoizomera

---

**Sakoman, Franjo**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:217:877350>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-28**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Franjo Sakoman

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **NMR spektroskopija stereoizomera**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan

Zagreb, 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>II</b>
<b>2.1. NMR spektroskopija.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Stereoizomeri.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Simetrija i topičnost .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Primjena NMR spektroskopije u razlikovanju diastereomera.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Primjena NMR spektroskopije u razlikovanju enantiomera.....</b>	<b>11</b>
<i>2.5.1. Metode temeljene na kiralnom derivatizirajućem reagensu .....</i>	<i>11</i>
<i>2.5.2. Metode temeljene na dvostrukoj derivatizaciji .....</i>	<i>14</i>
<i>2.5.3. Metode temeljene na jednostrukoj derivatizaciji .....</i>	<i>18</i>
<i>2.5.4. Nove metode derivatizacije .....</i>	<i>19</i>
<i>2.5.5. Metode temeljene na kiralnom solvatirajućem reagensu.....</i>	<i>21</i>
<i>2.5.6. Kiralni mediji za orijentiranje .....</i>	<i>22</i>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>24</b>



## § Sažetak

Stereoizomeri su spojevi koji imaju isti redoslijed vezanih atoma, ali različiti raspored atoma u prostoru zbog čega se razlikuju po fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima. Dije se na diastereomere, čiji se parametri nuklearne magnetske rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) međusobno razlikuju, te na enantiomere koji u akiralnom otapalu imaju identične NMR spektre. Enantiomeri se mogu uspoređivati metodama derivatizacije, kojima dolazi do transformacije kiralnog supstrata u dvije vrste kojima se mogu razlikovati NMR spektri, zatim proučavanjem supstrata u kiralnom otapalu te metodom kojom se promatra orijentacija molekule u tzv. kiralnom mediju za orijentiranje (engl. *chiral orienting medium*).

Ovaj rad daje kratak opis NMR spektroskopije i svojstava stereoizomera te opisuje najvažnije metode za razlikovanje stereoizomera.



## § 1. UVOD

Stereoizomeri su spojevi identičnog kemijskog sastava i konstitucije, ali različitog rasporeda atoma u prostoru te se dijele na enantiomere i diastereomere. Stereokemija je grana kemije koja proučava trodimenzijsku strukturu molekula koja uvelike utječe na kemijska, fizikalna, biološka i farmaceutska svojstva određenog spoja, te je stoga vrlo važno identificirati odgovarajući stereoizomer. Bitna analitička metoda koja, uz određivanje struktura i identifikaciju molekula, ima primjenu i u razlikovanju stereoizomera je spektroskopija NMR. Različiti pristupi u identifikaciji stereoizomera uz pomoć NMR spektroskopije vrlo su korisni iz nekoliko razloga: dostupnost NMR spektrometara u laboratorijima, mala količina uzorka potrebna za analizu (uzorci se mogu regenerirati nakon snimanja spektara) i primjenjivost na tekuće i krute uzorke.<sup>1,2</sup>

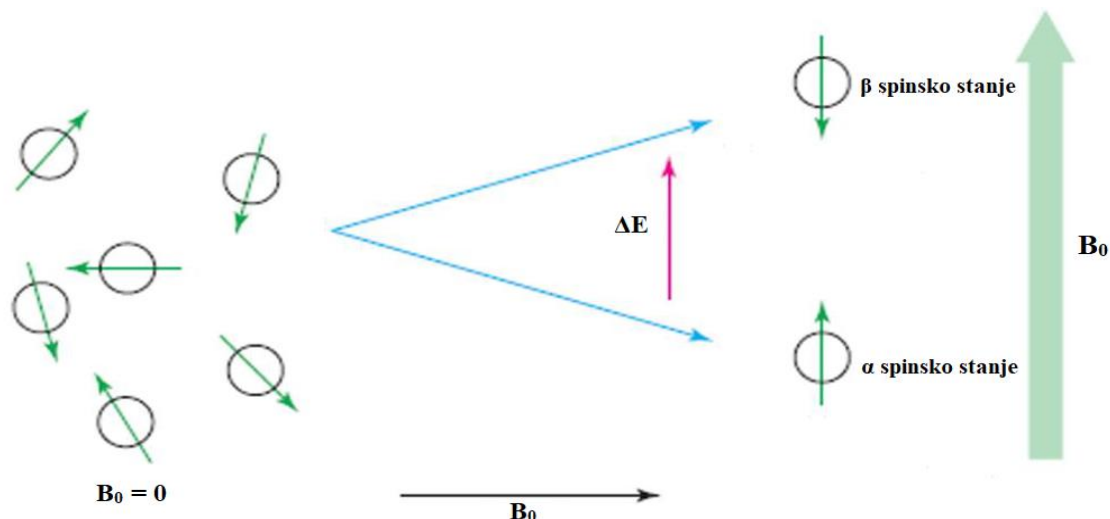
Prilikom razlikovanja stereoizomera NMR spektroskopijom proučavaju se razlike u dobivenim NMR parametrima kako bi se uspješno odredila konfiguracija odgovarajućeg spoja. No, budući da par enantiomera daje jednake NMR spektre, potrebne su posebne metode pripreme uzoraka kako bi se uočile razlike. Općenito se kod enantiomera koriste metode derivatizacije, kod kojih se kiralni supstrat prevede u dva diastereomerna derivata kojima se zatim proučavaju NMR spektri. Također postoje i jednostavnije metode kod kojih se pripravlja samo jedan diastereomerni derivat, a korisne su ukoliko su dostupne male količine uzorka. Kod razlikovanja diastereomera nije potrebna dodatna modifikacija molekula budući da se njihovi NMR parametri (npr. konstante sprega) razlikuju.<sup>1,2</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. NMR spektroskopija

Spektroskopija NMR važna je analitička metoda za određivanje strukture bioloških, anorganskih i organskih molekula koja se može koristiti za nedestruktivnu analizu malih količina uzoraka. Dobiveni NMR spektar daje mnogo informacija o strukturi te se strukture manjih molekula mogu odrediti samo na temelju njihovih NMR spektara, dok se za veće molekule NMR koristi u kombinaciji s drugim spektroskopskim tehnikama i kemijskim analizama. NMR spektroskopija se primjenjuje pri proučavanju različitih jezgara kao što su  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{31}\text{P}$ , a za organske molekule najkorisnije su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija.<sup>3</sup>

Samo jezgre s neparnim atomskim ili neparnim masenim brojem imaju nuklearni spin te se mogu proučavati NMR spektroskopijom. Tako proton s neparnim atomskim brojem 1 ima spin kojeg vizualiziramo kao rotirajuću sferu pozitivnog naboja. Rotirajući proton stvara magnetsko polje koje se naziva magnetski moment. Kada se proton nađe u vanjskom magnetskom polju ( $B_0$ ), magnetski moment može zauzeti dvije orijentacije:  $\alpha$ -spinsko stanje, koje je niže energije i paralelno orijentirano s vanjskim magnetskim poljem, te  $\beta$ -spinsko stanje, koje je više energije i orijentirano obrnuto vanjskom magnetskom polju. Bez prisustva vanjskog magnetskog polja protonski magnetski momenti su nasumično orijentirani, dok će ih u prisustvu vanjskog magnetskog polja više biti u  $\alpha$ -stanju jer je ono niže energije (slika 1).<sup>3</sup>



Slika 1. Prikaz spinskih stanja protona bez i uz prisustvo vanjskog magnetskog polja  $B_0$  (preuzeto i prilagođeno prema L. G. Wade, Jr., *Organic chemistry*, 7th Edition, Pearson Prentice Hall, Boston, 2010.)

Energijska razlika stanja  $\alpha$  i  $\beta$  proporcionalna je jakosti vanjskog magnetskog polja prema izrazu (1):

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (1)$$

Žiromagnetski omjer ( $\gamma$ ) je konstanta koja ovisi o magnetskom momentu ispitivane jezgre. Kada je jezgra ozračena radio-frekvencijskim fotonima čija je energija jednaka razlici energije između spinskih stanja, postiže se rezonancija te proton iz  $\alpha$ -stanja može apsorbirati energiju fotona i prijeći u  $\beta$ -stanje. Vraćanjem u stanje niže energije dolazi do oslobađanja energije koja se detektira kao puls radio-frekvencijskog elektromagnetskog zračenja. Iako je energijska razlika spinskih stanja protona mala, NMR spektrometar koji radi pri jakom magnetskom polju može detektirati apsorpciju energije.<sup>3,4</sup>

Protoni u molekulama su okruženi elektronima koji ih djelomično zasjenjuju od vanjskog magnetskog polja zbog stvaranja lokalnih magnetskih polja te je za postizanje rezonancije potrebno primijeniti jače magnetsko polje. Kada bi svi protoni bili zasjenjeni podjednako onda bi bili u rezonanciji pri istoj kombinaciji magnetskog polja i frekvencije. Međutim, protoni u različitom kemijskom okruženju su različito zasjenjeni što dovodi do rezonancije pri različitim frekvencijama. Mjerenje jakosti polja potrebnih za rezonanciju različitih protona u molekuli daje nam informacije o broju različitih apsorpcija, tj. o broju signala koji označavaju koliko različitih vrsta protona je u molekuli, te o količini zasjenjenja

koja je povezana s elektronskom strukturom molekule u blizini pojedine vrste protona. Intenzitet signala prikazuje koliko je protona iste vrste prisutno, a cijepanje signala daje informaciju o susjednim protonima. Varijacije položaja apsorpcija u NMR spektrima koje proizlaze od zasjenjenja nazivaju se kemijskim pomacima. Kemijski pomak (položaj određene jezgre u spektru) definiran je kao razlika između rezonancijske frekvencije protona u odnosu na neki referentni signal. Ta razlika jakosti magnetskog polja između rezonancija promatranih i referentnih protona može se precizno mjeriti. Kao referentni signal najčešće se koristi tetrametilsilan,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$  (TMS). Silicij je manje elektronegativan od ugljika, pa su metilne skupine TMS-a relativno bogate elektronima odnosno protoni su zasjenjeni. Svi protoni TMS-a apsorbiraju podjednako dajući jedan signal te apsorbiraju pri većoj jakosti magnetskog polja od drugih molekula pa se ostali signali u spektru nalaze lijevo od signala TMS-a, tj. imaju veći kemijski pomak. Kemijski pomak se mjeri u dijelovima na milijun (ppm) prema izrazu (2):

$$\delta_i / \text{ppm} = \frac{\nu_i - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} \times 10^6 \quad (2)$$

gdje je razlika frekvencija proučavanog ( $\nu_i$ ) i referentnog signala ( $\nu_{\text{ref}}$ ) podijeljena s frekvencijom vanjskog magnetskog polja ( $\nu_0$ ). Kemijski pomak u bezdimenzijskim jedinicama ppm jednak je za pojedini proton neovisno o jakosti magnetskog polja i frekvenciji spektrometra. Najčešća korištena skala za kemijske pomake je  $\delta$ -skala kod koje je signal tetrametilsilana definiran pri 0,00 ppm te se skala povećava prema lijevom dijelu spektra jer većina protona apsorbira pri nižem magnetskom polju od TMS-a. Općenito, ako je u susjedstvu promatranog protona vezan elektronegativni supstituent, dolazi do odsjenjenja protona i kemijski pomak je veći, a ako je prisutno više elektron-odvlačećih skupina učinak je gotovo aditivan. Međutim, učinak elektron-odvlačeće skupine opada s porastom udaljenosti od protona te je općenito zanemariv ako su takve skupine udaljene četiri ili više veza. Protoni koji su u identičnom kemijskom okruženju s jednakim zasjenjenjem imaju isti kemijski pomak te se nazivaju kemijski ekvivalentnim protonima. Integriranjem se dobije površina ispod pojedinog signala koja je proporcionalna broju atoma vodika u molekuli.<sup>3-5</sup>

Apsorpcijske frekvencije protona pod utjecajem su vanjskog magnetskog polja te induciranih polja susjednih protona. Kada su različiti protoni dovoljno blizu, dolazi do međusobnog utjecaja njihovih magnetskih polja te do cijepanja signala na multiplet što se zove sprega spin-spin. Sprega spin-spin je interakcija spinova preko kemijske veze te je recipročne prirode, odnosno ako je jedan proton u sprezi s drugim tada je i drugi također u

sprezi s prvim. Međutim, ako su protoni kemijski ekvivalentni, odnosno apsorbiraju pri istom kemijskom pomaku, onda se ne sprežu jer su u rezonanciji pri istoj kombinaciji frekvencije i jakosti magnetskog polja. S druge strane, kemijski neekvivalentni protoni koji su udaljeni kroz dvije do tri kemijske veze (u aromatskim sustavima i četiri veze) se sprežu.<sup>3,4</sup>

NMR signal promatrane jezgre se cijepa na multiplet s brojem signala  $2nI + 1$  pri čemu je  $n$  broj susjednih signala, a  $I$  spinski kvantni broj jezgre u sprezi. Pomoću Pascalovog trokuta dan je relativni odnos intenziteta signala u multipletu (slika 2).<sup>3</sup>

Broj ekvivalentnih protona koji uzrokuju cijepanje	Broj signala (multiplicitet)	Omjer intenziteta signala (Pascalov trokut)
0	1 (singlet)	1
1	2 (dublet)	1 1
2	3 (triplet)	1 2 1
3	4 (kvartet)	1 3 3 1
4	5 (kvintet)	1 4 6 4 1
5	6 (sekstet)	1 5 10 10 5 1
6	7 (septet)	1 6 15 20 15 6 1

Slika 2. Relativni odnos intenziteta signala u multipletu kod  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije

Sprega spin-spin se opisuje pomoću konstante sprege  $J$ , koja označava udaljenost između vrhova multipleta, a izražava se u hertzima. Konstanta sprege ovisi o udaljenosti vezanih protona, kutu između dviju C-H veza te o elektronegativnim supstituentima, ali ne ovisi o jakosti magnetskog polja spektrometra jer magnetski učinak jednog protona na drugi ovisi o vezama koje te protone spajaju. Sprega spin-spin između istovrsnih jezgri, npr. protona, naziva se homonuklearna sprega, dok je heteronuklearna sprega prisutna između različitih jezgara. U složenim spektrima s različitim vrstama protona, skupine susjednih protona se ponekad mogu prepoznati mjerenjem njihovih konstanti sprege. Kod kompleksnih cijepanja, signali se sprežu susjednim protonima različitih vrsta s različitim konstantama sprege.<sup>3-5</sup>

Spektroskopija  $^{13}\text{C}$  NMR je manje osjetljiva od spektroskopije  $^1\text{H}$  NMR zbog niske vrijednosti žiromagnetskog omjera  $\gamma$  izotopa  $^{13}\text{C}$  te zbog njegove male prirodne zastupljenosti koja iznosi oko 1%. Koriste se različite tehnike za pojednostavljenje i poboljšanje spektara kao npr.  $^{13}\text{C}$  NMR izvan rezonancije (engl. *off-resonance*) i tehnika DEPT (engl. *Distortionless enhancement by polarization transfer*). Kod  $^{13}\text{C}$  NMR izvan rezonancije u spektru se opažaju sprege kroz jednu vezu, odnosno između jezgri  $^{13}\text{C}$  i direktno vezanih protona. Takav spektar je lako prepoznatljiv jer se TMS pojavljuje kao kvartet pri 0 ppm. Iz

cijepanja signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru izvan rezonancije može se odrediti koliko je protona vezano na pojedini ugljikov atom. Tehnika DEPT daje bolju osjetljivost i omogućuje određivanje multipliciteta pojedinih ugljikovih atoma čiji su signali singleti. Razlikuju se podspektri DEPT-90, kod kojeg se pojavljuje samo signal CH skupine, te DEPT-135 kod kojeg su signali CH i  $\text{CH}_3$  skupina usmjereni prema gore dok je signal  $\text{CH}_2$  skupine usmjeren prema dolje. Općenito, broj različitih signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru označava koliko različitih ugljikovih atoma je prisutno u molekuli, a kemijski pomak tih signala ukazuje kojim funkcijskim skupinama pripadaju ti ugljikovi atomi.<sup>3,5</sup>

## 2.2. Stereoizomeri

Stereokemija je grana kemije koja se bavi proučavanjem trodimenzijske strukture molekula. Izomeri su spojevi jednake molekulske formule koji mogu imati različita svojstva ovisno o rasporedu i povezanosti atoma, a dijele se na stereoizomere i konstitucijske izomere. Konstitucijski ili strukturni izomeri su oni kod kojih su atomi međusobno povezani na različit način, odnosno drugačiji im je redosljed veza. S druge strane, stereoizomeri imaju isti redosljed vezanih atoma, ali različiti raspored atoma u prostoru zbog čega se razlikuju po fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima. Dva stereoizomera mogu prijeći jedan u drugi samo uslijed pucanja veze, odnosno imaju različite konfiguracije. Također, molekula može imati različite konformacije koje prelaze jedna u drugu rotacijom oko jednostruke veze. Kiralne molekule su pak one koje najčešće posjeduju ugljikov atom na koji su vezana četiri različita atoma ili skupine (kiralni ugljikov atom, označava se s \*) te one nemaju ravninu simetrije i ne mogu se preklopiti sa svojom zrcalnom slikom. Općenito, ako molekula sadržava  $n$  kiralnih ugljikovih atoma, ona može imati najviše  $2^n$  stereoizomera. Takav asimetrični ugljikov atom je kiralno središte, a kiralno središte je podskupina stereocentra koji se definira kao bilo koji atom na kojem međusobna izmjena dviju skupina daje stereoizomer. Stereoizomeri se dijele na enantiomere i diastereomere.<sup>3,4</sup>

Enantiomeri su dvije molekule koje se odnose kao zrcalne slike koje se ne mogu preklopiti. Supstituenti na kiralnim ugljikovim atomima imaju dva moguća prostorna rasporeda koji se nazivaju konfiguracijama, a konfiguracija se dijeli na apsolutnu i relativnu konfiguraciju. Pojam apsolutna konfiguracija označava detaljnu stereokemijsku sliku molekule koja uključuje stvarni raspored atoma u prostoru i njegov stereokemijski opis prema Cahn-Ingold-Prelogovim pravilima (CIP pravilima). Prema CIP pravilima, supstituentima

vezanima na kiralno središte dodjeljuju se prioriteta od 1 do 4 prema atomskim brojevima atoma koji su vezani za asimetrični ugljikov atom (supstituent s brojem 1 ima najviši prioritet, a supstituent s brojem 4 najmanji). Molekula se promatra „kroz vezu“ od kiralnog središta prema skupini najmanjeg prioriteta, te se na temelju smjera opadanja prioriteta ostalih supstituenata označava apsolutna konfiguracija. Ako prioriteta opadaju u smjeru kazaljke na satu, konfiguracija se označava slovom *R* (lat. *rectus*). Ako prioriteta opadaju suprotno od smjera kazaljke na satu, konfiguracija se označava slovom *S* (lat. *sinister*). S druge strane, relativna konfiguracija je eksperimentalno određen odnos između konfiguracija dviju molekula, s time da nije nužno poznavati njihovu apsolutnu konfiguraciju. Enantiomeri imaju gotovo identična fizikalna svojstva, a razlike im postaju uočljive u interakciji s drugim kiralnim molekulama. Razlikovanje enantiomera omogućava polarimetrija koja se temelji na svojstvu enantiomera da zakreću ravninu polarizirane svjetlosti za isti iznos, ali u suprotnim smjerovima. U polarimetru se mjeri interakcija molekule s polariziranim svjetlom, a rotacija polariziranog svjetla  $\alpha$  ovisi o koncentraciji uzorka, duljini ćelije te o optičkoj aktivnosti spoja. Zakretanje u desno (smjer kazaljke na satu) označava se s (+) ili *d*, a zakretanje u lijevo (obrnuto kazaljci na satu) se označava s (-) ili *l*. Ukoliko su prisutne jednake količine oba enantiomera, takva se otopina naziva racemična otopina i optički je neaktivna. Razdvajanje dvaju enantiomera se naziva resolucija, a provodi se pomoću kiralnog reagensa koji se veže za enantiomere racemične smjese pri čemu nastaje par diastereomera. Nakon razdvajanja diastereomera, kiralni reagens korišten za razdvajanje odcjepljuje se od čistih enantiomera.<sup>3,4</sup>

Dijastereomeri su svi oni stereoizomeri koji nisu zrcalne slike. Općenito imaju različita kemijska i fizikalna svojstva te se dijele na *cis-trans* (*Z-E*) izomere i na izomere koji sadrže dva ili više kiralnih središta. *Cis-trans* (*Z-E*) izomeri se razlikuju prema položaju sličnih skupina u odnosu na dvostruku vezu ili prsten. Ako se slične skupine nalaze s iste strane onda se radi o *cis*-izomeru, a ako su s različitih strana onda je riječ o *trans*-izomeru. Zbog različitih fizikalnih svojstava, mogu se razdvojiti kromatografijom, rekristalizacijom ili destilacijom.<sup>3,4</sup>

### 2.3. Simetrija i topičnost

NMR aktivne jezgre u molekulama koje posjeduju simetriju, odnosno one skupine koje su povezane preko centra inverzije, rotacijske osi ili ravninom simetrije, imati će isti kemijski pomak ukoliko molekule nisu kiralne. Općenito, dva atoma ili skupine koje imaju isti

kemijski pomak su izokroni. Skupine čije NMR aktivne jezgre imaju različite kemijske pomake nisu povezane operacijom simetrije, ali nije nužno da su dvije izokrone skupine povezane operacijom simetrije jer su ponekad izokrone slučajno. Topičnost (engl. *topicity*) nam omogućava predvidjeti koliko različitih kemijskih pomaka očekujemo za pojedinu molekulu.<sup>6</sup>

Atomi ili skupine povezane simetrijom mogu biti homotopni, enantiotopni ili dijastereotopni. Homotopna su dva ili više atoma ili skupina u molekuli ako se zamjenom (npr. izotopnom supstitucijom) jednog atoma ili skupine dobiva ista molekula kao kad bi se zamijenio drugi atom ili skupina, te su oni izokroni, odnosno kemijski pomaci su im jednaki. Homotopni atomi ili skupine nikako se ne mogu razlikovati te su kemijski ekvivalentni.<sup>4,6</sup>

Dva atoma ili skupine su enantiotopni ako zamjenom jednog od njih dobijemo molekulu koja je zrcalna slika molekule koju bismo dobili da smo zamijenili drugi atom ili skupinu. Enantiotopni atomi ili skupine u akiralnom otapalu imaju iste kemijske pomake, no u kiralnom otapalu su im kemijski pomaci različiti. Enantiotopni atom ili skupina su prokiralni, odnosno njihovom izotopnom zamjenom dobije se kiralna molekula.<sup>6</sup>

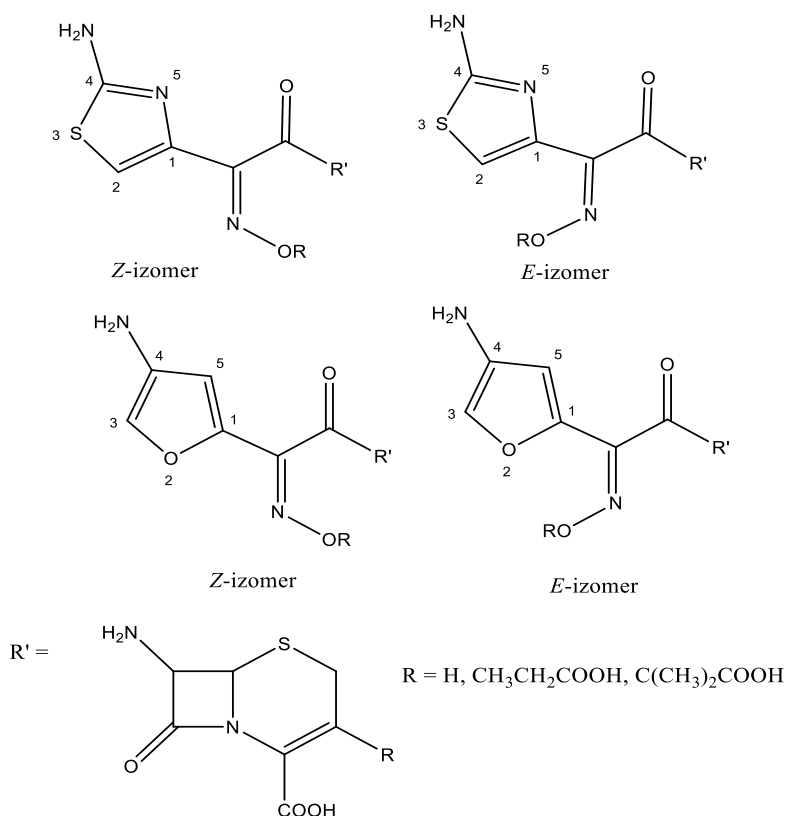
Dva atoma ili skupine su dijastereotopni ako se čini kao da su povezani operacijom simetrije, ali zapravo nisu. Zamjenom dijastereotopnog atoma ili skupine neće nastati molekula koja je zrcalna slika molekule u kojoj su zamijenjeni drugi atom ili skupina. Dijastereotopni protoni se nalaze pri različitim kemijskim pomacima u NMR spektru te se mogu međusobno sprežati i razlikovati.<sup>3,6</sup>

## 2.4. Primjena NMR spektroskopije u razlikovanju dijastereomera

Razlikovanje dijastereomera NMR spektroskopijom temelji se na usporedbi NMR parametara *Z*- i *E*- izomera kao što su kemijski pomak i konstanta sprege. Kao primjeri primjene NMR spektroskopije u razlikovanju dijastereomera može se proučiti identifikacija izomera odabranih cefalosporina i ciklododeka-1,5,9-triena.

Cefalosporini su skupina beta-laktamskih antibiotika čije se strukture sastoje od 7-aminocefalosporinske kiseline s dihidrotiazinskim prstenom u skeletu molekule. *Z*-izomeri pod utjecajem svjetla i kiselih uvjeta prelaze u *E*-izomere te je nužno identificirati pojedine izomere i razdvojiti ih (slika 3).<sup>7</sup>



Slika 3. *Z*- i *E*-izomeri cefalosporina

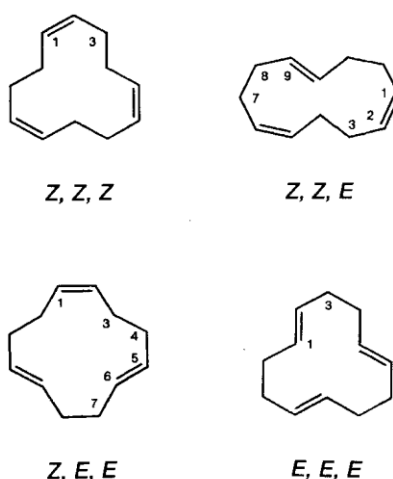
Pri identifikaciji izomera cefalosporina korištene su vrijednosti  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  kemijskih pomaka kako bi se razlikovao *Z*-izomer, koji ima bolje antibakterijsko djelovanje, od *E*-izomera. Proučavani su  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  kemijski pomaci na  $\delta$ -skali u ppm, prema natrijevom trimetilsililpropansulfonatu, DSS-u ( $\delta = 0,00$  ppm), u  $\text{D}_2\text{O}$  kao otapalu, te  $^1\text{H}$  pomaci prema TMS-u ( $\delta = 0,00$  ppm) u otapalu  $\text{DMSO-d}_6$ . Identifikacija izomera prisutnih u devet proučavanih molekula provedena je na osnovu vrijednosti  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  kemijskih pomaka aminotiazolnog/furilnog protona i ugljika C-2 (tablica 1).<sup>7</sup>

Tablica 1. Vrijednosti  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR kemijskih pomaka aminotiazolnog/furilnog protona i atoma ugljika *Z*- i *E*-izomera odabranih cefalosporina

Broj spoja	Spoj	$^1\text{H}$ kemijski pomak aminotiazolnog/furilnog protona ( $\delta$ u ppm)		$^{13}\text{C}$ kemijski pomak aminotiazolnog/furilnog ugljika s protonom ( $\delta$ u ppm)	
		<i>Z</i> -izomer	<i>E</i> -izomer	<i>Z</i> -izomer	<i>E</i> -izomer
1	Cefotaksim	6,74	7,55	109,8	116,6
2	Cefiksim	6,81	7,60	111,5	117,3
3	Cefdinir	6,67	7,51	107,7	115,1
4	Ceftiofur	6,89	7,45	110,5	115,6
5	Ceftriakson	6,73	7,44	113,6	116,5
6	Ceftazidim	6,70	7,62	110,7	124,8
7	Cefpodoksiproksetil	6,73	7,54	109,9	117,9
8	Cefuroksim	6,70	7,23	113,0	119,9
9	Cefuroksimaksetil	6,69	7,26	113,8	120,0

Interpretacija  $^1\text{H}$  NMR spektara ukazala je na veći kemijski pomak aminotiazolnog protona *E*-izomera u usporedbi s *Z*-izomerom, te se on javlja kao singlet dovoljno udaljen od ostalih signala. Sličan trend pokazuje i  $^{13}\text{C}$  NMR spektar, u kojem aminotiazolni ugljik C5 *E*-izomera ima veći pomak od *Z*-izomera. Usporedbom NMR podataka svih proučavanih spojeva cefalosporina ustanovila se razlika od 0,7 ppm u  $^1\text{H}$  kemijskim pomacima te razlike od 7 ppm u  $^{13}\text{C}$  kemijskim pomacima između *Z*- i *E*-izomera.<sup>7</sup>

U drugom primjeru,  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom proučavana su četiri *Z-E* izomera ciklododeka-1,5,9-triena (slika 4).



Slika 4. Četiri *Z-E* izomera ciklododeka-1,5,9-triena

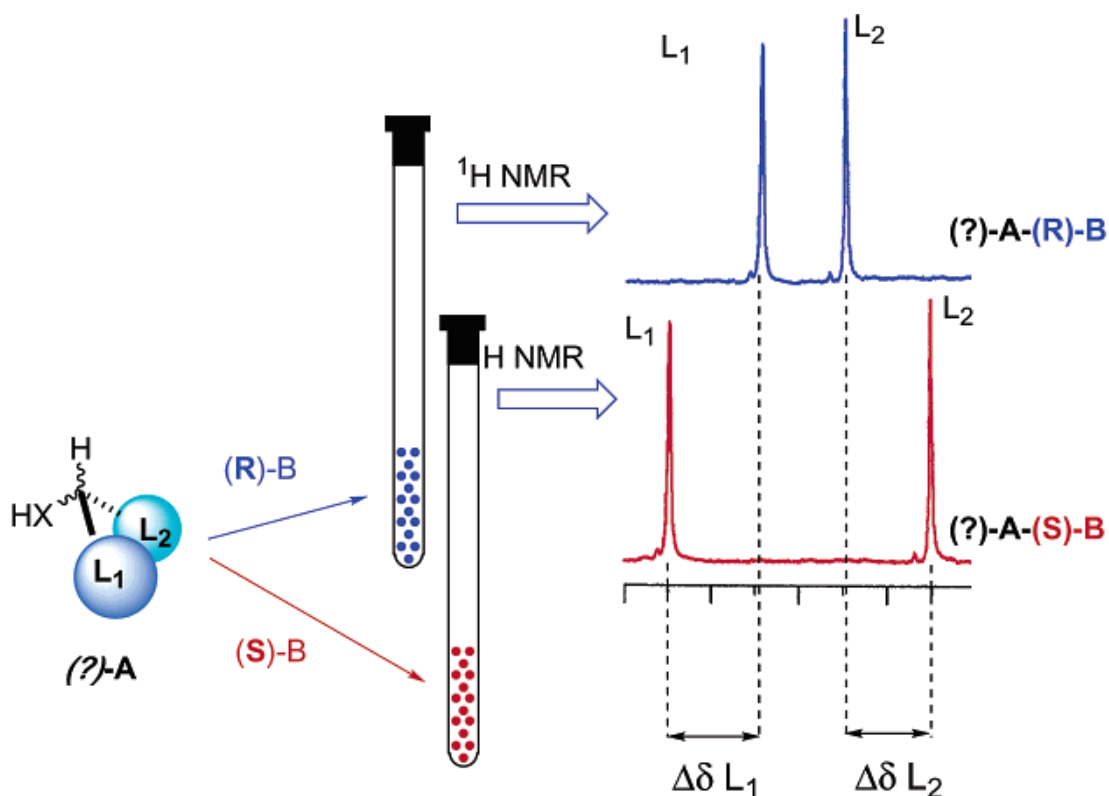
Konstante sprege susjednih  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  olefinskih protona korištene su za određivanje stereokemije dvostrukih veza. Međutim, u slučaju kemijski ekvivalentnih protona (simetrično supstituiranih  $-\text{CH}=\text{CH}-$  skupina) konstanta sprege dobivena je iz  $^{13}\text{C}$  NMR multipleta proučavanih pomoću metode  $^1\text{H}$  kontinuiranog vala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima izvan rezonancije. Velika simetrija  $Z,Z,Z$  i  $E,E,E$  izomera i brze konformacijske promjene dovode do ekvivalencije šest olefinskih protona i šest zasićenih ugljikovih atoma kao i povezanih H-atoma te se zato spektar tih izomera sastoji od samo dva signala. Pomoću određenih konstanti sprege (za  $Z$ -dvostruke veze  $J(\text{HH}) = 10,6\text{-}12,3$  Hz dok je za  $E$ -dvostruke veze  $J(\text{HH}) = 15,3\text{-}16,7$  Hz) navedeni izomeri ciklododeka-1,5,9-triena mogu se jednostavno razlikovati.<sup>8</sup>

## 2.5. Primjena NMR spektroskopije u razlikovanju enantiomera

Za određivanje apsolutne konfiguracije enantiomera uglavnom se koriste dva pristupa. Prvi uključuje postupke u kojima derivatizacija supstrata nije potrebna te se on proučava u kiralnom otapalu ili u standardnom NMR otapalu kojem je dodan kiralni solvatorajuć reagens (engl. *chiral solvating agent*, CSA). Ova je metoda ograničena jer kiralno okruženje stvara male razlike u kemijskim pomacima enantiomera zato što nema kovalentne povezanosti supstrata i kiralnog solvatorajućeg reagensa. Također bi oba enantiomera trebala biti prisutna za usporedbu te nema jasne korelacije između apsolutne konfiguracije i NMR spektra. Drugi pristup uključuje dobivanje dva diastereomerna derivata derivatizacijom supstrata s dva enantiomera kiralnog derivatizirajućeg reagensa tzv. kiralnog pomoćnog reagensa (engl. *chiral derivatizing agent*, CDA). Tada je prisutna kovalentna povezanost sa supstratom čime se dobivaju veće razlike u kemijskim pomacima nego uz pomoć CSA.<sup>9</sup>

### 2.5.1. Metode temeljene na kiralnom derivatizirajućem reagensu

NMR metode za određivanje apsolutne konfiguracije nužno uključuju transformaciju kiralnog supstrata u dvije vrste koje se mogu razlikovati NMR spektroskopijom, a to se postiže derivatizacijom supstrata s CDA i usporedbom  $^1\text{H}$  NMR spektara dobivenih vrsta. Ovisno o broju pripremljenih derivata razlikuju se dvije metode, kojima je zajedničko da daju dva različita spektra koji se zatim uspoređuju. Prva metoda obuhvaća odvojenu derivatizaciju supstrata, odnosno čistog enantiomera, s dva enantiomera kiralnog pomoćnog reagensa (slika 5).<sup>9</sup>

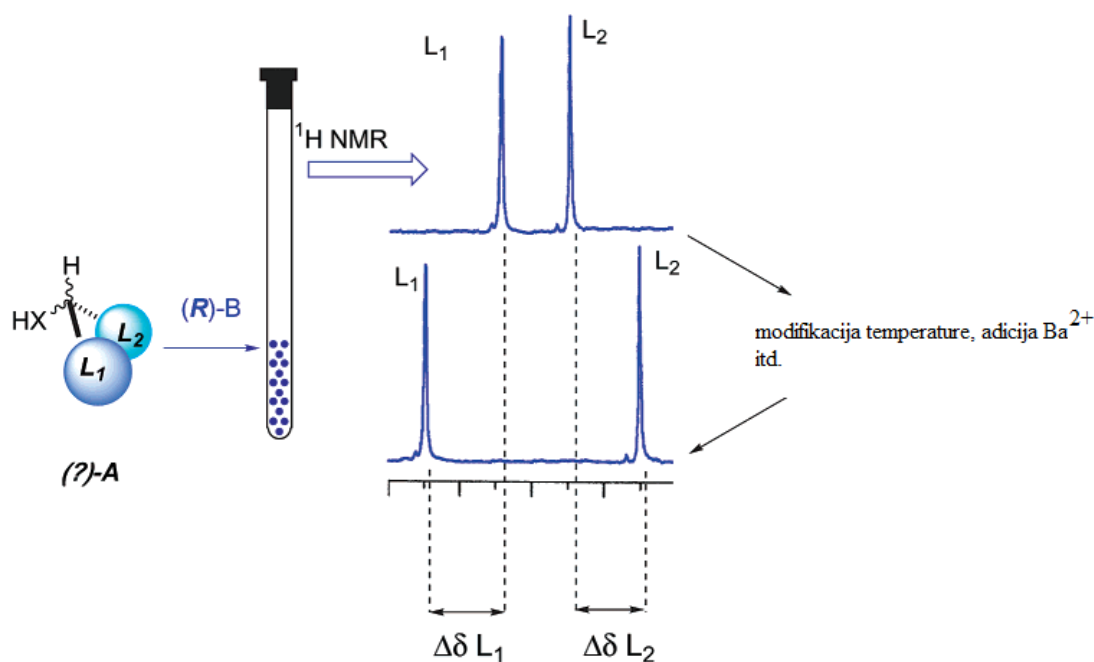


Slika 5. Metoda odvojene derivatizacije supstrata s enantiomerima kiralnog pomoćnog reagensa (preuzeto iz J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

Kiralni supstrat [(?)-A] se spreže odvojeno s dva enantiomera kiralnog pomoćnog sredstva te se zatim uspoređuju snimljeni NMR spektri dijastereomera ((?)-A-(R)-B i (?)-A-(S)-B).

Druga metoda koristi kombinaciju kiralnog supstrata s jednim enantiomerom kiralnog pomoćnog sredstva čime se dobiva jedan dijastereomer (slika 6).<sup>9</sup>

Zatim se snima NMR spektar dobivenog dijastereomera te se promjenom temperature ili tvorbom kompleksa induciraju konformacijske promjene što se očituje promjenama u drugom snimljenom spektru. Analizom razlika NMR spektara, dobivenih konformacijskim promjenama, konfiguracija supstrata dovodi se u vezu s konfiguracijom kiralnog pomoćnog sredstva. Također se može pristupiti analizi bez induciranih konformacijskih promjena pri čemu se uspoređuju NMR spektri dijastereomernog derivata i supstrata prije derivatizacije.<sup>9</sup>



Slika 6. Metoda derivatizacije supstrata s jednim enantiomerom kiralnog pomoćnog sredstva (preuzeto i prilagođeno prema J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

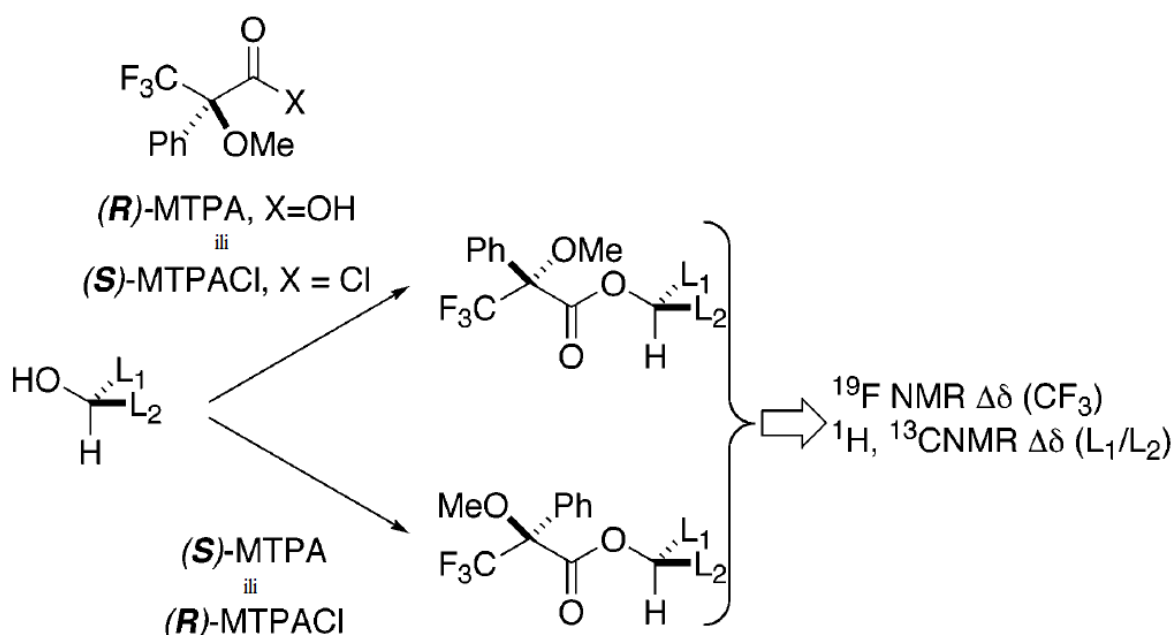
Određivanje apsolutne konfiguracije pomoću NMR spektroskopije temelji se na korelaciji stereokemije kiralnog središta pomoćnog reagensa (poznate konfiguracije) sa stereokemijom supstrata (nepoznate konfiguracije). Pritom se promatraju razlike kemijskih pomaka ( $\Delta\delta$ ) supstituenata ( $L_1$  i  $L_2$ ) na asimetričnim ugljikovim atomima dva derivata. Predznak parametra  $\Delta\delta$  (+ ili –) daje informacije o konfiguraciji, a za pojedini supstituent se definira kao razlika kemijskog pomaka određenog signala supstituenta u promatranim spektrima.<sup>1</sup>

Struktura kiralnog pomoćnog reagensa mora sadržavati skupine s određenim funkcijama: polarnu ili veliku skupinu ( $R_1$ ), za fiksiranje određene konformacije, funkcijsku skupinu ( $Z$ ), koja omogućava kovalentno povezivanje supstrata, i skupinu ( $Y$ ) koja stvara prostorno-orijentiran anizotropni efekt. Skupina  $Y$  utječe na supstituente  $L_1$  i  $L_2$  supstrata njihovim zasjenjenjem ili odsjenjenjem što dovodi do razlika u kemijskim pomacima dviju vrsta koje se koriste za određivanje konfiguracije. U metodama koje se temelje na nastanku dva derivata, nužno je da oba diastereomera pokazuju neku sklonost za određenu konformaciju, koja je neovisna o određenom supstratu, a  $Y$  skupina mora selektivno usmjeravati svoju magnetsku anizotropiju.<sup>9</sup>

Pomoću ovih metoda mogu se odrediti konfiguracije raznih supstrata kao što su primarni, sekundarni i tercijarni alkoholi, dioli, karboksilne kiseline, primarni i sekundarni amini te sulfoksidi. Za svaki od tih primjera razvijena su odgovarajuća kiralna pomoćna sredstva koja daju derivate kao što su esteri, poluacetali, amidi, itd.<sup>9</sup>

### 2.5.2. Metode temeljene na dvostrukoj derivatizaciji

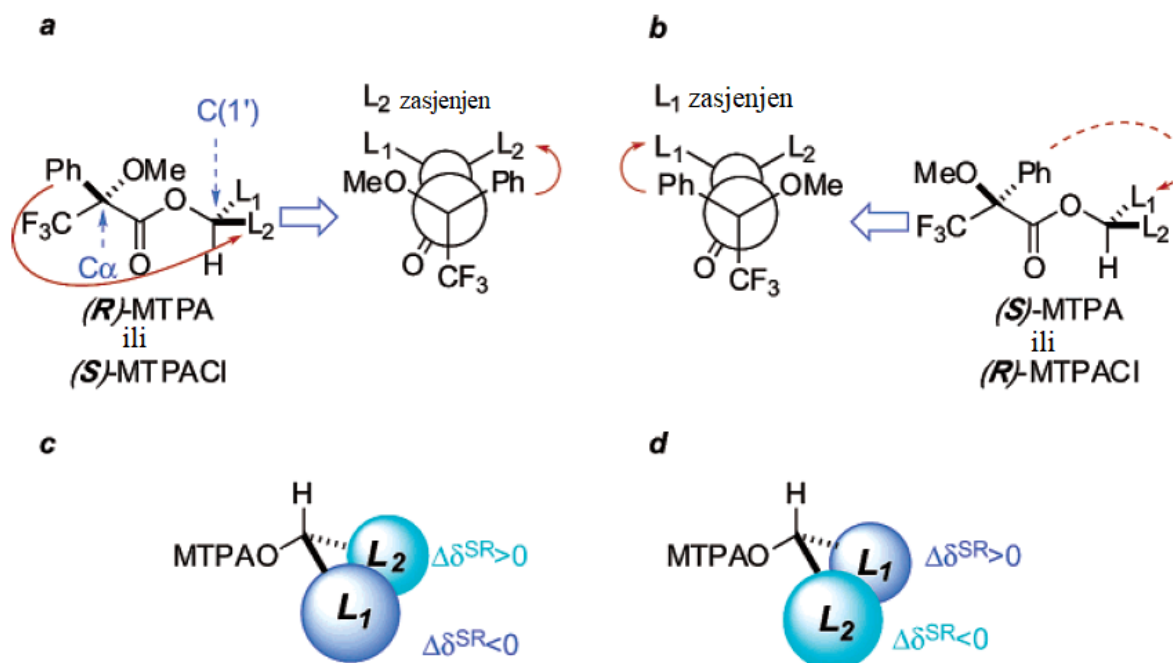
Za određivanje apsolutne konfiguracije sekundarnih alkohola pomoću NMR spektroskopije najčešće korišteno derivatizirajuće sredstvo je Mosherov reagens MTPA odnosno  $\alpha$ -metoksi- $\alpha$ -trifluorometil- $\alpha$ -feniloctena kiselina (slika 7).<sup>9</sup>



Slika 7. Dvostruka derivatizacija sekundarnih alkohola pomoću Mosherovog reagensa (MTPA ili MTPACl)

Mosherov reagens dolazi u obliku karboksilne kiseline (MTPA) ili kiselinskog klorida (MTPACl). Derivatizacijom alkohola s (R)-MTPA kiselinom nastaje (R)-MTPA ester dok derivatizacijom alkohola s (R)-MTPA kloridom ((R)-MTPACl) nastaje (S)-MTPA ester. Postupak započinje esterifikacijom alkohola s dva enantiomera MTPA. Zatim se nastalim dijastereomernim esterima snimaju i uspoređuju NMR spektri te se korištenjem određenih empirijskih modela određuje apsolutna konfiguracija alkohola na temelju  $\Delta\delta$  predznaka. Korištenje <sup>1</sup>H NMR spektroskopije temelji se na anizotropnom učinku kojim fenilna skupina kiralnog pomoćnog sredstva MTPA djeluje na supstituente (L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub>) proučavanog

sekundarnog alkohola. Taj učinak omogućuje korelaciju u odnosu na prostorni položaj  $L_1$  i  $L_2$  s obzirom na fenilnu skupinu MTPA, te je ta informacija sadržana u predznaku  $\Delta\delta^{SR}$  supstituenata. Pretpostavljena je reprezentativna konformacija u kojoj su  $C(1')H$ , karbonilna i  $CF_3$  skupina u istoj ravnini (slika 8).<sup>9</sup>

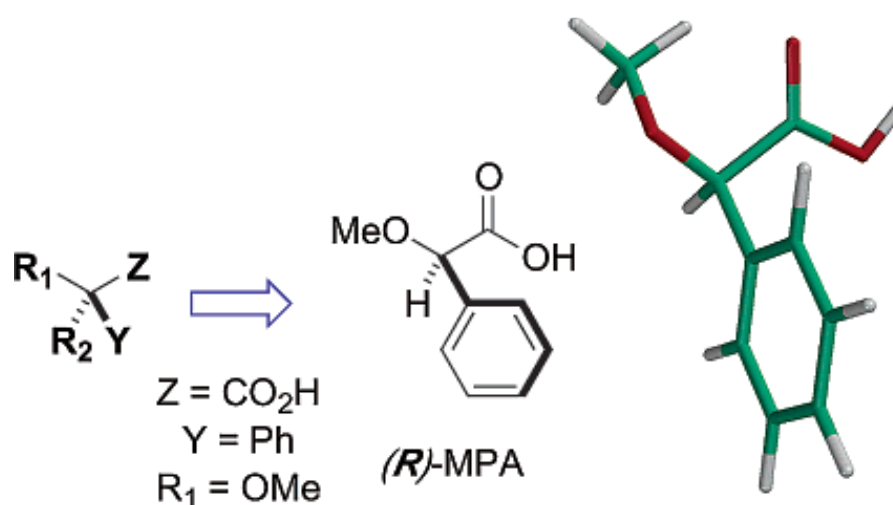


Slika 8. Moshерови модели za (a,b) određivanje konfiguracije pomoću  $^1H$  NMR spektroskopije i (c,d) pretpostavljeni predznaci  $\Delta\delta^{SR}$  (preuzeto i prilagođeno prema J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

Prema tome, protoni supstituenta  $L_2$  su zasjenjeni fenilnim prstenom u  $(R)$ -MTPA esteru dok na protone  $L_1$  supstituenta nema utjecaja. S druge strane, kod  $(S)$ -MTPA derivata, protoni supstituenta  $L_1$  su zasjenjeni, a na protone  $L_2$  supstituenta nema utjecaja. Zaključeno je da će supstituent  $L_1$  biti zasjenjeniji u  $(S)$ -MTPA esteru nego u  $(R)$ -MTPA esteru, dok je kod supstituenta  $L_2$  obrnuto. Razlike u zasjenjenju se izražavaju pomoću  $\Delta\delta^{SR}$ , koji se definira kao razlika između kemijskog pomaka određenog protona u  $(S)$ -MTPA esteru i kemijskog pomaka istog protona u  $(R)$ -MTPA esteru. Protoni koji su zasjenjeni u  $(R)$ -MTPA imati će pozitivan  $\Delta\delta^{SR}$ , dok će u  $(S)$ -MTPA ti isti protoni imati negativni  $\Delta\delta^{SR}$ , i obrnuto. Iako je za snimanje  $^{13}C$  NMR spektra potrebno više uzorka nego za snimanje  $^1H$  NMR spektra, koristan je za određivanje apsolutne konfiguracije alkohola koji na supstituentima  $L_1$  i  $L_2$  nemaju protone. Korištenjem  $^{13}C$  NMR kemijskih pomaka supstituenata  $L_1$  i  $L_2$  u  $(S)$ - i  $(R)$ -MTPA esterima, određeno je da supstituent koji ima negativan predznak  $\Delta\delta^{SR}$  zauzima  $L_1$  mjesto, a

supstituent koji ima pozitivni predznak  $\Delta\delta^{\text{SR}}$  je  $L_2$ . Osim  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara također se mogu snimati  $^{19}\text{F}$  NMR spektri koji većinom sadrže samo signale  $\text{CF}_3$  skupine čime se eliminira mogućnost preklapanja signala koji često kompliciraju  $^1\text{H}$  NMR spektre. Mosherova metoda određivanja apsolutne konfiguracije sekundarnih alkohola uz pomoć MTPA posjeduje i određena ograničenja, kao što su male  $\Delta\delta^{\text{SR}}$  vrijednosti, na koje značajno utječu anizotropne skupine supstrata, te konformacijska ograničenja. Zbog toga se preporučuje korištenje drugih, pouzdanijih kiralnih pomoćnih sredstava.<sup>9</sup>

MPA ( $\alpha$ -metoksi- $\alpha$ -feniloctena kiselina) također je važno kiralno pomoćno sredstvo koje se koristi za određivanje apsolutne konfiguracije sekundarnih alkohola (slika 9).<sup>9</sup>



Slika 9. Kiralno pomoćno sredstvo MPA (preuzeto iz J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

Metode korištenja MTPA i MPA gotovo su identične, a razlikuju se po tome da je relativni položaj fenilne skupine, u odnosu na  $L_1$  i  $L_2$  supstituente istog alkohola, suprotan kod MTPA i MPA estera te se tako dobivaju različiti predznaci za istu konfiguraciju. Kako bi se dobio isti predznak za oba reagensa, razlika kemijskih pomaka računa se kao  $\Delta\delta^{\text{RS}}$  u MPA esterima, dok se kod MTPA estera koristi  $\Delta\delta^{\text{SR}}$ . Nadalje, kod MPA estera sekundarnih alkohola prisutna su dva konformera od kojih je jedan zastupljeniji, dok su kod MTPA estera sekundarnih alkohola prisutna tri jednako zastupljena konformera. Tako se kod MPA estera dobivaju veće  $\Delta\delta^{\text{RS}}$  vrijednosti te se ono preferira kao derivatizirajuće sredstvo za sekundarne alkohole.<sup>9</sup>

Raznim modifikacijama strukture MA (metoksiotene kiseline) dobivena su bolja i pouzdanija sredstva za određivanje apsolutne konfiguracije, kao što je AMAA (arilmetoksiotena kiselina), a zamjenom fenilnog prstena MPA s naftilnim ili antrilnim

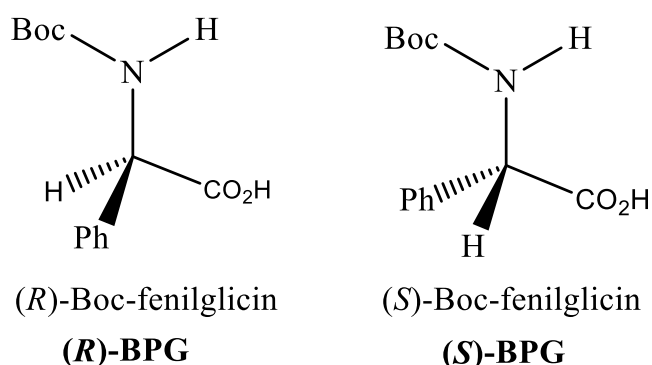


prstenom priređena su najučinkovitija sredstva, npr. 9-AMA ( $\alpha$ -(9-antril)- $\alpha$ -metoksiocetna kiselina). Zamjenom fenilnog prstena drugim arilnim sustavima dolazi do intenzivnijeg efekta aromatskog zasjenjenja na supstrat te do promjene konformacijske orijentacije prstena u odnosu na supstrat, pa su tako  $\Delta\delta^{\text{RS}}$  vrijednosti 9-AMA puno veće u odnosu na druga sredstva.<sup>9</sup>

Opisana kiralna pomoćna sredstva također se mogu primijeniti i na primarne alkohole s kiralnim središtem u  $\beta$ -položaju s obzirom na -OH skupinu. No, kod takve primjene postoje i određeni problemi kao što su veća udaljenost između  $L_1/L_2$  skupina supstrata i arilnog prstena kiralnog pomoćnog sredstva nego što je to kod sekundarnih alkohola zbog kiralnog središta koje se nalazi u  $\beta$ -položaju, te prisutnost dodatne C-C veze između kiralnog središta i kiralnog pomoćnog sredstva čime se povećava rotacijska sloboda pa su  $\Delta\delta^{\text{RS}}$  vrijednosti primarnih alkohola manje i nepouzdanije u odnosu na sekundarne alkohole.<sup>9</sup>

Tercijarni alkoholi slabije su proučavani zbog poteškoća u stvaranju derivata (npr. estera) sa zadovoljavajućim iskorištenjem te zbog neprikladnih konformacijskih karakteristika.<sup>9</sup>

Moshierova metoda može se primijeniti i na određivanje apsolutne konfiguracije kiralnih primarnih amina s kiralnim središtem u  $\alpha$ -položaju. Metoda se zasniva na pripravi odgovarajućih MTPA amida iz amina nepoznate konfiguracije i dva enantiomera MTPA. Snimljeni NMR spektri derivata se analiziraju te se računaju razlike u kemijskim pomacima ( $\Delta\delta^{\text{SR}}$ ). Ipak, kod amina nije uočena značajna razlika u  $\Delta\delta$  dobivenih amida kada se koristi MTPA ( $\Delta\delta^{\text{SR}}$ ) ili MPA ( $\Delta\delta^{\text{RS}}$ ). Male razlike kemijskih pomaka moguće je učinkovitije pratiti uporabom Boc-fenilglicina (BPG) zbog njegovih strukturnih svojstava, komercijalne dostupnosti u enantiomernim oblicima, a uz to je i jeftiniji od drugih reagensa (slika 10).<sup>9</sup>



Slika 10. Strukture (R)-BPG i (S)-BPG

Amin nepoznate konfiguracije derivatizira se dvama enantiomerima BPG-a, zatim se snime  $^1\text{H}$  NMR spektri dobivenih diastereomernih BPG amida i izračunaju razlike u kemijskim pomacima  $\Delta\delta^{\text{RS}}$  supstituenata  $L_1$  i  $L_2$ . Predznaci  $\Delta\delta^{\text{RS}}$  se potom koreliraju s apsolutnom konfiguracijom pomoću neempirijskog modela, koji je uspostavljen detaljnom konformacijskom analizom.<sup>9</sup>

Kod karboksilnih kiselina s  $\alpha$ -kiralnim središtem općenite metode za određivanje apsolutne stereokemije su rijetke. Odabrano kiralno sredstvo treba se vezati na karboksilnu kiselinu tako da postoji značajna konformacijska preferencija, koja ostaje ista u *R* i *S* derivatima te je neovisna o prirodi same karboksilne kiseline. Ustanovljeno je da je esterska veza konformacijski prikladnija za vezanje kiralnog sredstva na supstrat od amidne veze, te se kao kiralna pomoćna sredstva za karboksilne kiseline koriste uglavnom sekundarni alkoholi (npr. arilcikloheksanoli).<sup>9</sup>

### 2.5.3. Metode temeljene na jednostrukoj derivatizaciji

U metodama temeljenim na jednostrukoj derivatizaciji koristi se samo jedan derivat i jedan derivatizacijski korak pa je ovim pristupom dvostruko smanjeno vrijeme i potrebna količina analiziranog uzorka, u odnosu na metode temeljene na dvostrukoj derivatizaciji. Postoje dva općenita pristupa u korištenju ovakvih metoda.<sup>9</sup>

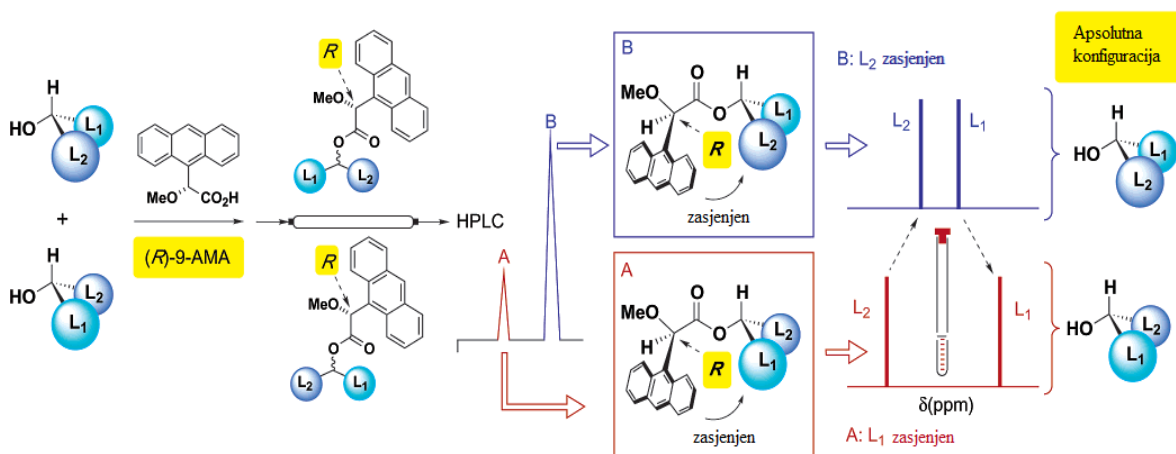
Prvi pristup se primjenjuje na sekundarne alkohole čija se apsolutna konfiguracija može odrediti uporabom jakog kiralnog pomoćnog sredstva, kao što je 9-AMA, odnosno usporedbom NMR spektara sekundarnog alkohola s jednim od njegovih 9-AMA estera. Usporedbom se uočava jasna razlika u signalima supstituenata  $L_1$  i  $L_2$  jer se protoni jednog od supstituenata 9-AMA estera (onog koji je zasjenjen antrilnim prstenom) nalaze pri višem magnetskom polju u odnosu na slobodni sekundarni alkohol.<sup>9</sup>

Drugi pristup se koristi kod primarnih amina i sekundarnih alkohola, a sastoji se od kontrolirane modifikacije konformacijske ravnoteže MPA amida i MPA estera te se temelji na poznavanju efekata zasjenjenja/odsjenjenja pojedinog konformera. Ako se omjer konformera promijeni, ta će se promjena odraziti kao promjena kemijskih pomaka supstituenata  $L_1$  i  $L_2$ . Na taj način se iz NMR spektara može odrediti položaj supstituenata  $L_1$  i  $L_2$  s obzirom na fenilnu skupinu kiralnog pomoćnog sredstva kao posljedica promjene ravnoteže. Konformacijska promjena tj. promjena ravnoteže, može se postići snižavanjem temperature NMR sonde (npr. kod određivanja apsolutne konfiguracije sekundarnih alkohola pomoću

MPA) ili selektivnom kelacijom jednog od konformera (npr. kod određivanja apsolutne konfiguracije sekundarnih alkohola i primarnih amina pomoću MPA te barijevih (II) soli kao kelatora).<sup>9</sup>

#### 2.5.4. Nove metode derivatizacije

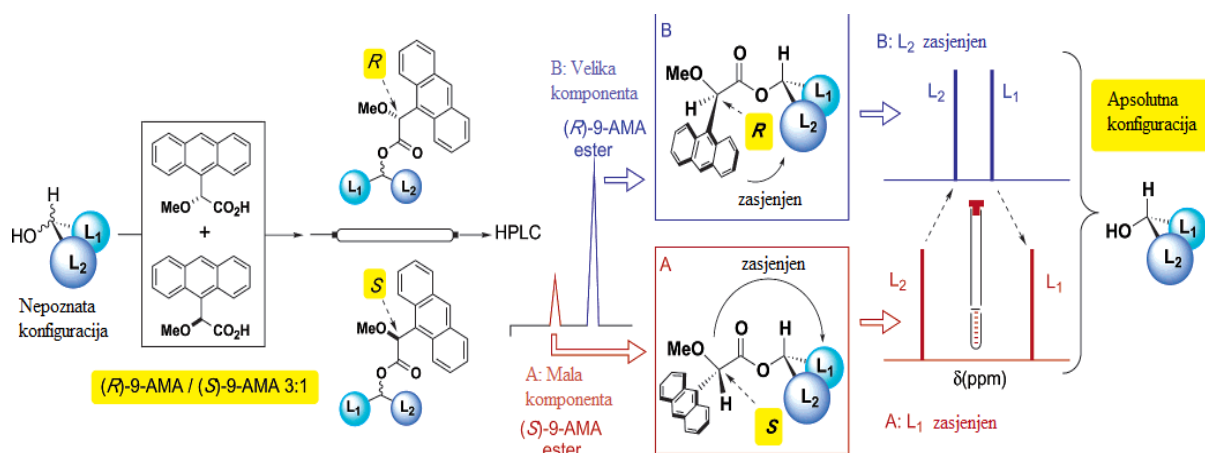
Kada je količina uzorka ograničena i kada je potrebno brzo odvajanje smjese te spektroskopska analiza sastojaka smjese, koristi se spregnuti sustav tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-nuklearna magnetna rezonancija-spektrometrija masa (HPLC-NMR-MS). Derivatizacijom smjese enantiomernih sekundarnih alkohola s 9-AMA i korištenjem spregnutog sustava HPLC-NMR omogućava se razdvajanje enantiomera i određivanje njihove apsolutne konfiguracije. Pri određivanju apsolutne konfiguracije pojedinog enantiomera u smjesi, provodi se derivatizacija s (*R*)- ili (*S*)-9-AMA nakon čega se smjesa 9-AMA estera analizira pomoću HPLC-NMR sustava. Usporedbom <sup>1</sup>H NMR spektara dva HPLC pika omogućeno je određivanje konfiguracije na temelju efekta zasjenjenja/odsjenjenja uzrokovanog u supstituentima L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub> od strane kiralnog pomoćnog sredstva poznate konfiguracije (slika 11).<sup>9</sup>



Slika 11. Određivanje apsolutne konfiguracije enantiomera kiralnog sekundarnog alkohola analizom njihovih (*R*)-9-AMA estera pomoću spregnutog sustava HPLC-NMR (preuzeto i prilagođeno prema J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

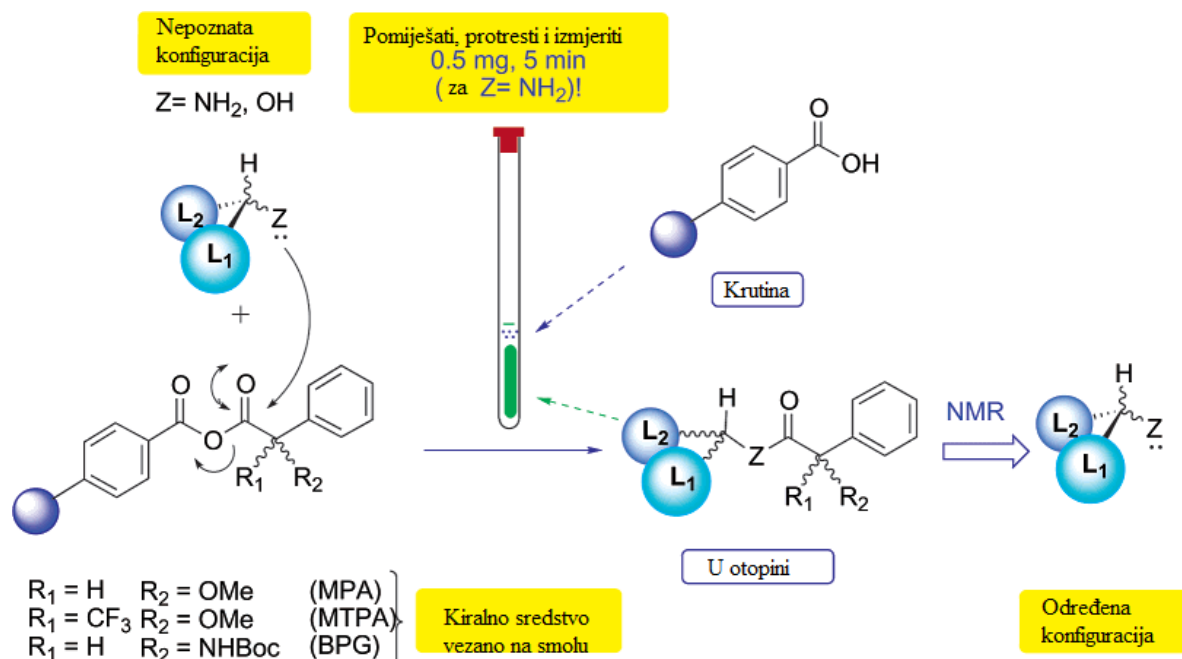
Međutim, kada je potrebno odrediti apsolutnu konfiguraciju jednog enantiomera, alkohol se derivatizira smjesom (*R*)- i (*S*)-9-AMA u omjeru 3:1. Zatim se nastala nejednolika smjesa 9-AMA estera analizira sustavom HPLC-NMR te se uspoređuju spektri oba HPLC pika

uzimajući u obzir da glavna komponenta smjese odgovara (*R*)-esteru, a manje zastupljena komponenta (*S*)-esteru (slika 12).<sup>9</sup>



Slika 12. Određivanje apsolutne konfiguracije kiralnog sekundarnog alkohola derivatizacijom sa smjesom (*R*)- i (*S*)-9-AMA u omjeru 3:1 i analizom odgovarajućih diastereomernih estera spregnutim sustavom HPLC-NMR (preuzeto i prilagođeno prema J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

Nedavno je otkrivena metoda kojom je određivanje apsolutne konfiguracije NMR spektroskopijom svedeno na nekoliko minuta bez potrebnog razdvajanja ili manipulacije, a zove se metoda „pomiješaj i protresi“ (engl. *Mix and Shake method*). U toj se metodi potrebni derivati pripremaju miješanjem čvrstog pomoćnog reagensa (npr. MPA, MTPA ili BPG) vezanog za matricu (engl. *solid matrix-bound auxiliary reagent*) s kiralnim supstratom (npr. primarnim aminom ili sekundarnim alkoholom) direktno u NMR cjevčici nakon čega se u nekoliko minuta dobivaju NMR spektri nastalih derivata. Potrebno je dobro vezanje kiralnog pomoćnog reagensa za matricu preko anhidridne skupine koja omogućava kiralnom pomoćnom reagensu da djeluje kao elektrofil prema kiralnom supstratu te olakšava izlazak krute smole i oslobađanje esterskog ili amidnog derivata u otopinu (slika 13).<sup>9</sup>



Slika 13. Korištenje čvrstih pomoćnih reagensa (MPA, MTPA i BPG) vezanih za matricu u metodi „pomiješaj i protresi“ (preuzeto i prilagođeno prema J. M. Seco, E. Quiñoá, R.

Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.)

### 2.5.5. Metode temeljene na kiralnom solvatirajućem reagensu

NMR spektroskopijom mogu se odrediti strukture proučavanih molekula, no odgovarajuće jezgre enantiomera se ne mogu razlikovati budući da se nalaze u istom kemijskom okruženju. Međutim, enantiotopne jezgre mogu se razlikovati NMR spektroskopijom u dijastereomernom okruženju. Dijastereomerno okruženje može osim iz reakcije dva enantiomera s kiralnim pomoćnim sredstvom također proizlaziti iz nekovalentnih interakcija kiralnog pomoćnog sredstva i dva enantiomera pri čemu nastaju dijastereomerni solvati ili adukti. Takvo kiralno kompleksirajuće sredstvo naziva se kiralni solvatirajući reagens. Jednom kada se signali enantiomera mogu razlikovati, određivanje enantiomernog viška, omjera razlike i zbroja molarnih udjela enantiomera u smjesi dvaju enantiomera, zahtijeva asignaciju i integriranje signala u uvjetima kvantitativne analize.<sup>2,3</sup>

Pokazalo se da otapalo kao kiralno pomoćno sredstvo nije prihvatljivo jer CSA rezonancije mogu ometati promatranje <sup>1</sup>H jezgara enantiomera te bi njegova visoka koncentracija narušila spektralnu razlučivost. Međutim, u prisutnosti nekoliko ekvivalenata CSA u akiralnom otapalu, opaža se razlika odgovarajućih rezonancija dvaju enantiomera, pri

čemu treba paziti da se izbjegne upotreba otapala koja bi mogla biti u kompeticiji s CSA u interakciji s kiralnim supstratom.<sup>2</sup>

Neka od svojstava CSA su da njegova apsolutna konfiguracija utječe na relativne položaje signala dvaju enantiomera te što je veća enantiomerna čistoća CSA, veće su i opažene razlike između odgovarajućih signala dvaju enantiomera. Razlikovanje NMR signala dvaju enantiomera u prisutnosti CSA temelji se na stvaranju diastereomernih solvata koji brzo dolaze u ravnotežu s nevezanim vrstama. Odabir otapala ključan je za uspješno određivanje enantiomernog viška pa se kod vezanja CSA s enantiomerima privlačnim interakcijama između polarnih skupina koriste nepolarna otapala (npr.  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$  itd.) jer bi polarna otapala solvatirala otopljene enantiomere i onemogućila utjecaj CSA. S druge strane, u slučaju privlačnih hidrofobnih interakcija između nepolarnih skupina CSA i otopljene supstance koriste se polarna otapala (npr. DMSO,  $\text{CD}_3\text{OD}$  ili aceton).<sup>2</sup>

U analizama se primjenjuju male količine kiralnog pomoćnog sredstva jer su komercijalno dostupni CSA skupi, njihova sinteza je dugotrajna te se pri malim molarnim omjerima CSA i supstrata smanjuju spektralne interferencije i povećava razlučivanje. Općenito se kao CSA koriste male molekule od kojih većina u svojoj strukturi sadrži donore i akceptore vodikovih veza i aromatske supstituente za bolje razlikovanje kemijskih pomaka enantiomera. Makrocikličke CSA i ciklodekstrini koriste se za bolju selektivnost kod bioloških molekula. Zbog njihove topljivosti u vodenom mediju omogućena je analiza kiralnih metabolita direktno u biološkim tekućinama.<sup>2</sup>

#### 2.5.6. *Kiralni mediji za orijentiranje*

Još jedna mogućnost razlikovanja enantiomera je orijentacija promatrane molekule u tzv. kiralnom mediju za orijentiranje (engl. *chiral orienting medium*). Nakon djelomičnog orijentiranja molekule u takvom mediju mogu se mjeriti anizotropni NMR parametri kao što su rezidualne kvadrupolarne sprege, rezidualne dipolarne sprege i anizotropija rezidualnog kemijskog pomaka. S obzirom da je orijentacija dvaju enantiomera u kiralnom mediju za orijentiranje različita, različiti su i anizotropni parametri. Kao kiralni mediji za orijentiranje koriste se kiralne tekuće kristalne faze, razvučeni kiralni polimerni gelovi i paramagnetski centri. Ovim se pristupom može odrediti apsolutna konfiguracija ukoliko je dostupno dovoljno sličnih molekula poznate kiralnosti.<sup>1</sup>

Kao prvi tekući kristalni mediji za kiralno razlikovanje enantiomera korištene su smjesa kolesteril-klorida i kolesteril-miristata, membranska faza s optički aktivnim decil-2-sulfatom i poli- $\gamma$ -benzil-L-glutamat (PBLG). Sekundarnu strukturu PBLG-a karakterizira  $\alpha$ -uzvojnica što ukazuje da je kiralna struktura nužna za poticanje različite orijentacije kiralnih molekula odnosno za njihovo razlikovanje. Glavni nedostatak tekućih kristalnih medija je postojanje donje granice poravnavanja zbog čega je većina istraživanja u tekućim kristalnim fazama ograničena na male molekule.<sup>1</sup>

Kao razvučeni polimerni gelovi za kiralno orijentiranje koriste se želatina i kolagen koji sadrže trostruku uzvojnica kao kiralnu sekundarnu strukturu i koja omogućuje stereospecifično orijentiranje kiralnih molekula usporedivo s  $\alpha$ -uzvojnicom PBLG-a i drugim poli(aminokiselinama). Razvučeni polimerni gelovi nemaju donju granicu orijentiranja što rezultira većom fleksibilnošću prilikom primjene pulsnih sekvenci i korištenja dipolarnih sprega za razlikovanje enantiomera.<sup>1</sup>

Kod orijentiranja kiralnih molekula pomoću paramagnetnih centara, zbog jakog magnetskog momenta paramagnetnih centara, paramagnetične molekule se samostalno orijentiraju u magnetskom polju.<sup>1</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. B. Luy, *J. Indian Inst. Sci.* **90** (2010) 119–132.
2. G. Uccello-Barretta, F. Balzano, *Top. Curr. Chem.* **1** (2013) 69–131.
3. L.G. Wade, Jr., *Organic chemistry*, 7th Edition, Pearson Prentice Hall, Boston, 2010, str. 169–211, 561–611.
4. J. Clayden, N. Greevs, S. Warren, *Organic chemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford University Press, New York, 2012, str. 52–78, 269–323.
5. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013, str. 1–21.
6. J. H. Simpson, *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy: A Problem-Based Approach*, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2008, str. 95–100.
7. R. Rajadurai, B. Sivakumar, R. Murugan, S. Anantham, P.Y. Naidu, *Anal. Chem.: Indian J.* **9** (2010) 265–269.
8. R. Radeaglia, H. Poleschner, G. Haufe, *Magn. Reson. Chem.* **31** (1993) 1054–1056.
9. J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Chem. Rev.* **104** (2004) 17–117.