

Karakterizacija inkluzijskih kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina spektroskopijom NMR

Kelrajter, Melita

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:732659>

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

Melita Kelrajter

**Karakterizacija inkluzijskih kompleksa
nabumetona i β -ciklodekstrina spektroskopijom
NMR**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Ane Čikoš, zn. sur. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Nives Galić.

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ani Čikoš, zn. sur. na svim savjetima, pomoći, strpljenju i prijateljskom pristupu pri izradi ovog diplomskog rada. Također, želim se zahvaliti i ostaloj ekipi Centra za NMR Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, što su mi omogućili provedbu eksperimentalnog dijela ovoga rada te prof. dr. sc. Nives Galić i mag. chem. Davidu Klariću na pripravi uzoraka kompleksa.

Najveća zahvala ide mojoj obitelji na strpljenju i moralnoj podršci, te povjerenju koje su mi ukazali tijekom studiranja. Hvala i prijateljima što su uvijek biti tu uz mene.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| SAŽETAK..... | IX |
| ABSTRACT | XI |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED..... | 2 |
| 2.1. Nabumeton..... | 2 |
| 2.2. Ciklodekstrini | 3 |
| 2.2.1. Povijest i karakteristike | 3 |
| 2.2.2. Kompleksi ciklodekstrina | 7 |
| 2.2.3. Upotreba ciklodekstrina..... | 9 |
| 2.3. Osnove spektroskopije NMR..... | 11 |
| 2.3.1. Jezgre | 11 |
| 2.3.2. Statično vanjsko magnetsko polje..... | 12 |
| 2.3.3. Rezonancija | 13 |
| 2.3.4. Relaksacija | 14 |
| 2.3.5. Spektrometar NMR..... | 17 |
| 2.3.6. Jednodimenzijske tehnike spektroskopije NMR..... | 19 |
| 2.3.7. Dvodimenzijske tehnike spektroskopije NMR..... | 22 |
| 2.3.8. 2D tehnike temeljene na homonuklearnim korelacijama | 23 |
| 2.3.9. 2D tehnike temeljene na heteronuklearnim korelacijama | 27 |
| 2.3.10. DOSY NMR | 28 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 30 |
| 3.1. Materijali..... | 30 |
| 3.2. Priprema uzoraka..... | 30 |
| 3.3. Metode | 31 |
| 3.3.1. Spektri za potpunu asignaciju protonskih i ugljikovih signala..... | 32 |
| 3.3.2. Spektri za identifikaciju intermolekulskih interakcija | 33 |
| 3.3.3. Spektri za određivanje difuzijskih koeficijenata | 33 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 34 |
| 4.1. Analiza kompleksa otopljenog u DMSO-d₆ | 34 |
| 4.1.1. Potpuna asignacija signala nabumetona i β-ciklodekstrina | 34 |
| 4.1.2. Usporedba kemijskih pomaka | 37 |
| 4.1.3. Analiza NOESY spektra..... | 40 |
| 4.1.4. Analiza selektivnih NOE/ROE spektara | 42 |

| | |
|---|-------------|
| 4.1.5. Analiza DOSY spektara..... | 44 |
| 4.2. Analiza kompleksa otopljenog u D₂O..... | 46 |
| 4.2.1. Potpuna asignacija signala i usporedba kemijskih pomaka nabumetona i β-ciklodekstrina..... | 46 |
| 4.2.2. Analiza selektivnih 1D i 2D ROE spektara | 50 |
| 4.2.3. Analiza DOSY spektara..... | 53 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 55 |
| § 6. LITERATURNI IZVORI..... | 57 |
| § 7. DODATAK..... | XV |
| § 8. ŽIVOTOPIS | XVII |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA INKLUZIJSKIH KOMPLEKSA NABUMETONA I β -CIKLODEKSTRINA SPEKTROSKOPIJOM NMR

Melita Kelrajter

Nabumeton je protuupalni lijek II. skupine biofarmaceutskog sustava klasifikacije djelatnih tvari budući da ga karakterizira izuzetno niska topljivost u vodi koja uzrokuje njegovu ograničenu bioraspoloživost. Topljivost u vodi može se povećati kompleksiranjem s ciklodekstrinima. Molekule ciklodekstrina imaju jedinstvenu strukturu sličnu krnjem stošcu, s hidrofobnom šupljinom s unutrašnje strane i hidrofilnom površinom s vanjske strane, zahvaljujući kojoj mogu tvoriti inkluzijske komplekse s različitim molekulama gostiju. Inkluzijski kompleksi nastaju pomoću hidrofobnih interakcija između molekula gostiju i ciklodekstrinske hidrofobne šupljine. U ovom radu istražen je mehanizam ulaska nabumetona u šupljinu β -ciklodekstrina i stvaranje inkluzijskog kompleksa. Za karakterizaciju korištene su tehnike spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) za istraživanje strukture (^1H , ^{13}C , COSY, HSQCe, HMBC), kao i one kojima se ispituju interakcije između različitih molekula u otopini (NOESY, ROESY, DOSY). U diplomskom radu dokazano je stvaranje inkluzijskog kompleksa i posljedično povećanje topljivosti nabumetona u vodi.

(97 stranica, 46 slika, 11 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: β -ciklodekstrin, inkluzijski kompleksi, nabumeton, NMR, topljivost

Mentor: dr. sc. Ana Čikoš, zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan
 3. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
- Zamjena: prof. dr. sc. Predrag Novak

Datum diplomskog ispita: 24. veljače 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF NABUMETONE AND β -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES USING NMR SPECTROSCOPY

Melita Kelrajter

Nabumetone is an anti-inflammatory drug belonging to 2nd group of the biopharmaceutical active substances classification system due to extremely low solubility in water, which is the cause of its limited bioavailability. The solubility in water can be increased by creating complexes with cyclodextrins. These molecules have a unique frusto-conical structure with a hydrophobic cavity and a hydrophilic surface, enabling them to form inclusion complexes with different guest molecules. The formation of inclusion complexes occurs through hydrophobic interactions between guest molecules and the cyclodextrin hydrophobic cavity. In this study, the mechanism of nabumetone inclusion into β -cyclodextrin was researched. To characterize the nabumetone/ β -cyclodextrin inclusion complex, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) techniques for structural research (¹H, ¹³C, COSY, HSQCe, HMBC), as well as those that examine interactions between different molecules (NOESY, ROESY, DOSY) were used. In this study, the formation of inclusion complex between β -cyclodextrin and nabumetone was established, resulting in increased water solubility of the drug.

(97 pages, 46 figures, 11 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis is 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: β -cyclodextrin, inclusion complex, nabumetone, NMR, solubility

Mentor: Dr. Ana Čikoš, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Nives Galić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Ivana Biljan, Associate Professor
 3. Dr. Branimir Bertoša, Professor
- Substitute: Dr. Predrag Novak, Professor

Date of exam: 24 February 2022

§ 1. UVOD

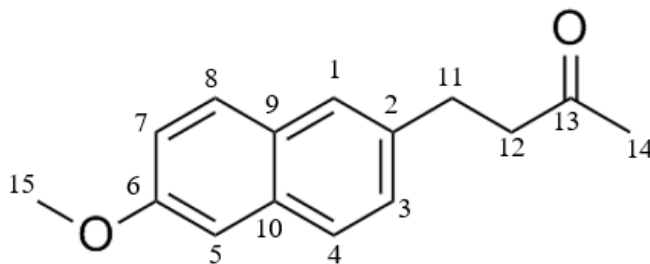
Lijekovi koji su slabo topljivi u vodi djeluju sporije, te zbog male bioraspoloživosti imaju i smanjenu aktivnost. U farmaceutskoj industriji ova se problematika godinama rješava upotrebom pomoćnih tvari (aditiva) koje ne utječu direktno na aktivnost molekule, ali djeluju na nju posredno, kroz poboljšanje topljivosti. Jedan od takvih aditiva je ciklodekstrin koji zbog svoje jedinstvene strukture, nalik krnjem stošcu, može stvarati inkluzijske komplekse s lijekovima, što je dobro opisano u postojećoj znanstvenoj literaturi. Tijekom nastanka kompleksa, male hidrofobne molekule lijeka poprimaju ulogu „gosta“ i ulaze u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina, dok hidrofilna površina ostaje izložena vodi. Zbog toga se hidrofobni lijek bolje otapa, a budući da molekule lijeka u kompleksu nisu kovalentno vezane, već se nalaze u ravnoteži sa slobodnim molekulama u vodi, omogućeno je i brže oslobađanje u trenutku kad se lijek aktivira. Struktura takvih inkluzijskih kompleksa istraživana je spektroskopijom NMR. Potpunom asignacijom ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQCe te COSY NMR spektara dobiveni su protonski i ugljikovi kemijski pomaci slobodne molekule nabumetona i molekule lijeka u kompleksu s β -ciklodekstrinom. Usporedbom očitanih kemijskih pomaka za obje vrste dobivene su informacije o načinu nastajanja kompleksa. Uz njih, NOESY i ROESY NMR spektri dali su podatke o isturenim protonima nabumetona i β -ciklodekstrina koji su dovoljno blizu jedni drugima da ostvaruju intermolekulske interakcije. Na kraju, DOSY metodom određeni su difuzijski koeficijenti svih vrsta u smjesi pomoću kojih je izračunat postotak kompleksacije.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nabumeton

Nabumeton je nesteroidni protuupalni lijek (NSAID) iz klase 2,6-disupstituiranih naftilalkanona. Nakon primjene, djeluje kao prolijek što znači da se u jetri metabolizira u aktivni metabolit 6-metoksi-2-naftiloctenu kiselinu (6-MNA). 6-MNA djeluje kao selektivni inhibitor ciklooksigenaze-2. Ciklooksigenaze su važna obitelj enzima koja sudjeluje u pokretanju upalnog odgovora organizma. Njihov mehanizam djelovanja sastoji se od pretvorbe arahidonske kiseline u prostaglandine koji imaju glavnu ulogu u pokretanju upalnih procesa u organizmu tako da pojačavaju osjetljivost dijelova perifernog živčanog sustava odgovornih za osjet boli.¹ Svi nesteroidni protuupalni lijekovi imaju isti mehanizam djelovanja, a to je inhibicija ciklooksigenaza.

Nabumeton se u klinici uglavnom koristi za liječenje pacijenata s osteoartritisom ili reumatoidnim artritisom za smanjenje boli i upale,² pri čemu primarno djeluje na smanjenje boli, oteklina i zakočenosti zglobova. Također, razni testovi na životinjama pokazali su da nabumeton djeluje i kao snažan antipiretik, iako primarno nije razvijen u tu svrhu.¹



Slika 1. Strukturna formula i brojanje atoma nabumetona

Kada se nabumeton primijeni oralno, on se gotovo potpuno metabolizira u jetri pri čemu nastaje nekoliko metabolita pomoću tri povezana metabolička puta: *O* – demetilacije, redukcije ketona do alkohola i oksidacijskog cijepanja bočnog lanca koje dovodi do nastanka derivata octene kiseline. Metabolit od najveće važnosti, 6-MNA, zadužen je za farmakološku aktivnost nabumetona koja uključuje inhibiciju djelovanja ciklooksigenaza. 6-MNA nastaje kao produkt reakcije oksidacijskog cijepanja bočnog lanca molekule nabumetona. Dodatni metaboliti nastaju reakcijama demetilacije i redukcije ketona u alkohol. Aktivan metabolit, 6-

MNA, dalje se može metabolizirati do demetil-6-MNA koji kao i ostali dodatni metaboliti, u usporedbi sa 6-MNA, imaju minimalni farmakološki učinak.⁶ Prema tome, primarni spoj, nabumeton, može se smatrati proljekom do nastanka 6-MNA.^{1,2}

Desetogodišnja klinička ispitivanja pokazala su da se nabumeton općenito dobro podnosi, a od mogućih nuspojava može uzrokovati sve one koje se općenito javljaju kod inhibicije ciklooksigenaze-2, kao što su proljev, glavobolja, mučnina i bolovi u trbuhu. U kombinaciji s drugim inhibitorima ciklooksigenaze-2 može doći do povećanog rizika od perforacija, ulceracija i krvarenja gastrointestinalnog trakta. Osim navedenih nuspojava, ne postoje dodatna klinička ispitivanja koja su pokazala mogućnost pojave ozbiljnijih komplikacija.²

Iako se nabumeton pokazao kao izrazito djelotvoran analgetik, njegov glavni nedostatak je slaba topljivost u vodi. Nabumeton je izrazito topljiv u lipidima i organskim spojevima dok mu njegova slaba topljivost u vodi značajno smanjuje bioraspoloživost i brzinu djelovanja nakon primjene. Poboljšanje topljivosti može se postići kompleksacijom s ciklodekstrinima, kao što je primjerice β -ciklodekstrin. Literaturnim pregledom otkriveno je da je nastanak kompleksa nabumetona i raznih ciklodekstrina već ranije proučavan te je nastanak kompleksa dokazan raznim tehnikama, uključujući i spektroskopiju NMR.^{4,5}

2.2. Ciklodekstrini

2.2.1. Povijest i karakteristike

Ciklodekstrine je prvi opisao A. Villiers 1891. godine proučavajući bakterijsku razgradnju škroba. Eksperimentalni podaci su pokazali da je otkriveni spoj prema kemijskoj strukturi dekstrin, a Villiers mu je dao ime celulozin.⁶ Temelje kemije ciklodekstrina postavio je kasnije Franz Schardinger koji je identificirao α - i β -ciklodekstrin, oba izolirana iz krumpirova škroba. Tridesetih godina prošlog stoljeća Freudenberg je identificirao i treći, γ -ciklodekstrin, te pokazao da mogu postojati i veći ciklodekstrini. Freudenberg i suradnici otkrili su da su ciklodekstrini ciklički oligosaharidi nastali od jedinica glukoze,⁷ a nešto kasnije Cramer i suradnici opisali su njihovu sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa.⁸ 3D struktura ciklodekstrina nalikuje krnjem stošcu koji u svoju šupljinu može inkluzijom primiti neku manju molekulu, na primjer, neki lijek. Do početka 1950-ih otkrivene su osnovne fizikalno-kemijske karakteristike ciklodekstrina, uključujući njihovu sposobnost poboljšanja

topljivosti i stabilnosti lijekova upravo kroz stvaranje takvih, inkluzijskih kompleksa. Međutim, ciklodekstrini koji su bili prikladni za farmaceutsku primjenu postali su dostupni tek 25 godina kasnije, a prvi farmaceutski proizvod koji sadrži ciklodekstrin bio je prostaglandin E2/ β -CD. Ovaj proizvod bio je patentiran u Japanu, nakon čega su se proizvodi koji sadrže ciklodekstrin pojavili i na europskom tržištu. Trenutno u svijetu postoji 35 različitih lijekova baziranih na kompleksima s ciklodekstrinima.¹⁰ Nove tehnologije temeljene na upotrebi ciklodekstrina se neprestano razvijaju, pa se čak i 100 godina nakon njihova otkrića oni i dalje smatraju novim pomoćnim tvarima neistraženih mogućnosti.

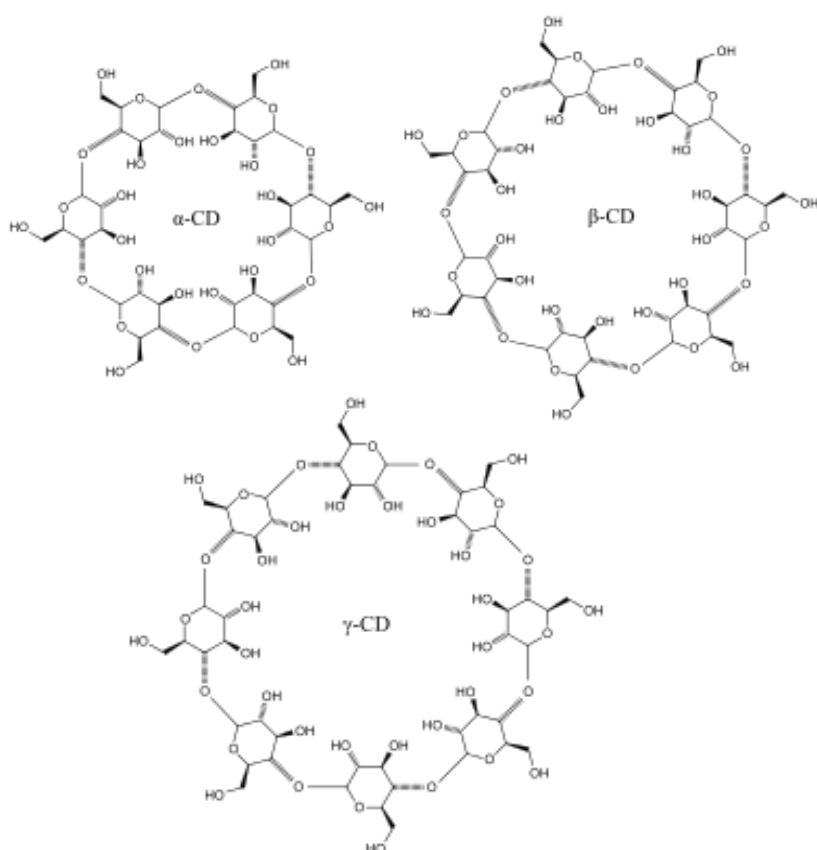
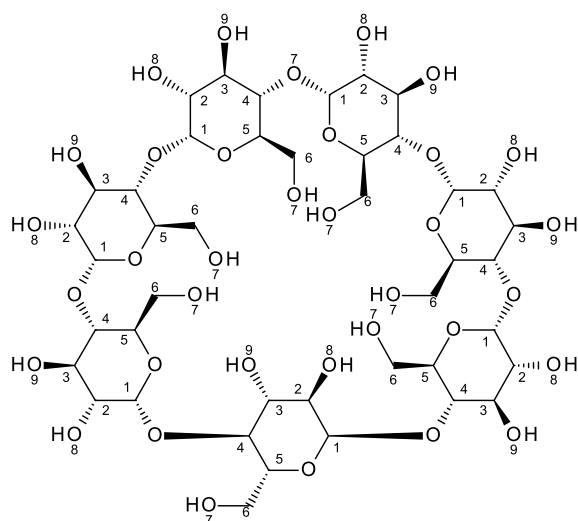
Od samog početka ovi organski spojevi jedinstvene kemijske strukture bili su predmet brojnih istraživanja od kojih je najveći dio usmjeren na njihovu upotrebu u farmaceutskoj industriji. Prirodni ciklodekstrini i njihovi derivati danas imaju široku primjenu kao pomoćne tvari koje povećavaju topljivost lijekova slabo topivih u vodi. Na taj način, povećavaju količinu spoja koji prolazi kroz biološke membrane, što izravno utječe na njihovu bioraspodjivu, a time neizravno i na aktivnost.

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji se sastoje od (α -1-4)-povezanih D-glukopiranoznih jedinica. Dobivaju se enzimskom razgradnjom škroba. Tri su tipa CD-a koji se koriste u farmaceutskim proizvodima; α -CD, β -CD i γ -CD. Međusobno se razlikuju po broju glukopiranoznih jedinica te po stupnju topljivosti. α -CD se sastoji od 6, β -CD od 7, a γ -CD od 8 glukopiranoznih jedinica.¹¹ U tablici 1 prikazana je razlika između navedena tri prirodna CD-a.

Tablica 1. Usporedba karakteristika α -, β - i γ -ciklodekstrina¹³

| Vrsta ciklodekstrina | Promjer šupljine/Å | Molekularna masa | Topljivost (g mL ⁻¹) |
|----------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|
| α -CD | 4,7-5,3 | 972 | 0,145 |
| β -CD | 6,0-6,5 | 1135 | 0,019 |
| γ -CD | 7,5-8,3 | 1297 | 0,232 |

Ciklodekstrini s manje od 6 jedinica ne postoje zbog steričkog ometanja. Oni s većim brojem jedinica postoje, ali je njihov nedostatak komplicirana proizvodnja i ograničena mogućnost stvaranja inkluzijskih kompleksa. U farmaceutskoj industriji najviše se koristi upravo β -CD zbog prikladnog promjera šupljine za najveći raspon lijekova, pristupačne cijene, te velike dostupnosti. Kao njegov nedostatak izdvaja se niža topljivost u odnosu na ostale CD-ove (tablica 1). Zbog ograničene topljivosti može doći do taloženja čvrstih kompleksa iz vodene otopine te se zbog toga češće koriste njegovi derivati. Smatra se da je ta pojava posljedica snažnih intramolekulskih vodikovih veza u kristalnoj rešetci. Supstitucijom bilo koje od hidroksilnih skupina značajno se poboljšava topljivost CD-a. Neki od najčešće korištenih derivata su hidroksipropilirani CD-derivati (npr. HP- β -CD, HP- γ -CD), koji se dobivaju tretiranjem prirodnih CD-ova propilen oksidom te karboksimetilirani CD-derivati (npr. CM- β -CD) koji se dobivaju reakcijom s monokloroocetnom kiselinom.¹² Na slikama 2 i 3 prikazane su strukturne formule najpoznatijih CD-a. Budući da se sastoje od glukopiranoznih jedinica koje imaju konformaciju stolca, oni tvore trodimenzijsku strukturu koja nalikuje krnjem stošcu ili nesavršenom cilindru. Hidroksilne skupine glukopiranoznih jedinica usmjerene su prema vanjskoj strani stošca, pri čemu su na uskom rubu stošca većinom primarne, dok se na širokom rubu nalaze sekundarne hidroksilne skupine. Unutrašnjost šupljine obložena je ugljikima koji tvore kostur molekule što joj daje relativno lipofilan karakter. Drugim riječima, šupljina CD-a predstavlja vrlo povoljnu okolinu za netopive hidrofobne lijekove, dok hidroksilne skupine s vanjske strane CD-a tvore vodikove veze s okolnim molekulama vode, što rezultira hidratantnom ljuskom oko otopljene molekule CD-a.¹¹

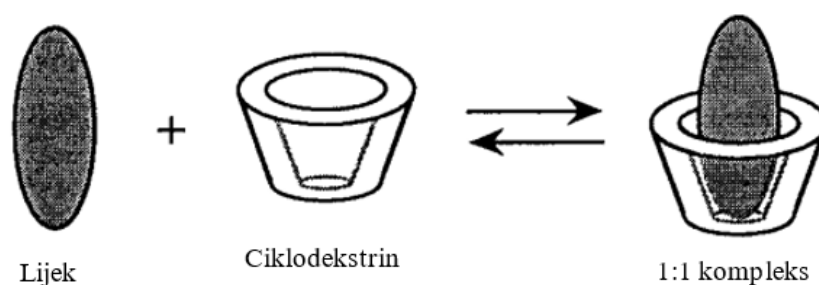
Slika 2. Strukturne formule α -CD-a, β -CD-a i γ -CD-a¹⁴Slika 3. Strukturna formula i brojanje atoma u β -CD-u

Ciklodekstrini su podobni za oralnu primjenu lijekova, između ostalog, i zbog svoje otpornosti na amilaze. Amilaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu škroba u šećere, a dijele se na α - i β -amilaze. Ciklodekstrini su otporni na djelovanje β -amilaza u potpunosti, dok ih α -amilaze uspijevaju hidrolizirati, ali puno sporije. Ljudska α -amilaza, prisutna u slini i u nekim drugim tjelesnim tekućinama, lako hidrolizira linearne dekstrine, no ciklička struktura i supstituenti na CD-ovima usporavaju njihovu hidrolizu ovim enzimom. CD-ovi koji se ne probave ljudskom α -amilazom probavljaju se u donjim dijelovima gastrointestinalnog trakta djelovanjem bakterija.^{15,16}

2.2.2. Kompleksi ciklodekstrina

Danas je poznato da ciklodekstrini povećavaju topljivost hidrofobnih lijekova u vodenim otopinama stvaranjem inkluzijskih kompleksa topljivih u vodi. Inkluzijski kompleksi su supramolekulski kompleksi tipa „domaćin-gost“ u kojima se u šupljinu molekule „domaćina“ smješta molekula „gosta“ bez djelovanja kovalentnih interakcija.

Jedinstvena trodimenzijska struktura ciklodekstrina sastoji se od hidrofilne vanjske površine i hidrofobne unutarnje šupljine. Nastanak inkluzijskih kompleksa se temelji na smještaju hidrofobne molekule „gosta“ u hidrofobnoj šupljini ciklodekstrina. U vodenim otopinama kompleksi ciklodekstrina i molekule lijeka nalaze se u dinamičkoj ravnoteži sa slobodnim molekulama lijeka. Ta ravnoteža opisana je brzinama stvaranja i disocijacije kompleksa koje su u blizini granice kontrolirane difuzijom. Zbog toga se kompleksi lijeka i ciklodekstrina kontinuirano stvaraju i disociraju što uzrokuje brzo oslobađanje lijeka iz kompleksa.¹² Ciklodekstrine možemo promatrati i kao prazne kapsule cilindričnog oblika s otvorom na obje strane. Kada se u tu šupljinu smjesti molekula druge tvari, nastaje inkluzijski kompleks.^{11,17} Kompleksacija može izmijeniti i/ili poboljšati fizikalne, kemijske i/ili biološke karakteristike molekule „gosta“. Nastanak inkluzijskog kompleksa ovisi o geometriji molekule „gosta“. Ako je molekula „gosta“ premalena ona ulazi u šupljinu, ali je veza slaba i ne dolazi do kompleksacije. Stvaranje kompleksa s molekulom „gosta“ većom od šupljine je moguće, ali uz ograničenja. Stabilnost kompleksa također ovisi i o polarosti molekule "gosta". Naime, stabilnost kompleksa proporcionalna je hidrofobnom karakteru molekule "gosta", dakle vrlo hidrofilne molekule ne kompleksiraju s ciklodekstrinima. Stella i suradnici su eksperimentalno odredili da je najčešći stehiometrijski odnos između molekule lijeka i CD- a 1:1¹⁹ (slika 4), no moguće je stvoriti i komplekse s različitim omjerima.



Slika 4. Shema ravnotežnog vezanja lijeka i CD-a u kompleks u omjeru 1:1¹⁹

Kao što je već ranije spomenuto, u vodenom mediju, molekule lijeka su u dinamičkoj ravnoteži s molekulama lijeka koje su u inkluzijskom kompleksu s ciklodekstrinom. Moguće je i stvaranje neinkluzijskih kompleksa lijeka i CD-a. U tom slučaju hidroksilne skupine na vanjskoj površini molekule CD-a tvore vodikove veze s lijekom. Često nastaju smjese inkluzijskih i neinkluzijskih kompleksa,¹¹ no oni koji uključuju inkluziju tipa „gost/domaćin“ ipak su češći od neinkluzijskih.

Konstanta kompleksacije, $K_{1:1}$, može se zapisati jednadžbom (1) gdje $[\text{Lijek}]_{\text{kompleks}}$ predstavlja koncentraciju lijeka u kompleksu, $[\text{Lijek}]_{\text{slobodan}}$ predstavlja koncentraciju slobodnog lijeka, a $[\text{CD}]_{\text{slobodan}}$ predstavlja koncentraciju slobodnog CD-a:

$$K_{1:1} = \frac{[\text{Lijek}]_{\text{kompleks}}}{[\text{Lijek}]_{\text{slobodan}}[\text{CD}]_{\text{slobodan}}} \quad (1)$$

U radu Stelle i suradnika iz 1999. eksperimentalno su određene vrijednosti konstanti brzine asocijacije i disocijacije lijeka s njegovom biološkom metom u rasponu od 10^7 do 10^8 L mol⁻¹ s⁻¹ neovisno o vrijednosti konstante $K_{1:1}$ ¹⁸ dok su normalne vrijednosti, konstanti brzine za lipofilne i slabo topljive lijekove, obično između 10^2 i 10^3 L mol⁻¹ s⁻¹. Iz toga se zaključuje koliko kompleksacija lijekova s ciklodekstrinima povećava njihovu topljivost i brzinu djelovanja. Uz to, zbog ravnoteže slobodnog lijeka i onog koji je u kompleksu, čim započne proces vezanja slobodnog lijeka iz otopine u aktivno mjesto njegove biološke mete (npr. proteina), dodatno se pojačava oslobađanje lijeka iz kompleksa.¹⁸ Budući da su u kompleksu, a ne vezani kovalentnim vezama, lijekovi se brzo i kvantitativno oslobađaju iz CD kompleksa nakon parenteralne i oralne primjene.

Ne stvaraju svi lijekovi jednako učinkovito komplekse s ciklodekstrinima. No, učinkovitost kompleksacije može se povećati različitim metodama koje uključuju: dodatak

polimera u medij za kompleksiranje, ionizaciju lijeka i stvaranje soli, dodatak hidrosikarboksilnih kiselina u medij za kompleksiranje, dodatak hlapljivih baza ili kiselina u medij za kompleksiranje te dodatak organskih kiselina ili aminokiselina. Također je poznato da polimeri topljivi u vodi stvaraju komplekse s raznim spojevima, stabiliziraju micide, te druge vrste agregata u vodenim otopinama.¹¹ Jednako tako, polimeri mogu solubilizirati i β -CD i njegove komplekse.

Jedan od načina ispitivanja inkluzijskih kompleksa predstavlja i spektroskopija NMR koja daje kvalitativne i kvantitativne podatke o kompleksu, pružajući ne samo odgovor na pitanje je li došlo do stvaranja inkluzijskog kompleksa, već i uvid u mehanizam kompleksacije. Više riječi o samoj spektroskopiji NMR bit će u poglavlju 2.3. Ono što je literaturno poznato jest da se vodici vezani za 3-C i 5-C (dakle, 3-H i 5-H, slika 3) prostorno nalaze u unutrašnjosti šupljine β -ciklodekstrina te bi njihovi signali u spektru trebali pokazati neku promjenu ukoliko je došlo do nastajanja inkluzijskog kompleksa s lijekom. Na vanjske protone (1-H, 2-H i 4-H) kompleksacija ne bi trebala imati učinak,¹¹ osim ukoliko je došlo do stvaranja kompleksa koji ne uključuje inkluziju.

2.2.3. Upotreba ciklodekstrina

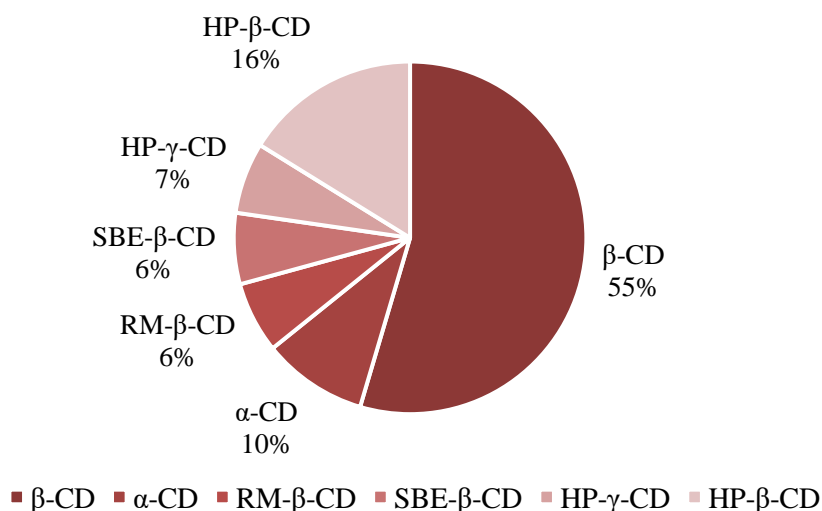
Stvaranje kompleksa povećava bioraspoloživost lijekova ne samo povećavanjem topljivosti, već i propusnosti kroz biološke membrane. Zbog toga je na ovaj način moguće i smanjiti dozu potrebnu za terapijsku aktivnost lijeka, što kao izravnu posljedicu ima smanjenje toksičnosti lijeka.¹⁹ Uz to, kada je molekula lijeka smještena u hidrofobnoj šupljini CD-a ona nije u izravnom dodiru s biološkim sustavima za vrijeme transporta, te su smanjene nuspojave uzrokovane lijekom. Na kraju, molekula lijeka je u šupljini CD-a zaštićena i izolirana od raznih procesa razgradnje, čime kompleksi izravno djeluju i na poboljšanje stabilnosti labilnih lijekova, što produljuje rok trajanja.²⁰ Stupanj stabilizacije lijeka ovisi o vrijednosti konstante asocijacije koja određuje omjer kompleksirane i slobodne molekule „gosta“. Što je ta vrijednost veća, zaštita od kemijskih promjena je veća jer je količina slobodnog lijeka u vodenoj otopini manja.

Vrlo zanimljiva činjenica je da je interakcija okusnih pupoljaka na ljudskom jeziku i mirisnim osjetnicima u nosu ograničena kad je lijek u kompleksu s ciklodekstrinom. U vodenoj otopini lijeka i CD-a samo slobodne molekule lijeka mogu izazvati osjećaj okusa i mirisa, dok molekule u kompleksu nemaju učinak na ova osjetila. Dakle, ciklodekstrini se, u

farmaceutskoj industriji, mogu koristiti i kao pomoćne tvari za prikrivanje neugodnog okusa i/ili mirisa.²⁰

Zbog svih prethodno navedenih razloga, te izuzetno zanimljive kemijske strukture, inkapsulacija lijekova CD-ovima je danas sve više privlačna raznim industrijama, a najviše farmaciji i medicini. Koristeći formulaciju ciklodekstrina, omogućena je primjena lijekova oralno, sublingvalno, očno, rektalno, nazalno, plućno i dermalno.

β -CD je danas u širokoj primjeni kao pomoćna tvar i kao dodatak vezivu za punilo tableta. Već 1972. godine objavljeno je da se korištenjem kompleksa mogu pripremiti tvrde tablete s glatkom površinom, čak i bez dodatka ostalih aditiva. U većini ispitanih slučajeva, dobivene tablete su stabilne i nakon dugotrajnog skladištenja, na povišenoj temperaturi i prilikom izlaganja relativnoj vlažnosti, dok se u vodi vrlo brzo raspadaju, lijek se oslobađa i u kratkom vremenu počinje njegovo djelovanje.²¹ Budući da su β -CD-i otporni na djelovanje amilaze iz sline i na djelovanje kisele hidrolize, kompleksi se smatraju otpornim na enzimsku razgradnju i hidrolizu.



Slika 5. Prikaz primjene CD-a i njihovih derivata u medicini u postocima.²²

Nije iznenađenje da, osim u farmaceutskoj industriji, upotreba β -CD-a raste i u prehrambenoj industriji. Tamo se koristi za poboljšanje okusa i mirisa kod proizvodnje gotovih proizvoda. Otkriveno je da ciklodekstrini mogu kompleksirati molekule kolesterola i tako smanjiti njegov udio u hrani. Danas se na taj način mogu proizvesti maslac i jaja s niskim razinama kolesterola. Još jedna prednost za prehrambenu industriju je da su CD-ovi saharidi

bez okusa i mirisa, te da imaju antidijabetički učinak zbog niskog glikemijskog indeksa.²³ Ljudski gastrointestinalni enzimi ih ne mogu probaviti, pa se mogu koristiti kao dijetalno vlakno koje fermentira mikroflora, što ih čini prebiotičkim spojevima.

I u kozmetičkoj industriji postoje određeni zahtjevi za dobrom biološkom aktivnosti funkcionalnih sastojaka u proizvodima, pa se CD-ovi često koriste za stabilizaciju tvari ili poboljšanje njihove topljivosti istovjetno upotrebi u farmaceutske svrhe.

CD-derivati se koriste i u proizvodnji fotografskih emulzija, dijagnostičkim pripravcima i kod različitih načina odvajanja tvari kromatografijom. Insekticidi na bazi piretroida osjetljivi su na svjetlost te se stabiliziraju kompleksacijom s CD-ovima. Broj objavljenih patenata i patentnih prijava, do 1993., procjenjuje se preko 700.^{21,23}

2.3. Osnove spektroskopije NMR

Tijekom proteklih pedesetak godina spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) postala je jedna od najmoćnijih tehnika za identifikaciju i određivanje strukture organskih spojeva. W. Pauli je 1924. prvi postavio temelje za spektroskopiju NMR pretpostavivši da neke jezgre imaju svojstvo spina i magnetnog momenta, te da će se, kao posljedica tih svojstava, njihove energijske razine pocijepati u prisustvu vanjskog magnetskog polja. Njegovu su pretpostavku 22 godine kasnije dokazali znanstvenici Bloch i Purcell koji su za svoje otkriće podijelili Nobelovu nagradu za kemiju neovisno jedan o drugome.²⁵

2.3.1. Jezgre

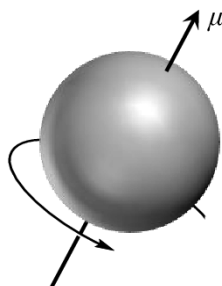
Spektroskopija NMR temeljena je na apsorpciji energije u području radio-valova (10^2 - 10^5 m valne duljine) u kojem spinovi jezgara atoma mogu prijeći s jedne energijske razine na drugu. Pomoću spektroskopije NMR mogu se detektirati jezgre čiji je spin različit od nule odnosno one koje sadrže neparan broj protona. Najčešće korištene jezgre koje zadovoljavaju navedene uvjete su ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Jezgra ^1H , uz to što je prisutna u svim organskim spojevima, ima izrazito povoljne magnetske karakteristike, kao što su veliki magnetni moment (μ), kvantni broj nuklearnog spina ($I = 1/2$) i visoku zastupljenost u prirodi (99,98 %). S druge strane, NMR aktivna jezgra ^{13}C ima nedostatke zbog male prirodne zastupljenosti (1,1 %) i malog magnetnog momenta ($1/4$ momenta ^1H), no njih je moguće prevladati korištenjem

pulsnih sljedova dizajniranih za pojačanje osjetljivosti kroz prijenos magnetizacije te Fourierovih transformacija.

Svaka jezgra može se opisati dvama kvantnim brojevima. Prvi je kvantni broj nuklearnog spina, I , čija vrijednost može biti veća ili jednaka nuli, te djeljiva s $1/2$ (npr. $0, 1/2, 1, 3/2, \dots$). Ako kvantni broj nuklearnog spina iznosi 0 ($I = 0$) jezgra nema nuklearni spin, te se za nju ne mogu dobiti podaci spektroskopijom NMR.²⁶ Drugi kvantni broj je nuklearni magnetski spinski kvantni broj, m_I , koji govori o spinskoj orijentaciji u magnetskom polju. Nadalje, svaka jezgra se može opisati magnetnim momentom (μ) koji je definiran jednačbom 2:

$$\mu = \gamma P \quad (2)$$

u kojoj P označava kutnu količinu gibanja koja ovisi o kvantnom broju nuklearnog spina, a γ označava magnetožirni omjer koji je konstanta za određenu jezgru. Kutna količina gibanja i magnetni moment su vektorske veličine, što govori da imaju i veličinu i smjer (slika 6).

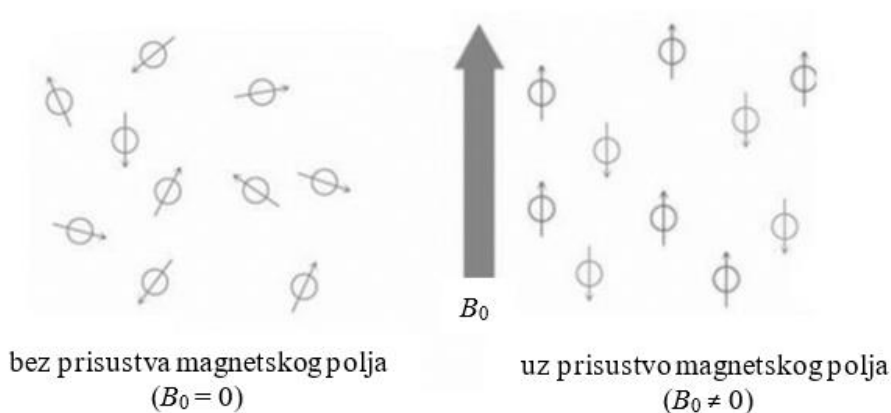


Slika 6. Shematski prikaz spina jezgre²⁵

2.3.2. Statično vanjsko magnetsko polje

Svaka jezgra generira malo magnetsko polje (B), što je direktna posljedica nuklearnog spina. Kada dođu pod utjecaj vanjskog statičnog magnetskog polja, za jezgre spina I kažemo da mogu poprimiti $2I + 1$ različitih orijentacija u tom magnetskom polju. Prema tome, za jezgre s $I = 1/2$ postoje dvije moguće orijentacije ($+1/2$ i $-1/2$), odnosno one u magnetskom polju mogu biti paralelne (α -spin) ili antiparalelne (β -spin) s vanjskim magnetskim poljem. Bez prisustva vanjskog magnetskog polja ($B_0 = 0$) sve jezgre su orijentirane u svim mogućim smjerovima te su njihovi energijski nivoi degenerirani, što znači da imaju jednake energije. Kada takve jezgre podlegnu djelovanju nekog vanjskog magnetskog polja ($B_0 \neq 0$) degeneracija se gubi. Jezgre se orijentiraju u dvije moguće orijentacije – u smjeru ili nasuprot

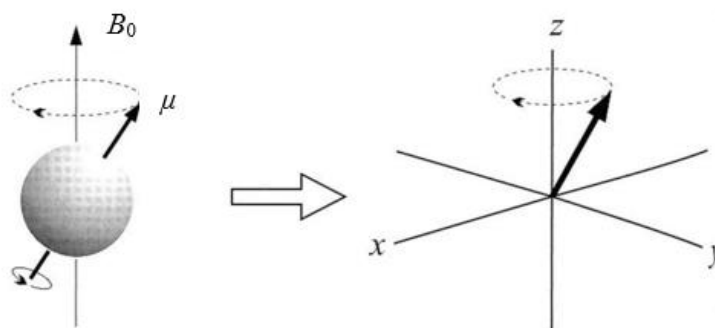
smjera magnetskog polja (α - ili β -spin). Na slici 7 prikazane su orijentacije jezgara ovisno o prisustvu magnetskog polja.



Slika 7. Shematski prikaz orijentacije jezgara ovisno o prisustvu magnetskog polja²⁸

2.3.3. Rezonancija

Razlika u energijama između dvije potencijalne orijentacije (ΔE) proporcionalna je jačini primijenjenog magnetskog polja (B_0). B_0 je vektor koji prema dogovoru ima smjer osi z . Do rezonancije može doći kada je energijska razlika između jezgara na višoj i nižoj razini istovjetna energiji radiofrekventnog zračenja koje se emitira u sustav. Rezonancijom jezgre na nižoj energijskoj razini apsorbiraju energiju radiofrekvencijskog zračenja i time “okreću svoje spinove” (engl. “*flip of spins*”) čime prelaze u višu energijsku razinu. Ukratko, kada se na jezgre djeluje dodatnim vanjskim magnetskim poljem (B_0) one se usmjeravaju ovisno o vrijednosti kvantnog broja I , gubi se degeneracija, a magnetni momenti jezgri počinju rotirati u smjeru polja. Taj proces nazivamo precesija na Larmorovoj frekvenciji (slika 8).



Slika 8. Magnetsko polje primijenjeno na jezgru uzrokuje precesiju. Smjer magnetskog polja je prema dogovoru u smjeru z -osi Kartezijeva koordinatnog sustava²⁹

Larmorova frekvencija se izračunava jednadžbom 3:

$$\nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (3)$$

Smjer i kretanje magnetožirnog omjera, γ , može biti u smjeru kazaljke na satu ili obrnuto od smjera kazaljke na satu, ali je uvijek konstantan za određenu jezgru. Do apsorpcije zračenja, odnosno rezonancije, dolazi kada je frekvencija elektromagnetskog zračenja (ν) jednaka Larmorovoj frekvenciji (ν_L):

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (4)$$

gdje je h Planckova konstanta.

Samo jezgre koje su u nižem energetsom stanju mogu rezonancijom prijeći u više energetske stanje. Koliko jezgara se nalazi u nižem, a koliko u višem energetsom stanju može se izračunati iz jednadžbe za Boltzmannovu raspodjelu:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E/RT} \quad (5)$$

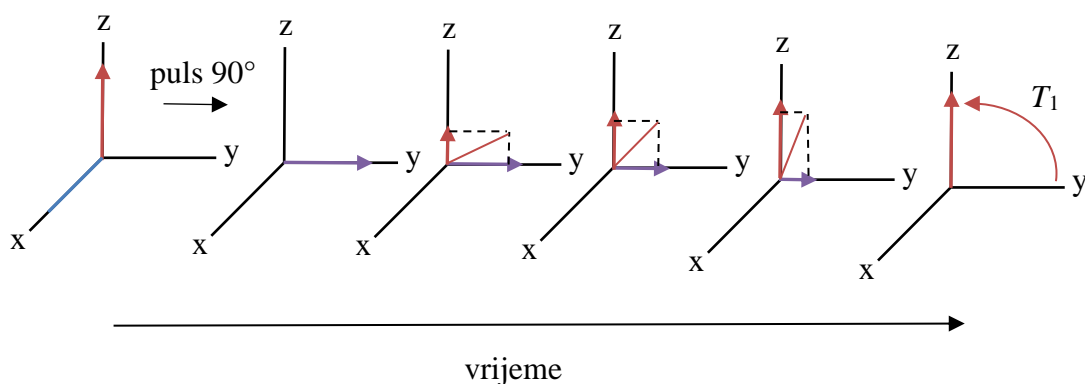
u kojoj N_α i N_β predstavljaju broj jezgara u određenoj spinskoj orijentaciji, R predstavlja opću plinsku konstantu, a T predstavlja temperaturu.²⁶

2.3.4. Relaksacija

Nakon pobuđivanja jezgara elektromagnetskim zračenjem frekvencije koja odgovara Larmorovoj frekvenciji, dolazi do spontanog vraćanja sustava u početno stanje. Za vrijeme tog procesa generiraju se parametri analizom kojih je moguće dobiti informaciju o magnetskoj okolini jezgre, odnosno molekulskej strukturi spoja kojeg promatramo.

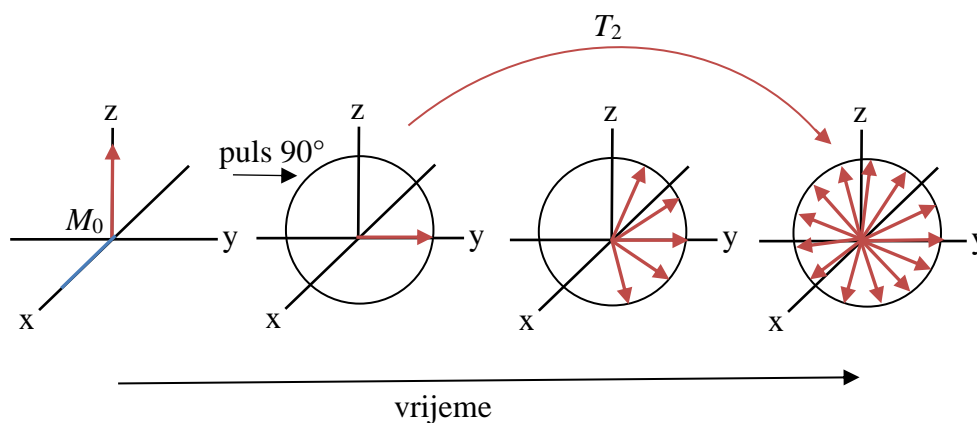
Kao važni parametri spektara NMR izdvojeni su: vrijeme opuštanja ili relaksacije, kemijski pomak i konstanta sprezanja. Vrijeme opuštanja ili relaksacije je period u kojem se spinovi iz pobuđenog stanja vraćaju u osnovno. Postoje dvije vrste relaksacije spinova. Prvo je longitudinalno opuštanje ili opuštanje spin-rešetka do kojeg dolazi zbog interakcije promatrane jezgre s okolinom. Pri tome se energija prelaska iz višeg u niže energijsko stanje

pretvara u termalne vibracije ili rotacije okoline. Ovaj proces prvog reda karakterizira se vremenom opuštanja ili relaksacije T_1 pri čemu se ukupna magnetizacija M vraća na os z .



Slika 9. Shematski prikaz vektora ukupne magnetizacije M tijekom procesa longitudinalne relaksacije

Drugi način opuštanja ili relaksacije je transverzalno opuštanje ili opuštanje spin-spin do kojeg dolazi interakcijom između susjednih jezgri. Pri tome dolazi do izmjene kvantnih stanja te dvije jezgre. Karakterizira se vremenom opuštanja ili relaksacije T_2 .



Slika 10. Shematski prikaz vektora ukupne magnetizacije M tijekom procesa transverzalne relaksacije

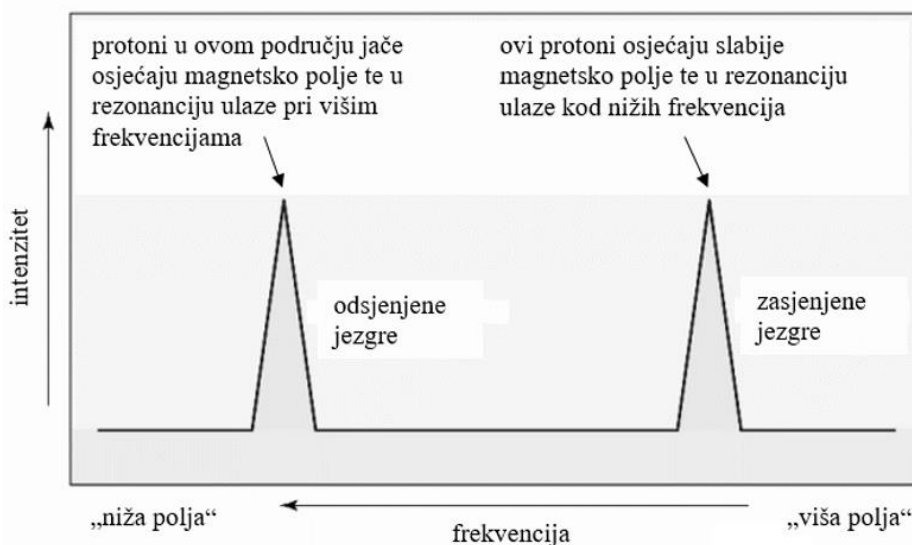
T_1 utječe na intenzitet pojedinih signala, a T_2 je obrnuto proporcionalno širini signala u spektru.

Kemijski pomak jezgre označava udaljenost NMR signala pojedine jezgre od referentnog. Kemijski pomak δ_i jezgre i definira se kao razlika frekvencija proučavanog (ν_i) i

referentnog signala (ν_{ref}) podijeljena frekvencijom vanjskog magnetskog polja (ν_0)²⁶, a izražava se jedinicom ppm (engl. *parts per milion* – dijelovi na milijun):

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

Može se reći da je kemijski pomak jezgre funkcija elektronske gustoće oko nje. On je zapravo posljedica činjenice da na jezgre ne djeluje samo vanjsko magnetsko polje B_0 , već i individualno magnetsko polje B_i , koje je posljedica superpozicije polja B_0 i lokalnog magnetskog polja, B_{ind} , induciranog gibanjem elektrona oko jezgre suprotnog smjera od B_0 . Upravo zbog ovih razloga kemijski pomaci ovise o konfiguracijskim i konformacijskim obilježjima molekule.³⁰ U slučaju male gustoće elektrona u okolini neke jezgre, govorimo o nezasjenjenoj jezgri kojoj treba visoka frekvencija da bi došlo do rezonancije, pa se takva jezgra nalazi u području slabog magnetskog polja. Naprotiv, jezgrama koje u svojoj magnetskoj okolini imaju veliku elektronsku gustoću za rezonanciju je potrebno zračenje niskih frekvencija, odnosno jako magnetsko polje (slika 11).



Slika 11. Dijagram ovisnosti magnetskog zasjenjenja elektronima

Konstante sprezanja (J) izražavaju se u hertzima (Hz) te opisuju interakcije spin-spin koje opažamo u izotropnom mediju. Sprega spin-spin između istovrsnih jezgara (npr. $^1\text{H} - ^1\text{H}$) je homonuklearna sprega, dok se sprega između raznovrsnih jezgara (npr. $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) naziva

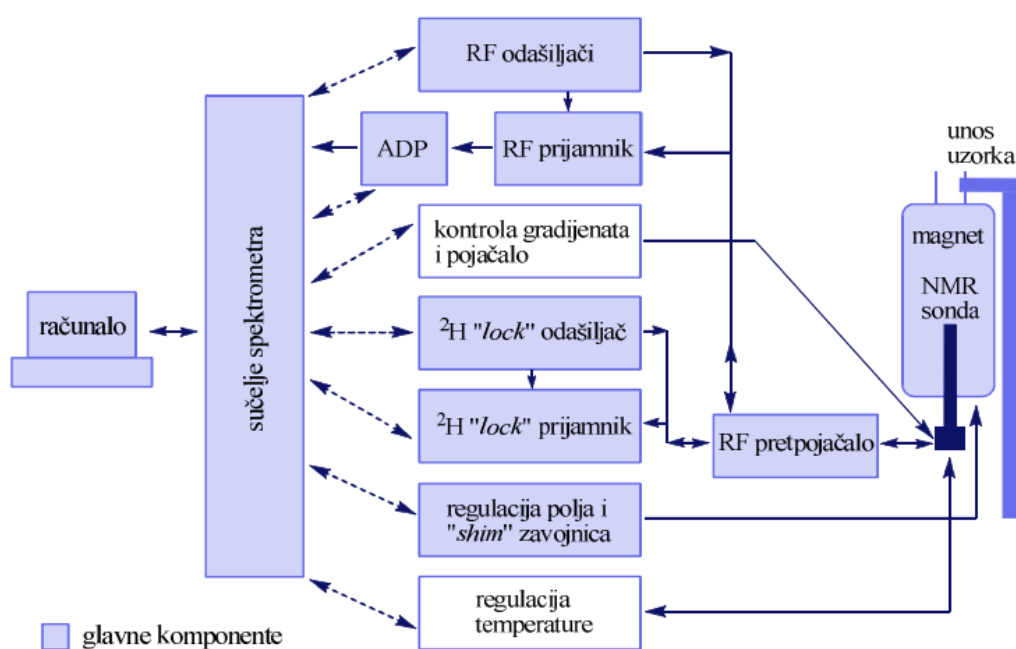
heteronuklearnom spregom. NMR signal promatrane jezgre se zbog sprezanja sa susjednom jezgrom cijepa u multiplet prema pravilu $2nI+1$, pri čemu je n broj susjednih jezgara, a I spinski kvantni broj jezgre u sprezi. Multipletom signala nazivamo broj pikova u pojedinom signalu. Spregnuti protoni se međusobno cijepaju. Cijepanje signala je uzrokovano spin-spin sprežanjem i javlja se kada su različiti protoni jedan blizu drugoga. Multipletnost pojedinih signala i omjer njihovih intenziteta prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Multipletnosti pojedinih signala i omjer njihovih intenziteta

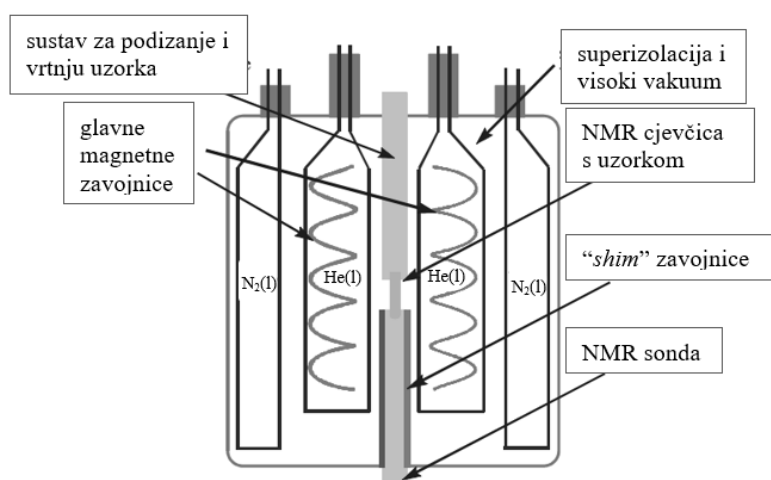
| Broj signala | Omjer intenziteta signala |
|--------------|---------------------------|
| 1 (singlet) | 1 |
| 2 (dublet) | 1:1 |
| 3 (triplet) | 1:2:1 |
| 4 (kvartet) | 1:3:3:1 |
| 5 (kvintet) | 1:4:6:4:1 |
| 6 (sektet) | 1:5:10:10:5:1 |

2.3.5. Spektrometar NMR

Osnovni dijelovi spektrometra NMR (slika 12) su statično homogeno magnetsko polje (supravodljivi magnet), NMR proba u kojoj se nalaze zavojnice za generiranje i primanje radiofrekvencijskih signala, elektronika koja upravlja podešavanjem instrumenta i snimanjem spektara, te računalo na kojem se provodi obrada podataka. Supravodljivi magnet sastavljen je od dvije odvojene posude. U unutarnjoj posudi nalaze se zavojnice kroz koje se prolaskom struje generira magnetsko polje. Kako bi se održali supravodljivi uvjeti, zavojnice su uronjene u tekući helij (pri 4 K). Ta unutarnja posuda uronjena je u vanjsku posudu u kojoj se nalazi tekući dušik (pri 77 K). Cijeli sustav je u vakuumu (slika 13).

Slika 12. Shematski prikaz modernog NMR spektrometra³²

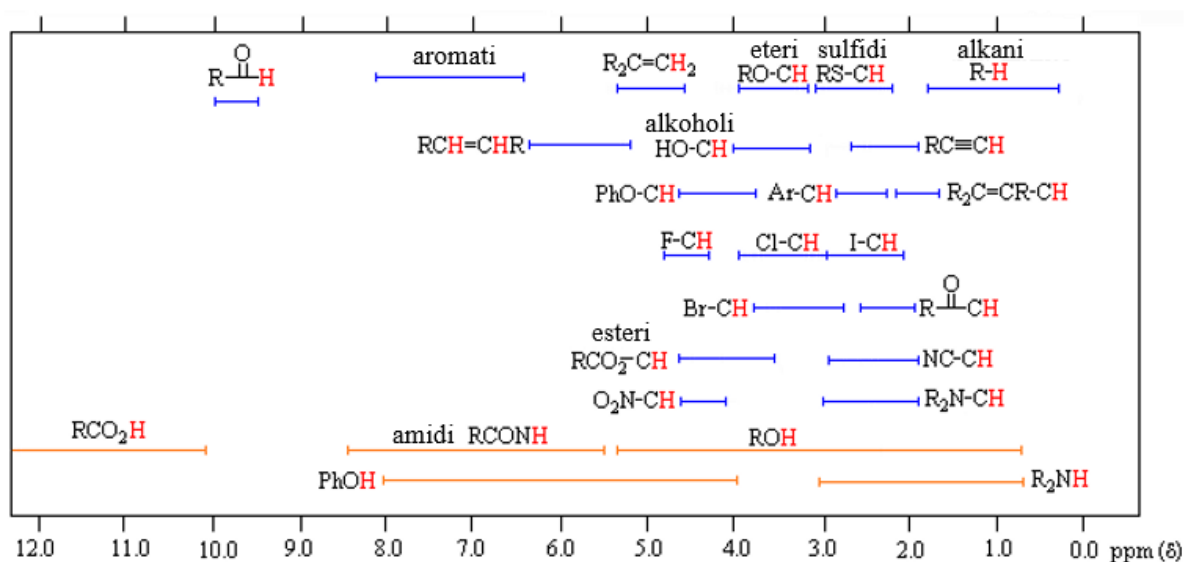
Tijekom eksperimenta potrebno je održavati homogenost i stabilnost magnetskog polja, što se postiže korekcijama pomoću "shim" zavojnica. Unutar "shim" zavojnica, u centru magnetskog polja, nalazi se glava probe u koju se stavlja cjevčica za NMR s otopljenim uzorkom. Glava probe je ujedno i centralni, najbitniji dio instrumenta jer se u njoj nalaze zavojnice za generiranje radiofrekvencijskog signala kojim se vrši pobuda uzorka, te zavojnice koje služe kao radiofrekvencijski prijamnik i primaju signal kojeg jezgre otpuštaju za vrijeme relaksacije. Za podizanje i vrtnju uzorka koristi se struja plinovitog dušika.

Slika 13. Shematski prikaz presjeka unutrašnjosti magneta NMR spektrometra³³

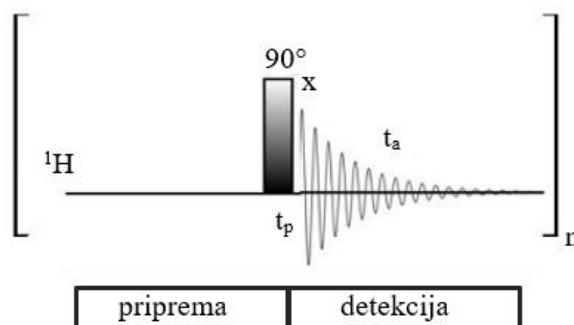
2.3.6. Jednodimenzijske tehnike spektroskopije NMR

Kod jednodimenzijske spektroskopije NMR dobiveni signali su funkcija jednog parametra, obično kemijskog pomaka, jer se spektar NMR može zamisliti kao grafički prikaz apsorpcije radiofrekventnog zračenja (y -os) u odnosu na frekvenciju radiofrekventnog zračenja. Frekvencija i jačina magnetskog polja su međusobno povezane Larmor-ovom jednažbom (3). Na temelju položaja i intenziteta signala u spektru utvrđuje se prisutnost određenih fragmenata i funkcijskih skupina u ispitivanom spoju, jer svaka drugačija funkcijska skupina ima drugačiji utjecaj na magnetsku okolinu jezgre, što se onda vidi u spektru.

Spektar ^1H NMR daje informaciju o strukturi molekule kroz analizu kemijskih pomaka, spin-spin sprezanja i integrala signala. Kao što je spomenuto u poglavlju 2.3.4., kemijski pomak, odnosno položaj signala u spektru direktno odražava koliko je neki proton (jezgra) zasjenjena elektronima. Intenzitet ili, točnije, integral površine ispod pojedinog signala izravno je proporcionalan broju neekvivalentnih protona. Spin-spin sprezanje, koje se očitava iz multiplleta u spektru ^1H NMR daje informaciju koji su protonski „susjedi“ jezgre koju promatramo, ali i pod kojim kutom su ta dva „susjeda“ smještena u prostoru. Na slici 14 je prikazana skala kemijskih pomaka za protone.

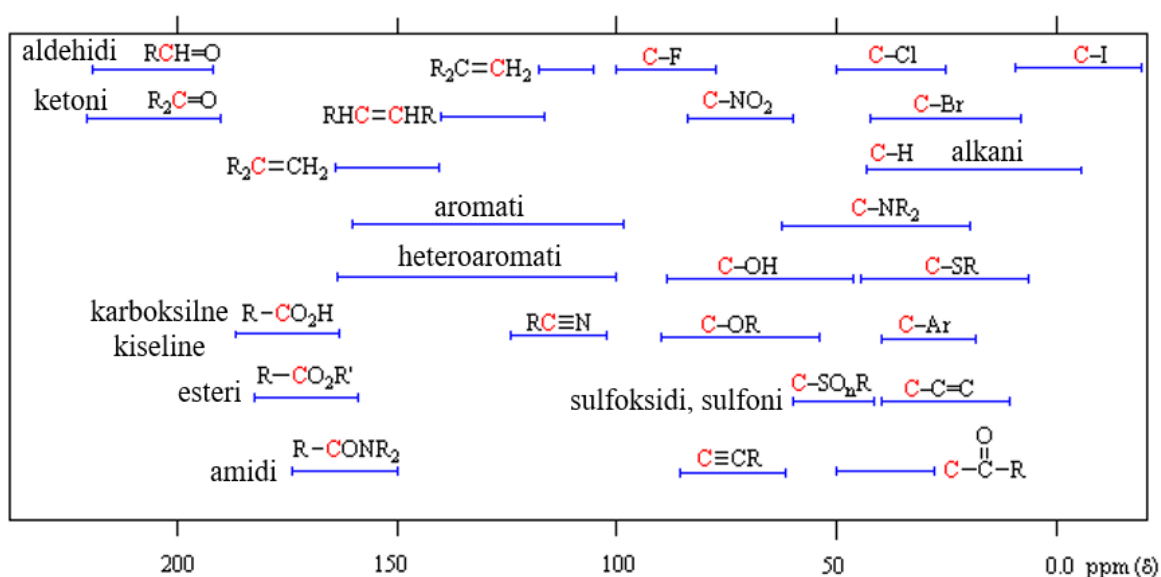
Slika 14. Skala kemijskih pomaka za protone (^1H)³¹

Pulsni slijed koji se koristi za snimanje ^1H NMR spektra (slika 15) dijeli se na dva perioda - priprema i detekcija. Periode odvaja puls od 90° po osi x u trajanju t_p . Slobodno opadanje magnetizacije (engl. *Free Induction Decay* - FID) bilježi se kada za vrijeme akvizicije (t_a) zavojnica prima signal.³⁴



Slika 15. Pulsni slijed tehnike ^1H -NMR³⁴

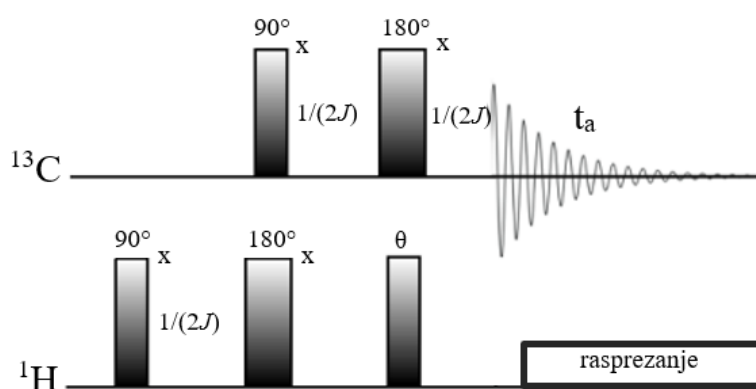
Kod ^{13}C spektarom snimanjem se dobivaju signali neekvivalentnih ugljika u spoju. Broj dobivenih signala odgovara broju različitih vrsta ugljikovih atoma u spoju. ^{13}C jezgra je približno 400 puta manje osjetljiva od ^1H jezgre, a intenzitet ^{13}C signala je oko 6400 puta manji od intenziteta ^1H signala. Zbog male zastupljenosti u prirodi (1,1 %) ne vide se spreznja ^{13}C - ^{13}C . Na kemijski pomak utječu isti faktori kao i u ^1H NMR. Na slici 16 prikazana je skala kemijskih pomaka za ugljike.



Slika 16. Skala kemijskih pomaka za ugljike (^{13}C)³¹

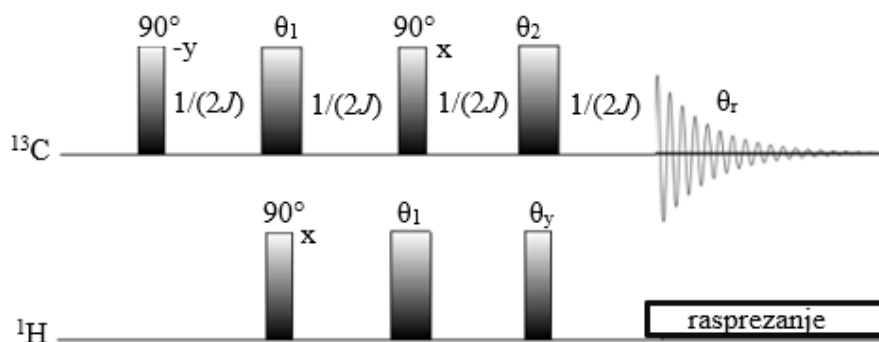
Postoji nekoliko različitih jednodimenzijskih tehnika za ispitivanje ugljikovih jezgri. Jedna od njih je tehnika APT (engl. *Attached Proton Test*) koja uz detekciju različitih ugljikovih jezgara u molekuli omogućuje i njihovo razlikovanje prema multiplicitetu, odnosno broju protona direktno vezanih za pojedini ugljik. U APT spektru signali za ugljikove atome nalaze se s obje strane spektra odnosno, ugljici različitog multipliciteta imaju suprotnu fazu. Signali ugljika za koje je direktno vezan neparan broj vodika (npr. CH, CH₃) nalaze se na istoj strani spektra, dok se sa suprotne strane nalaze signali ugljika za koje je direktno vezan paran broj vodika (CH₂) i signali kvaternih ugljikovih atoma (C bez vodika i C=O).

Revoluciju u snimanju ¹³C jezgara izazvale su tehnike koje uključuju prijenos magnetizacije s jezgre većeg magnetožirnog omjera (NMR osjetljivije jezgre, npr. ¹H) na one s manjim magnetožirnim omjerom (npr. ¹³C) u svrhu poboljšanja osjetljivosti detekcije ¹³C jezgara. Tehnika DEPT (engl. *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) snima se koristeći pulsni slijed (slika 17) koji započinje pobudom protonskim pulsom od 90° nakon čega dolazi do evolucije magnetizacije pod utjecajem CH sprezanja za 1/(2J) period. Magnetizacija spinova ¹H i ¹³C razvija se koherentno nakon ¹³C pulsa od 90°. Takav proces se naziva koherencijom od više kvanata i ne može se detektirati. Zbog toga se upotrebljava puls kuta θ po osi y koji koherenciju pretvara u magnetizaciju koja se može detektirati. Posljednji period koristi se za refokusiranje magnetizacije. Za obradu ¹³C NMR spektra prema multiplicitetu odabire se pulsni kut θ obično u iznosima od 45°, 90° i 135° te zato razlikujemo 45-DEPT, 90-DEPT i 135-DEPT tehniku.³⁴ Glavni nedostatak DEPT spektra je da ne sadrži podatke o signalima kvaternih ugljikovih atoma.



Slika 17. Pulsni slijed tehnike DEPT³⁴

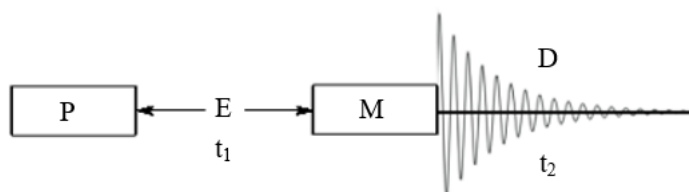
Modifikacijom DEPT tehnike dobivena je tehnika kojom se mogu odrediti signali kvaternih ugljikovih atoma. Ova modifikacija nazvana je DEPTq (engl. *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer including the detection of quaternary nuclei*). Uključenjem dodatnog elementa u pulsni slijed omogućava se pobuda kvaternih ugljikovih atoma (slika 18).³⁵



Slika 18. Pulsni slijed tehnike DEPTq³⁴

2.3.7. Dvodimenzijske tehnike spektroskopije NMR

Dvodimenzijskom spektroskopijom NMR dobivaju se spektri koje opisuju dva parametra – evolucijska dimenzija F_1 i detekcijska dimenzija F_2 . To je skupina tehnika koja se koristi za određivanje struktura kod molekula čiji su jednodimenzijski spektri NMR presloženi za interpretaciju.³⁶ Svi pulsni slijedovi 2D NMR eksperimenata sastoje se od četiri vremenska perioda: priprema (P), evolucija (E), miješanje (M) i detekcija (D) (slika 19).³⁷



Slika 19. Osnovni pulsni slijed 2D NMR tehnika³⁴

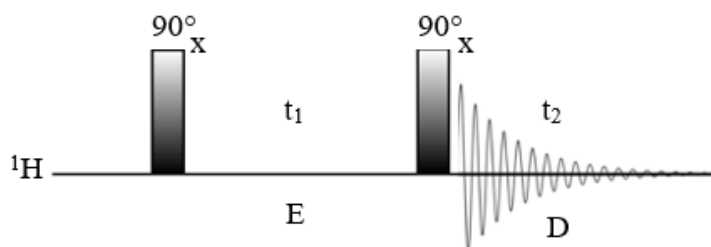
Vrijeme pripreme završava pulsom koji prebacuje magnetizaciju u xy -ravninu. U razvoju ili vremenu evolucije razvija se magnetizacija pod utjecajem raznih faktora. Svaka koherencija razvija se sa svojom frekvencijom koja je funkcija kemijskog pomaka i skalarnog sprežanja jezgri. Do preraspodjele magnetizacije među spinovima dolazi u vremenu miješanja tako da dolazi do interakcije među spinovima u točno određenim vremenskim intervalima. Po završetku miješanja počinje vrijeme akvizicije tijekom kojeg se detektira razvijena

magnetizacija i to kao FID signal u vremenskoj domeni. Taj signal transformira se u frekvencijsku domenu pomoću matematičkih operacija (Fourierovih transformacija).

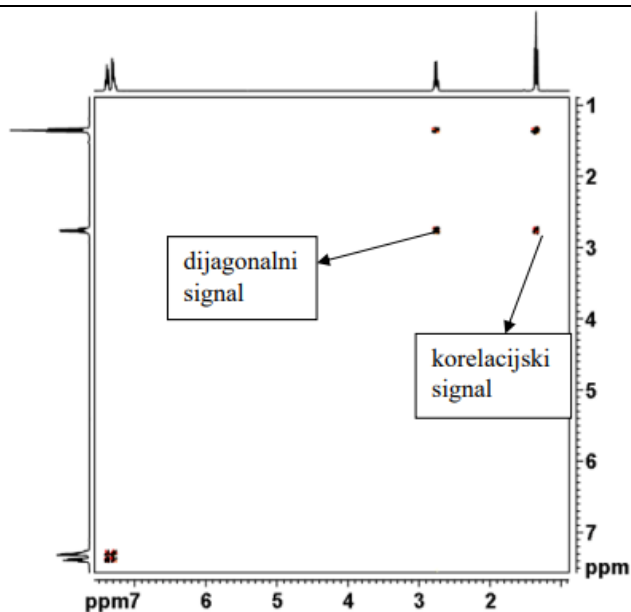
2.3.8. 2D tehnike temeljene na homonuklearnim korelacijama

Od 2D tehnika spektroskopije NMR temeljenih na homonuklearnim korelacijama najčešće korištene su COSY, te NOESY i ROESY tehnike.

COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*) je jedna od najpoznatijih tehnika spektroskopije NMR koja prikazuje interakcije kroz dvije ili tri kemijske veze. Pulsni slijed ove tehnike prikazan je na slici 20. Tijekom eksperimenta dolazi do homonuklearnog sprežanja između susjednih protona, a kao rezultat dobiva se 2D spektar koji na obje osi ima kemijske pomake iste jezgre, što uzrokuje njegovu simetričnost. Spektar se sastoji od dvije vrste signala - dijagonalni i izvan dijagonalni ili korelacijski. Dijagonalni signal daje 1D protonski spektar za danu molekulu, a izvan dijagonalni nam omogućuje određivanje položaja pojedinih protona u molekuli zbog homonuklearnog skalarnog sprežanja susjednih protona (slika 21).



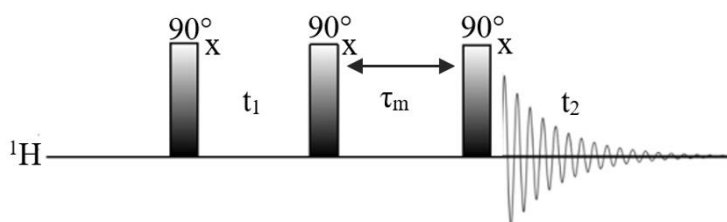
Slika 20. Pulsni slijed tehnike COSY³⁴



Slika 21. Primjer COSY NMR spektra s označenim dijagonalnim i korelacijskim signalima³⁸

NOESY i ROESY tehnike se temelje na interakcijama kroz prostor. One nam daju informaciju o udaljenosti prostorno bliskih skupina atoma. Temelj NOESY i ROESY tehnika je nuklearni Overhauserov efekt (NOE) koji se opisuje kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napučenosti spinova druge jezgre ako su navedeni procesi povezani tzv. mehanizmom križne relaksacije.³⁶ Do Overhauserovog efekta dolazi na dva načina - zasićenjem (engl. "*steady-state NOE*") ili inverzijom napučenosti (engl. "*transient NOE*").^{37,40}

Tehnika NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) temelji se na sprezanju protona kroz prostor. Pulsni slijed ove tehnike prikazan je na slici 22. Prvi puls od 90° prebacuje magnetizaciju u ravninu *xy*, drugi puls od 90° slijedi nakon evolucijskog vremena (t_1), koji prebacuje jednu komponentu vektora magnetizacije na negativni dio osi *z* čime se postiže inverzija napučenosti. NOE nastaje tijekom vremena miješanja (τ_m). Posljednji puls vraća magnetizaciju na ravninu *xy* i omogućava njezinu detekciju.



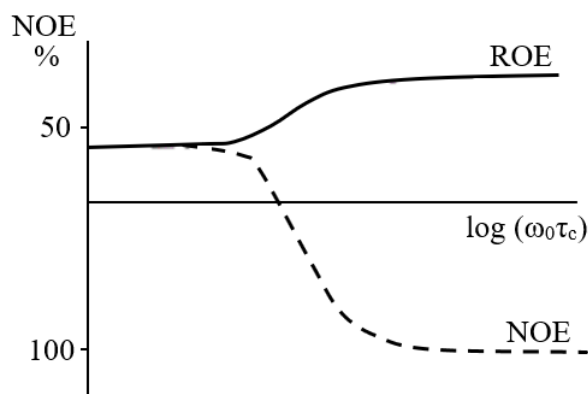
Slika 22. Pulsni slijed tehnike NOESY³⁴

U periodu miješanja dolazi do prijenosa magnetizacije između spinova putem dipolarnih interakcija tj. preko međudjelovanja dipol-dipol, pa spinovi moraju biti prostorno blizu. U NOESY spektru može postojati nekoliko tipova signala: signali dipolnih interakcija, skalarnih sprežanja i kemijske izmjene. Predznak signala prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Predznaci signala u NOESY spektrima³⁴

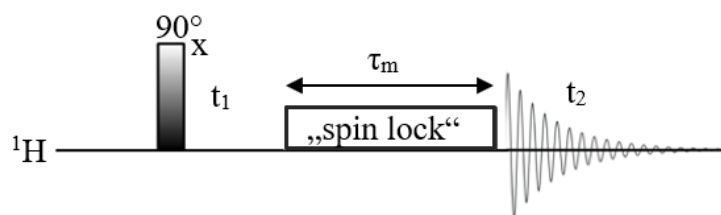
| Predznak dijagonale | Podrijetlo korelacijskih signala | Predznak korelacijskih signala |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| pozitivan | pozitivan NOE | negativan |
| | negativan NOE | pozitivan |
| | kemijska izmjena | pozitivan |

NOESY se koristi za male molekule s pozitivnim NOE ili za velike molekule s jako negativnim NOE. Molekule srednje veličine daju mali NOE ili ga uopće nema. Umnožak frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena u tom slučaju ($\omega_0\tau_c$) približno je 1 (slika 23). Radi toga je razvijena još jedna tehnika kod koje je NOE uvijek pozitivan, ROESY.



Slika 23. Dijagram ovisnosti intenziteta signala u spektrima NOESY i ROESY kod izoliranog homonuklearnog dvospinskog sustava o $\omega_0\tau_c$ ⁴⁰

Jedina razlika između NOESY i ROESY (engl. *Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*) tehnike je u tome da ROE efekt nastaje u ravnini xy , a ne uzduž osi z . Pulsni slijed ROESY tehnike prikazan je na slici 24.

Slika 24. Pulsni slijed tehnike ROESY³⁴

Početni puls od 90° „prebacuje“ magnetizaciju u ravninu xy kao i kod NOESY tehnike. Razlika je u tome što ROESY tehnika tijekom vremena miješanja (τ_m) koristi tzv. zaključavanje spinova (engl. "spin lock") čime se omogućuju procesi križne relaksacije i nastanak ROE. Tehnikom ROESY dobivaju se interakcije koje su istovjetne NOESY interakcijama, no u spektru ROESY mogu se pojaviti dodatni signali koji imaju suprotnu fazu, te ovisno o podrijetlu interakcija, i antifazni signali. Često se pojavljuju i lažno pozitivne interakcije tipa TOCSY-ROE i ROE-TOCSY koje imaju istu fazu kao i prave, pa je potrebno pažljivo interpretirati ROESY spektre. Predznaci signala prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz predznaka signala u ROESY NMR spektrima³⁴

| Predznak dijagonale | Podrijetlo korelacijskih signala | Predznak korelacijskih signala |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| pozitivan | direktni ROE | negativan |
| | indirektni ROE | slabo pozitivan |
| | TOCSY | pozitivan |
| | TOCSY-ROE | negativan (lažni ROE) |
| | ROE-TOCSY | negativan (lažni ROE) |
| | kemijska izmjena | pozitivan |
| | COSY | antifazni |

NOESY i ROESY tehnike su iznimno važne kod analiza organskih molekula i biomolekula. Osjetljive su na kemijske i konformacijske promjene organskih molekula, pa se njihovom analizom mogu utvrditi točne kemijske strukture različitih izomera i kompleksnih spojeva.

2.3.9. 2D tehnike temeljene na heteronuklearnim korelacijama

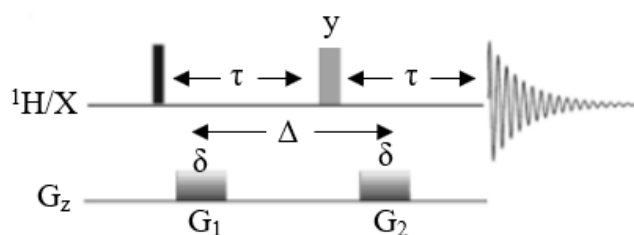
Heteronuklearne korelacijske tehnike zasnivaju se na interakcijama između spinova dviju različitih jezgri. Najčešće korištene jezgre su ^1H i ^{13}C . Kod primjene ovih tehnika moraju se koristiti odvojeni kanali za svaku jezgru zbog velikih razlika u rezonancijskim frekvencijama. Dobiveni spektri nisu simetrični jer se na F_1 i F_2 osima nalaze kemijski pomaci različitih jezgri. Inverzna detekcija ili indirektna detekcija je metoda koja omogućuje promatranje slabije osjetljive jezgre preko neke druge osjetljivije jezgre (najčešće protona). Princip rada je da se magnetizacija prenosi s manje osjetljive jezgre na više osjetljivu, nakon čega se vrši detekcija. Ovom tehnikom omogućeno je promatranje kemijskih pomaka, konstanti sprezanja i vremena relaksacije nekih jezgri kod kojih nije moguća direktna detekcija. Najpoznatije i najviše korištene heteronuklearne korelacijske tehnike spektroskopije NMR su: HSQC i HMBC.

HSQC (engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) tehnika se koristi za detekciju heteronuklearnih sprezanja kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (npr. ^1H - ^{13}C), što znači da signal protona određenog kemijskog pomaka odgovara signalu ugljikovog atoma na kojeg je direktno vezan. Na osi F_2 se nalaze kemijski pomaci protona, a na osi F_1 kemijski pomaci jezgri ^{13}C . HSQC koristi koherenciju od jednog kvanta koja se generira kroz pulsni slijed INEPT, a prenosi se natrag na protonsku domenu putem sljedećeg, inverznog slijeda INEPT. Modifikacija ^1H - ^{13}C HSQC tehnike, koja se naziva „HSQC*edited*“ ili HCQCe, omogućuje raspoznavanje CH i CH₃ u spektru od CH₂ skupina kroz razliku u fazi, što uvelike ubrzava i olakšava rješavanje spektra i otkrivanje strukture molekule.

HMBC tehnika (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) daje uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze. Pomoću HMBC tehnike mogu se opaziti korelacije između protona i kvaternih ugljikovih atoma te utvrditi povezanost između atoma koji se nalaze u istom spinskom sustavu te tako povezati pojedine molekulske fragmente u cjelinu.

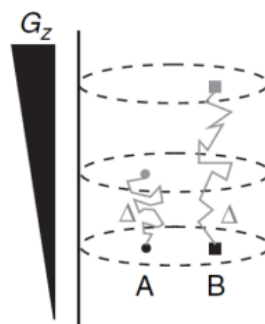
2.3.10. DOSY NMR

DOSY (engl. *Diffusion-ordered Spectroscopy*) je jedna od najmlađih tehnika spektroskopije NMR. Temelji se na odvajanju NMR signala različitih vrsta prema njihovim difuzijskim koeficijentima. Difuzija molekula u otopini ovisi o njihovoj veličini i obliku.⁴¹ To se može kvantitativno opisati korištenjem koeficijenta samodifuzije (D) koji je obrnuto povezan s veličinom; veće molekule imaju manje koeficijente difuzije i obrnuto. Na slici 25 prikazan je pulsni slijed DOSY tehnike. Osnovni pulsni slijed za mjerenje difuzije je tzv. PFG „*spin-echo*“ slijed (engl. *Pulsed Field Gradient*).

Slika 25. Pulsni slijed DOSY tehnike⁴²

Srce DOSY eksperimenta su gradijentni pulsevi (slika 26, G_z) koji imaju različitu snagu ovisno o prostoru. Prvi gradijentni puls u slijedu (G_1) „kodira“ nuklearne spinove čiji fazni faktor ovisi o njihovom položaju u NMR cjevčici. Nakon toga dolazi do perioda odgode (engl. *delay*) (Δ), tijekom kojeg dolazi do difuzije. Primjena drugog gradijentnog pulsa (G_2) refokusira prostornu ovisnost, te ako nije došlo do promjene položaja molekule, ima jednaki učinak na molekulu kao i prvi gradijentni puls. Ako je molekula difundirala daleko od svog početnog položaja tijekom vremena Δ , učinak pulsa G_2 bit će značajno drugačiji, pa do potpunog refokusiranja neće doći, a NMR signali će biti oslabljeni.

Na slici 26 je vidljivo da je položaj molekula A i B tijekom prvog gradijentnog pulsa, G_1 , (molekule prikazane crnom bojom) jednak, te da su obje molekule izložene jednakom djelovanju gradijentnog pulsa G_1 . Nakon difuzije tijekom vremena Δ (molekule prikazane sivom bojom), molekula A će biti na drugačijem položaju u NMR cjevčici od molekule B. Zbog toga što je molekula A difundirala, drugi gradijentni puls G_2 će ju zahvatiti drugačije od prvoga, pa se signali neće u potpunosti moći refokusirati. Rezultat će biti slabiji signal u spektru. S druge strane, molekula B je nakon prvog G_1 pulsa i vremena Δ prešla najveću udaljenost, tako da će utjecaj G_2 u njenom slučaju biti najviše različit od G_1 . Zbog toga će i signal koji je dobiven u spektru biti oslabljen više od molekule A.⁴¹



Slika 26. Shematski prikaz slabljenja signala kroz molekularnu difuziju⁴¹

Za mjerenje koeficijenta difuzije provodi se niz mjerenja u kojima se progresivno povećava ili jačina gradijenta (G) ili vrijeme difuzije (Δ) ili trajanje gradijentnog impulsa (δ). Eksperimentalno je najlakše povećati jačinu gradijenta (G) uz zadržavanje konstantnih Δ i δ . Podaci se prikazuju kao 2D spektar s kemijskim pomacima na osi x i koeficijentima difuzije na osi y . Količina signala koja se refokusira na kraju pulsnog slijeda stoga ovisi o brzini difuzije molekule; što je veća difuzija, to je niži intenzitet NMR signala. Jednadžba koja kvantitativno opisuje intenzitet signala je⁴¹:

$$I = I_0 \exp \left(\frac{-2\tau}{T_2} - \left(\gamma \delta G \right)^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right) \quad (7)$$

u kojoj I_0 predstavlja jakost signala pri gradijentu 0, G je jakost gradijenta, D je difuzijski koeficijent, δ je trajanje gradijentnog pulsa, Δ je vrijeme difuzije, a γ masena koncentracija (g mL^{-1}). Budući da su γ , δ i Δ poznate konstante, koeficijent difuzije se može izračunati.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

4-(6-metoksi-2-naftil)-butan-2-on, nabumeton (NAB, $C_{15}H_{16}O_2$) korišten u izradi ovog diplomskog rada nabavljen je od proizvođača Cayman Chemical (Ann Arbor, SAD). β -ciklodekstrin (β -CD, $C_{42}H_{70}O_{35}$) kupljen je od proizvođača Cyclolab (Budimpešta, Mađarska). Uzorci kompleksa u čvrstom stanju (NAB/ β -CD u omjeru 1:1) pripremljeni su mljevenjem u periodu od 30 min (25 Hz) korištenjem Mixer Mill MM 200 visokoenergijskog vibracijskog mlina (Retsch, Haan, Njemačka).⁴³ Uzorci su pripremljeni tako da su navedene komponente prije tretiranja u mlinu odvagane u ekvimolarnim omjerima, a ukupna masa smjese komponenti iznosila je ≈ 200 mg (masa nabumetona je iznosila oko 33,49 mg, a masa β -ciklodekstrina oko 166,51 mg). Smjese komponenti su nakon vaganja smještene u posude za mljevenje od nehrđajućeg čelika (volumena 10,0 mL) u kojima su se nalazile po dvije kuglice od identičnog materijala promjera 7 mm. Sve uzorke je pripremio David Klarić, mag. chem. Deuterirani dimetil-sulfoksid (DMSO- d_6) i deuterirana voda (D_2O) kupljeni su od proizvođača Eurisotop (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.).

3.2. Priprema uzoraka

Za analizu kemijskih pomaka, potvrdu stvaranja kompleksa, te identifikaciju interakcija u kompleksu, u prvom dijelu istraživanja korišteno je 5,1 mg NAB, 24,8 mg β -CD-a, te 29,6 mg kompleksa NAB/ β -CD. Uzorci su bili otopljeni u 600 μ L DMSO- d_6 , a TMS je korišten kao unutarnji standard. NAB se lako otopio u DMSO- d_6 , dok je β -CD bilo potrebno otopiti pomoću ultrazvučne kupelji. Ciljana koncentracija bila je 35 mmol L^{-1} . U drugom dijelu istraživanja, korišteno je 1,0 mg NAB, 5,0 mg β -CD-a i 6,0 mg NAB/ β -CD otopljenih u 600 μ L D_2O . Ciljana koncentracija bila je 7 mmol L^{-1} . Velik dio nabumetona i nešto manji dio kompleksa su se nakon pripreme istaložili iz otopine, tako da je konačna koncentracija uzorka bila nekoliko puta manja od ciljane. Kod otapanja u D_2O uzete su manje koncentracije zbog slabe topljivosti β -CD-a. Ovdje je i NAB i β -CD bilo potrebno otopiti pomoću ultrazvučne kupelji. Otopljeni uzorci preneseni su u NMR cjevčice promjera 5,0 mm i snimani pri 25 °C. Podaci o korištenim uzorcima prikazani su u tablicama 5. a) i 5. b).

Tablica 5. a) Podaci o korištenim NAB, β -CD, i NAB/ β -CD uzorcima otopljenim u DMSO- d_6

| | NAB | β -CD | NAB/ β -CD |
|-------------------------------------|---------|-------------|------------------|
| $M / \text{g mol}^{-1}$ | 228,286 | 1134, 984 | - |
| $V (\text{DMSO-}d_6) / \mu\text{L}$ | 600,000 | 600,000 | 600,000 |
| $c / \text{mol L}^{-1}$ | 0,037 | 0,037 | - |
| m / mg | 5,100 | 24,800 | 29,600 |
| omjer | 1 | 1 | - |

Tablica 5. b) Podaci o korištenim NAB, β -CD, i NAB/ β -CD uzorcima otopljenim u D_2O

| | NAB | β -CD | NAB/ β -CD |
|--------------------------|---------|-------------|------------------|
| $M / \text{g mol}^{-1}$ | 228,286 | 1134, 984 | - |
| $V (D_2O) / \mu\text{L}$ | 600,000 | 600,000 | 600,000 |
| $c / \text{mol L}^{-1}$ | 0,007 | 0,007 | - |
| m / mg | 1, 000 | 5,000 | 6,000 |
| omjer | 1 | 1 | - |

3.3. Metode

Svi jednodimenzijski i dvodimenzijski spektri NMR snimljeni su u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. ^1H , DEPTq, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, ROESY i DOSY spektri NMR snimani su na Bruker Avance AV600 spektrometru (slika 27) opremljenom s BBO probom i z -gradijentima. Eksperimenti su provedeni snimanjem uzoraka pri 25°C u NMR cjevčicama promjera 5,0 mm. Spektri su dobiveni korištenjem standardnih Brukerovih pulsnihi sljedova, a dobiveni podaci su obrađivani pomoću programskog paketa Bruker TopSpin. DOSY spektri NMR su dobiveni sa 16 ponavljanja za svaki korak gradijenta, a linearni gradijent je odabran u rasponu od 2 % do 95 %. Vrijeme difuzije (Δ) bilo je 160 ms, dok je trajanje gradijenta postavljeno na 2,1 ms (δ). Spektri su obrađeni pomoću softvera Dynamics Center 2.6.3., poduzeća Bruker.



Slika 27. Bruker Avance AV600 instrument

3.3.1. Spektri za potpunu asignaciju protonskih i ugljikovih signala

Za potpunu asignaciju ^1H i ^{13}C signala, usporedbu kemijskih pomaka i konstanti sprezanja snimljeni su jednodimenzijski (^1H , DEPTq) i dvodimenzijski (HSQCe, HMBC, i COSY) spektri NMR.

Kod snimanja u DMSO- d_6 broj ponavljanja pulsnih sljedova (engl. *number of scans*) bio je: 32 za ^1H , 3200 za DEPTq, 8–24 za HSQCe, 16–48 za HMBC i 2–4 za COSY. Kod dvodimenzijskih, HSQCe i HMBC spektara FID je skupljan u matricu podataka veličine 2048 s 256 inkremenata. Obrada je provedena korištenjem $2\text{ K} \cdot 1\text{ K}$ matrice sa *zero filling* u F_1 domeni.

Snimanje u D_2O bilo je otežano zbog niske topljivosti uzorka. Broj ponavljanja pulsnih sljedova za ^1H NMR spektre bio je 32–64, za DEPTq 3200, te za HSQCe (one koje je bilo moguće snimiti) 128–164. Detaljni eksperimentalni parametri svih snimljenih eksperimenata NMR nalaze se u Dodacima.

3.3.2. Spektri za identifikaciju intermolekulskih interakcija

Za identifikaciju intermolekulskih interakcija snimljeni su dvodimenzijски NOESY i ROESY spektri NMR, te selektivni NOE i ROE spektri. Kod snimanja uzoraka korištena je spektralna širina od 8400 Hz u obje dimenzije, FID je skupljan u matricu podataka veličine 2048 s 256 inkremenata te je obrada provedena korištenjem $2\text{ K} \cdot 1\text{ K}$ matrice sa *zero filling* u F_1 domeni.

Snimanje NOESY spektara u DMSO- d_6 bio je uz 16, selektivni NOE uz 1024, a selektivni ROE uz 512 ponavljanja pulsnih sljedova.

Snimanje NOESY i selektivnih NOE spektara uzoraka otopljenih u D_2O nije dalo rezultata zbog ulaska sustava u područje gdje je intenzitet generiranih NOE signala ili nula ili blizu nule. ROESY spektri snimljeni su sa 16–128, a selektivni ROE spektri s 5120 ponavljanja pulsnih sljedova.

3.3.3. Spektri za određivanje difuzijskih koeficijenata

Za određivanje koeficijenata difuzije i postotaka kompleksacije snimljeni su DOSY spektri NMR. Kod svih uzoraka korištena je spektralna širina od 5950 Hz u obje dimenzije, a FID je skupljan u matrice podataka različitih veličina. Obrada je također provedena korištenjem $2\text{ K} \cdot 1\text{ K}$ matrice sa *zero filling* u F_1 domeni. U uzorcima u DMSO- d_6 sve matrice su bile veličine 16384 sa 16 inkremenata, a spektri su snimani s 32 ponavljanja. U slučaju D_2O , broj ponavljanja pulsnih sljedova se razlikovao u ovisnosti o topivosti uzorka: β -CD bio je snimljen s 32 uz matricu podataka veličine 16384 s 24 inkrementa, NAB s 312 uz matricu veličine 16384 s 32 inkrementa, a kompleks NAB/ β -CD s 256 uz matricu veličine 16384 sa 64 inkrementa.

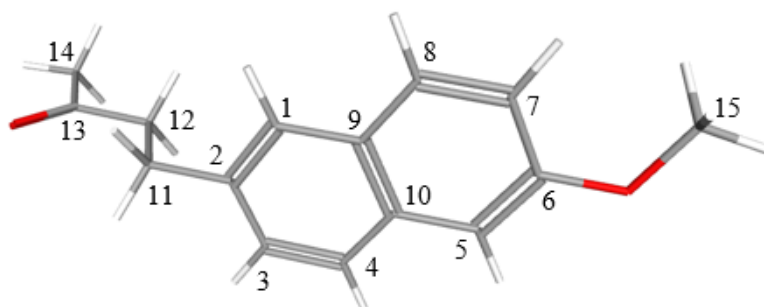
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza kompleksa otopljenog u DMSO-d₆

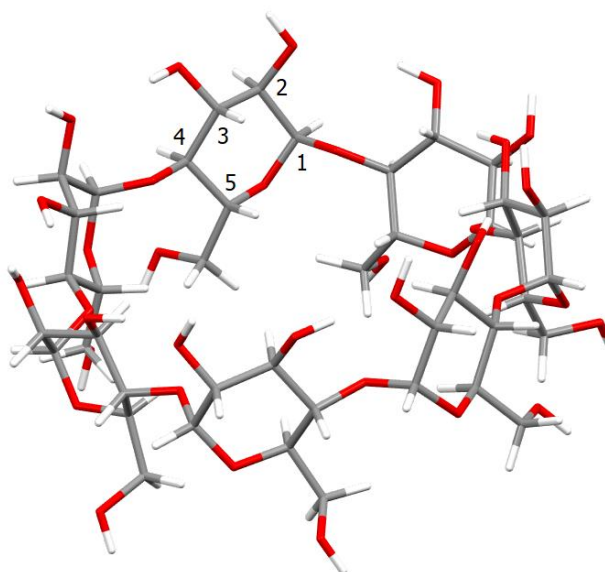
Možebitni nastanak inkluzijskog kompleksa nabumetona i β-ciklodekstrina istraživani je pomoću usporedbe spektara NMR slobodnih molekula s NMR spektrima pretpostavljenog kompleksa. Perturbacija kemijskih pomaka (¹H i ¹³C NMR spektri), identifikacija intermolekulskih interakcija kroz prostor (1D i 2D NOE/ROE NMR spektri), te razlika u koeficijentima difuzije (DOSY NMR spektri) su parametri pomoću kojih se otkriva je li, i u kojoj mjeri, došlo do stvaranja inkluzijskog kompleksa nabumetona i β-ciklodekstrina u danim eksperimentalnim uvjetima.

4.1.1. Potpuna asignacija signala nabumetona i β-ciklodekstrina

Preduvjet za usporedbu kemijskih pomaka i analizu interakcija između β-ciklodekstrina i lijeka je potpuna asignacija NMR signala nabumetona i β-ciklodekstrina u slobodnoj formi, kao i u potencijalnom kompleksu. Asignacija predstavlja proces u kojem se svakom atomu u molekuli dodijeli određena vrijednost kemijskog pomaka, odnosno, svakom signalu u spektru (proton ili ugljik) pridruži jedinstvena oznaka (broj) atoma u molekuli. Numeriranje i kristalna struktura nabumetona prikazana je na slici 28, a β-ciklodekstrina na slici 29.



Slika 28. Numeriranje i kristalna struktura nabumetona (PubChem CID: 4409)

Slika 29. Numeriranje i kristalna struktura β -ciklodekstrina (PDB kod: 3CGT)

Potpuna asignacija signala slobodnog nabumetona i β -ciklodekstrina, te pretpostavljenog kompleksa napravljena je analizom ^1H , ^{13}C , HSQCe, HMBC i COSY NMR spektara, a prikazana je u tablicama 6. a) - d.).

Tablica 6. a) Potpuna asignacija protona β -ciklodekstrina i pretpostavljenog kompleksa u DMSO- d_6 pri 25 °C

| Proton | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan β -CD | | | β -CD u kompleksu s nabumetonom | | |
|--------|---|----------------------|-----|----------------|---------------------------------------|-----|----------------|
| | | δ/ppm | | J/Hz | δ/ppm | | J/Hz |
| 8 | 0,011 | 5,715 | d | 6,9 | 5,726 | d | 6,9 |
| 9 | 0,010 | 5,665 | d | 2,5 | 5,675 | d | 2,5 |
| 1 | 0,005 | 4,824 | d | 3,6 | 4,829 | d | 3,7 |
| 7 | 0,007 | 4,447 | t | 5,7 | 4,454 | t | 5,6 |
| 6a | 0,009 | 3,654 | m | - | 3,663 | m | - |
| 6b | 0,006 | 3,617 | m | - | 3,623 | m | - |
| 3 | 0,008 | 3,633 | m | - | 3,641 | m | - |
| 5 | -0,005 | 3,556 | m | - | 3,551 | m | - |
| 4 | 0,005 | 3,350 | t | 9,1 | 3,355 | t | 9,2 |
| 2 | 0,005 | 3,299 | ddd | 10,2; 6,9; 3,6 | 3,304 | ddd | 10,1; 7,0; 3,5 |

Tablica 6. b) Potpuna asignacija ugljika β -ciklodekstrina i pretpostavljenog kompleksa u DMSO- d_6 pri 25 °C

| Ugljik | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan β -CD | β -CD u kompleksu s nabumetonom |
|--------|---|----------------------|---------------------------------------|
| | | δ /ppm | δ /ppm |
| 1 | 0,01 | 101,95 | 101,96 |
| 4 | 0,01 | 81,55 | 81,56 |
| 5 | 0,01 | 73,06 | 73,07 |
| 3 | 0,01 | 72,42 | 72,43 |
| 2 | 0,01 | 72,05 | 72,06 |
| 6 | 0,00 | 59,93 | 59,93 |

Tablica 6. c) Potpuna asignacija protona nabumetona i pretpostavljenog kompleksa u DMSO- d_6 pri 25 °C

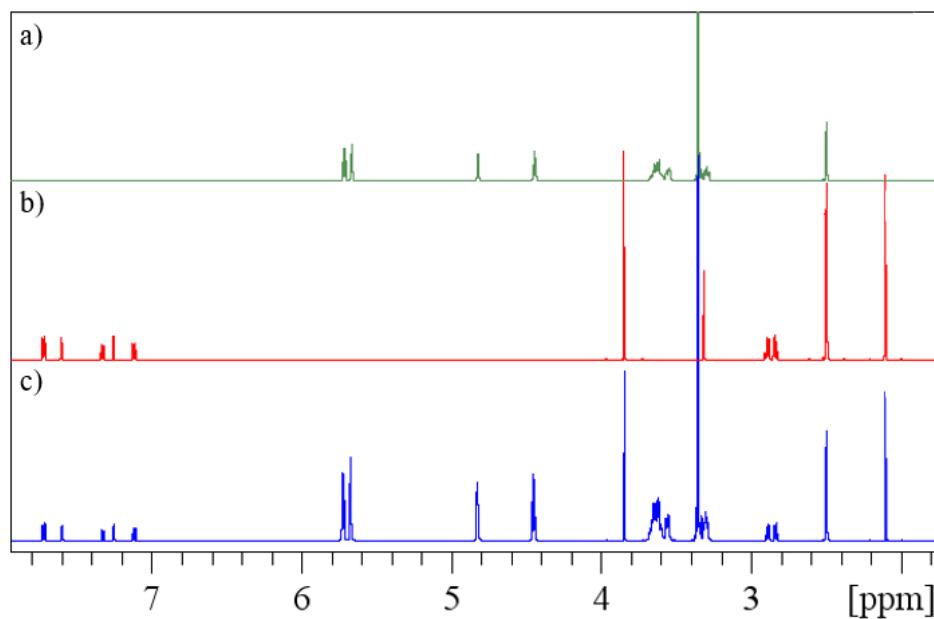
| Proton | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan nabumeton | | | Nabumeton u kompleksu s β -CD | | |
|--------|---|--------------------|----|----------|-------------------------------------|----|----------|
| | | δ /ppm | | J/Hz | δ /ppm | | J/Hz |
| 8 | -0,002 | 7,727 | d | 8,9 | 7,725 | d | 8,9 |
| 4 | -0,003 | 7,722 | d | 8,4 | 7,719 | d | 8,3 |
| 1 | -0,005 | 7,605 | s | - | 7,600 | s | - |
| 3 | -0,003 | 7,331 | dd | 8,4; 1,9 | 7,328 | dd | 8,4; 1,8 |
| 5 | -0,005 | 7,260 | d | 2,7 | 7,255 | d | 2,5 |
| 7 | -0,003 | 7,121 | dd | 9,0; 2,6 | 7,118 | dd | 9,0; 2,7 |
| 15 | -0,004 | 3,851 | s | - | 3,847 | s | - |
| 11 | -0,003 | 2,894 | m | - | 2,891 | m | - |
| 12 | -0,007 | 2,841 | m | - | 2,834 | m | - |
| 14 | -0,004 | 2,108 | s | - | 2,104 | s | - |

Tablica 6. d) Potpuna asignacija ugljika nabumetona i pretpostavljenog kompleksa u DMSO-d₆ pri 25 °C

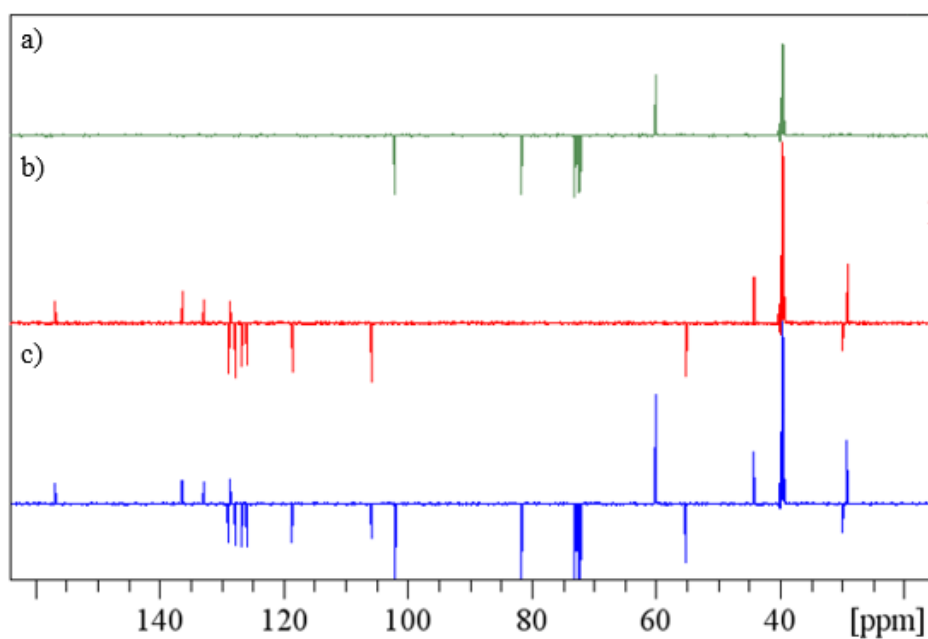
| Ugljik | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan nabumeton | Nabumeton u kompleksu s β -CD |
|--------|---|--------------------|-------------------------------------|
| | | δ /ppm | δ /ppm |
| 13 | 0,11 | 207,68 | 207,79 |
| 6 | 0,05 | 156,74 | 156,79 |
| 2 | 0,05 | 136,23 | 136,28 |
| 10 | 0,04 | 132,71 | 132,75 |
| 8 | 0,06 | 128,74 | 128,80 |
| 9 | 0,05 | 128,51 | 128,56 |
| 3 | 0,06 | 127,61 | 127,67 |
| 4 | 0,06 | 126,64 | 126,70 |
| 1 | 0,05 | 125,82 | 125,87 |
| 7 | 0,05 | 118,45 | 118,50 |
| 5 | 0,04 | 105,72 | 105,76 |
| 15 | 0,05 | 55,08 | 55,13 |
| 12 | 0,05 | 44,06 | 44,11 |
| 14 | 0,06 | 29,75 | 29,81 |
| 11 | 0,05 | 29,01 | 29,06 |

4.1.2. Usporedba kemijskih pomaka

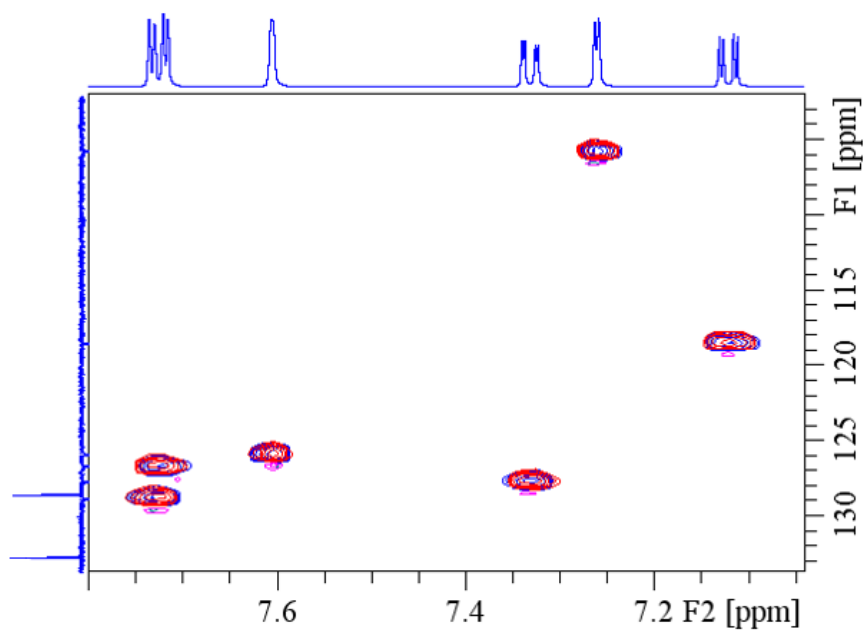
Analizom protonskih i ugljikovih spektara slobodnih vrsta, te njihovom usporedbom sa spektrima pretpostavljenog kompleksa nije uočena značajna perturbacija kemijskih pomaka. Usporedba snimljenih ¹H i ¹³C spektara prikazana je na slikama 30–34, a iz dobivenih rezultata se može zaključiti da je: ili došlo do stvaranja inkluzijskog kompleksa u vrlo niskom postotku, ili da do stvaranja kompleksa uopće nije došlo.



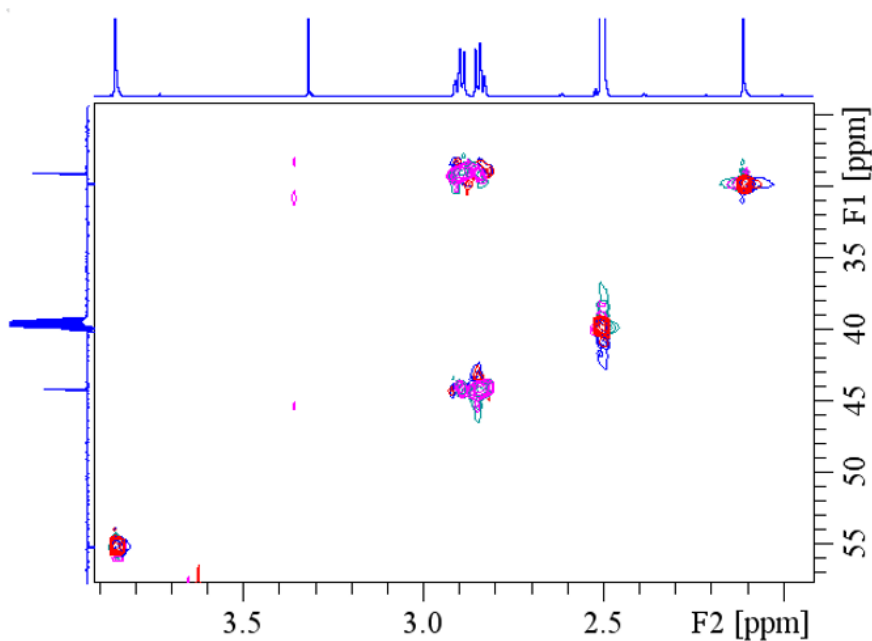
Slika 30. Usporedba ^1H NMR spektara a) β -ciklodekstrina, b) nabumetona i c) kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona otopljenih u DMSO-d_6 pri 25°C



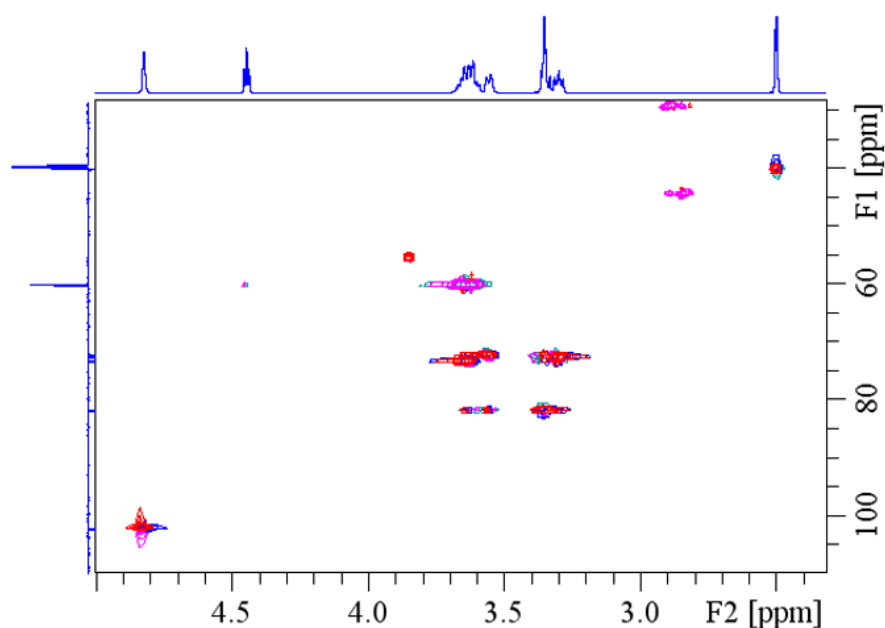
Slika 31. Usporedba ^{13}C NMR spektara a) β -ciklodekstrina, b) nabumetona i c) kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona otopljenih u DMSO-d_6 pri 25°C



Slika 32. Prikaz preklapanja aromatske regije HSQCe NMR spektara nabumetona (crveno/ljubičasto) i kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona (plavo/zeleno) otopljenih u DMSO- d_6 pri 25 °C



Slika 33. Prikaz preklapanja alifatske regije HSQCe NMR spektara nabumetona (crveno/ljubičasto) i kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona (plavo/zeleno) otopljenih u DMSO- d_6 pri 25 °C

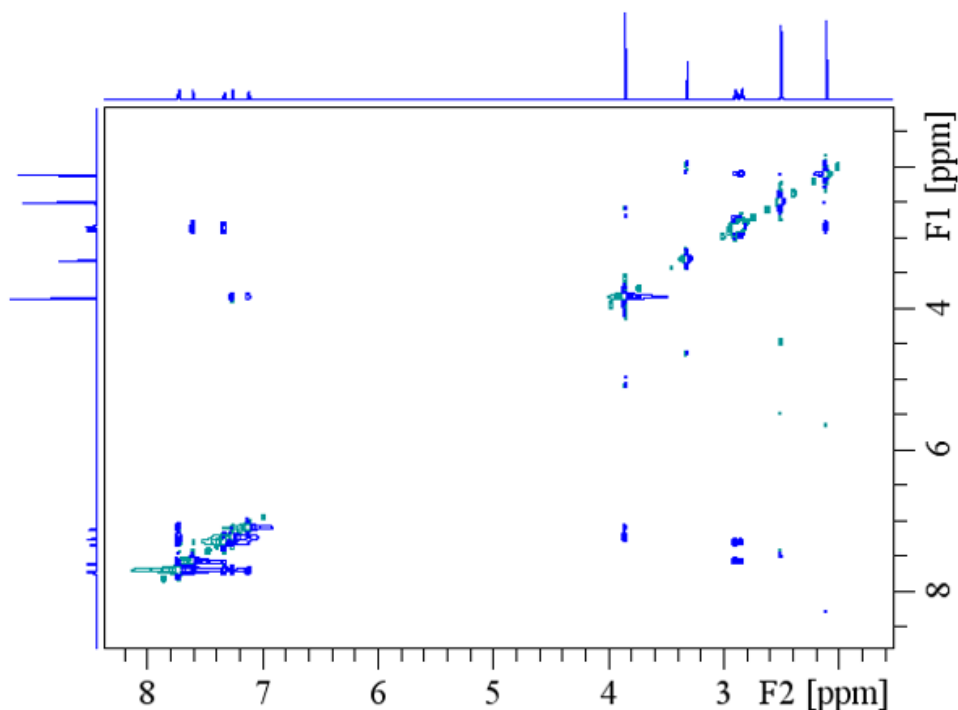


Slika 34. Prikaz preklapanja HSQCe spektara β -ciklodekstrina (crveno/ljubičasto) i kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona (plavo/zeleno) otopljenih u DMSO- d_6 pri 25 °C

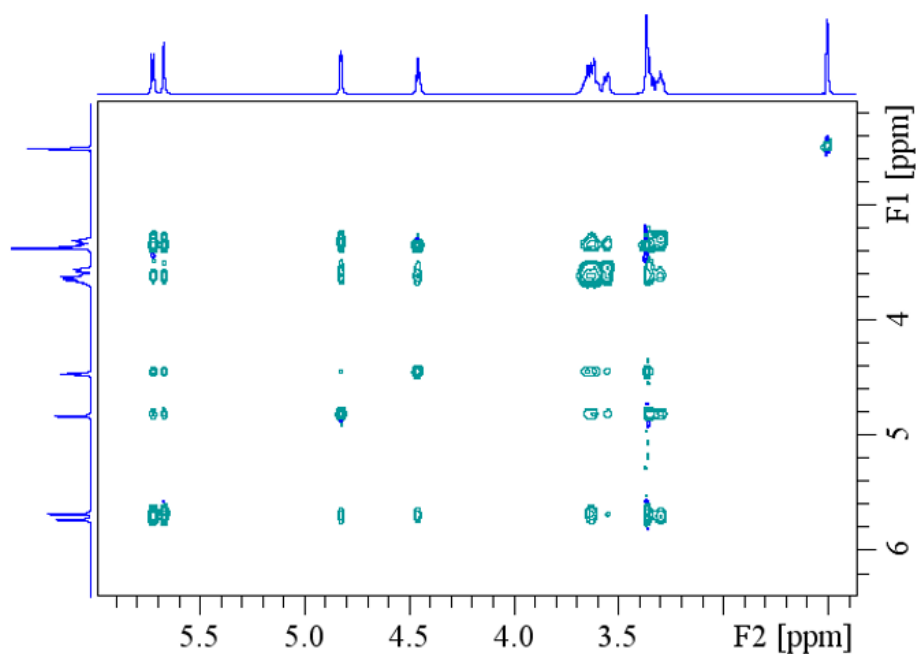
4.1.3. Analiza NOESY spektra

NOESY i ROESY NMR spektri koriste se za pronalaženje interakcija kroz prostor. Te interakcije mogu biti unutar jedne molekule (intramolekulske), te između dvije različite molekule (intermolekulske) uz uvjet da su te dvije molekule u otopini prostorno blizu. U slučaju nabumetona i β -ciklodekstrina korišteni su NOESY NMR spektri. Budući da je nabumeton mala kruta linearna molekula, NOESY spektar je, očekivano, pokazao samo trivijalne interakcije unutar molekule. Predznak signala u NOESY spektru takvih malih molekula je pozitivan ili suprotnog predznaka od dijagonale (slika 35), dok se u NOESY spektru velike cikličke molekule β -ciklodekstrina očekuju negativni signali, odnosno signali istog predznaka kao dijagonala (slika 36). Prilikom stvaranja kompleksa, mala molekula bi trebala poprimiti svojstva velike molekule, te se u NOESY spektru kompleksa očekuje da svi sudionici stvaranja kompleksa imaju signale istog predznaka kao dijagonala. Kao što se vidi na slici 37, u slučaju nabumetona i β -ciklodekstrina to se nije dogodilo. Uz to, na istoj slici je vidljivo da NOESY NMR spektar kompleksa ne pokazuje niti jednu interakciju između nabumetona i β -ciklodekstrina.

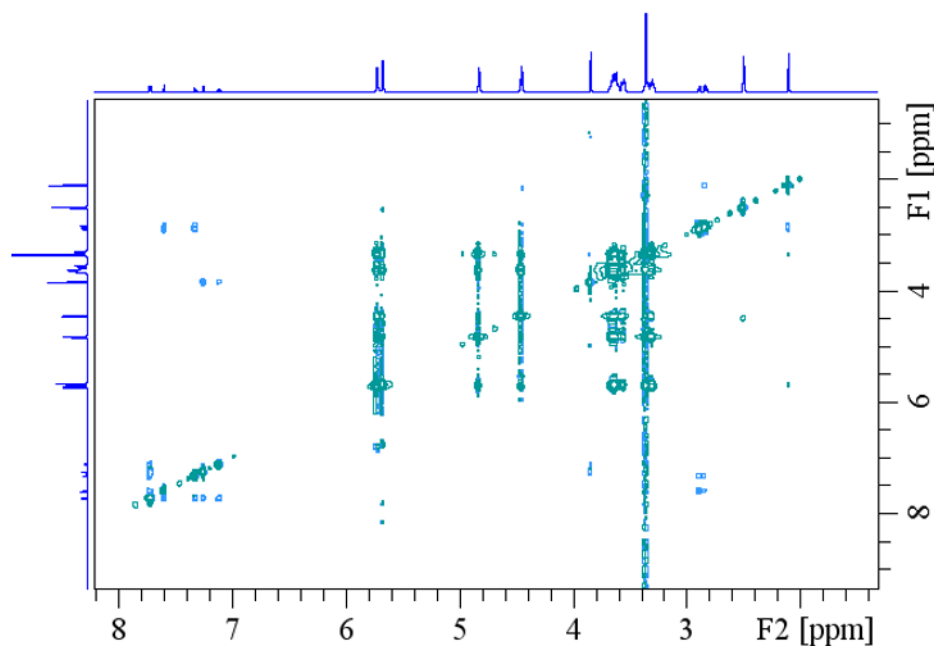
Oba rezultata nas dovode do zaključka da je ili došlo do stvaranja inkluzijskog kompleksa u vrlo niskom postotku, ili da do stvaranja kompleksa uopće nije došlo, što se slaže sa zaključkom dobivenim iz analize perturbacije kemijskih pomaka.



Slika 35. NOESY spektar nabumetona otopljenog u DMSO-d₆ pri 25 °C



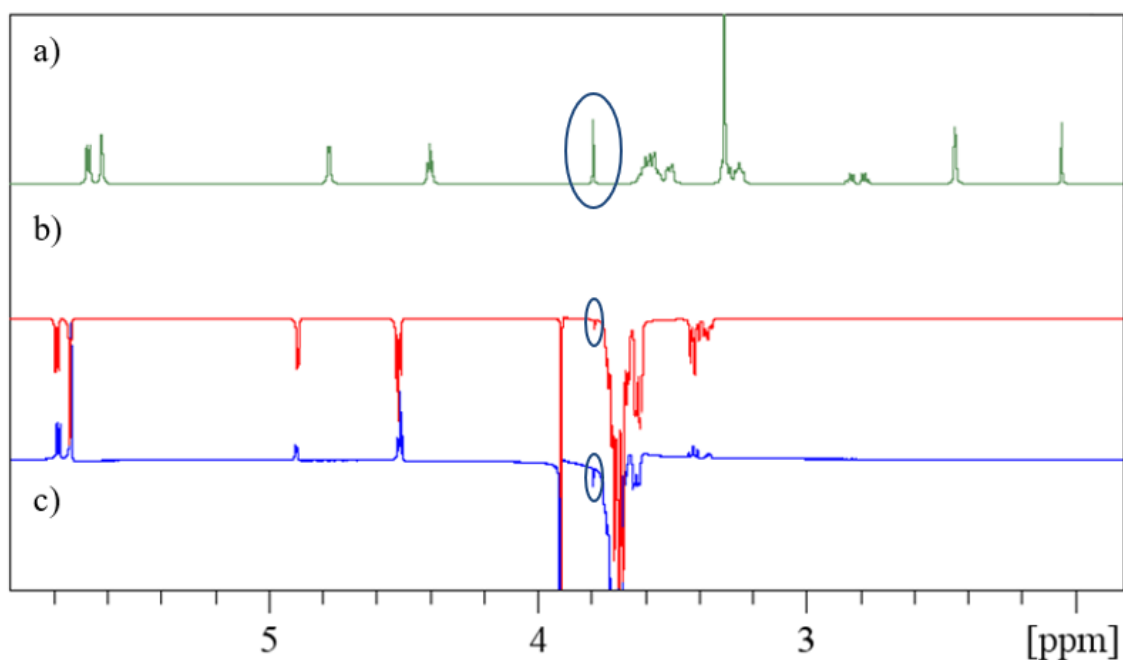
Slika 36. NOESY spektar β-ciklodekstrina otopljenog u DMSO-d₆ pri 25 °C



Slika 37. NOESY spektar kompleksa nabumeton/ β -ciklodekstrin otopljenog u DMSO- d_6 pri 25 °C

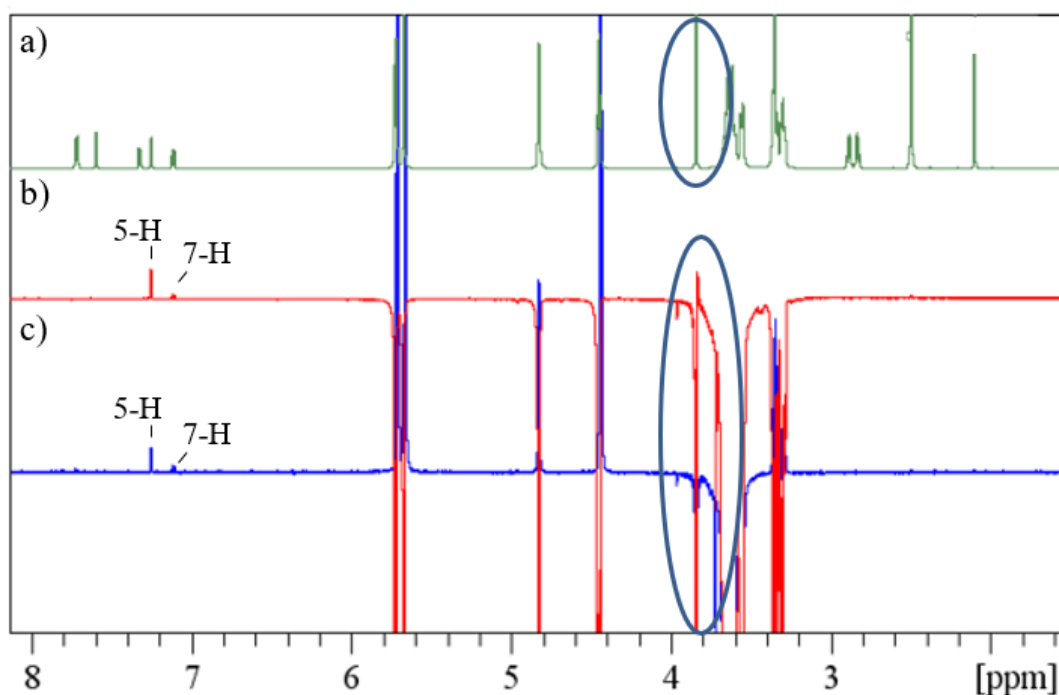
4.1.4. Analiza selektivnih NOE/ROE spektara

Glavna prednost selektivnih (1D) NOE/ROE spektara je selektivna pobuda samo jedne rezonantne linije, što rezultira kratkim vremenom snimanja. Zbog toga je u nekom zadanom vremenu moguće koristiti puno veći broj ponavljanja pulsog slijeda (engl. „*number of scans*“), čime se pojačava osjetljivost samog eksperimenta. Zbog toga se u selektivnim eksperimentima mogu pojaviti interakcije koje se ne vide u 2D NOESY spektru, gdje su pobuđene sve frekvencije istovremeno i koristi se manji broj ponavljanja. Na slikama 38 i 39 prikazana su preklapanja protonskih spektara kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina sa selektivno pobuđenim 1D NOE i 1D ROE spektrima. Odabrane frekvencije bile su 3,56 ppm za pobudu 5-H (slika 38), te 3,64 ppm za pobudu 3-H β -ciklodekstrina (slika 39). Te dvije frekvencije odabrane su zato što su 3-H i 5-H β -ciklodekstrina orijentirani prema unutrašnjosti šupljine β -ciklodekstrina (slika 29), te se kod inkluzijskih kompleksa nalaze najbliže lijeku koji ulazi u šupljinu. Prilikom pobude 3-H pobuđen je i signal CH_2 grupe β -ciklodekstrina (6ab-H) zato što signali tih grupa imaju gotovo jednak kemijski pomak u DMSO- d_6 pri 25 °C. Selektivni NOE/ROE spektri s pobuđenim 5-H β -ciklodekstrina nisu pokazali nikakve interakcije s nabumetonom (slika 38).



Slika 38. Preklapanje a) ^1H spektra s b) 1D NOE i c) 1D ROE spektrima u DMSO-d_6 pri 25°C ; u oba selektivna eksperimenta pobuda je na 3,56 ppm što odgovara 5-H u β -ciklodestrinu; plavim krugovima je označen signal 15-OMe

S druge strane, spektri s pobuđenim H3/H6ab β -ciklodekstrina na prvi pogled pokazuju interakcije s 5-H i 7-H nabumetona (slika 39). No, detaljnijom analizom se može zaključiti da je prilikom pobuđivanja na 3,65 ppm došlo do pobuđivanja i signala na 3,85 ppm (15-OMe) zbog širine pulsa kojim se vršilo pobuđivanje. Budući da je u nabumetonu 15-OMe u prostornoj blizini 7-H i 5-H, ove interakcije koje vidimo u 1D selektivnom NOE i ROE eksperimentu su najvjerojatnije intramolekulske i ne mogu se interpretirati kao dokaz za postojanje kompleksa. Zbog toga, zaključak i nakon ovih eksperimenata ostaje isti – ili je došlo do kompleksiranja, ali u vrlo malom postotku, ili do kompleksiranja nije došlo.



Slika 39. Preklapanje a) ^1H spektra s b) 1D NOE i c) 1D ROE spektrima u DMSO-d_6 pri $25\text{ }^\circ\text{C}$; u oba selektivna eksperimenta pobuda je na $3,65\text{ ppm}$ što odgovara 3-H i 6ab-H u β -ciklodestrinu; plavim krugovima je označen signal 15-OMe

4.1.5. Analiza DOSY spektara

Difuzijska spektroskopija (DOSY) korištena je za određivanje difuzijskih koeficijenata slobodnih molekula nabumetona i β -ciklodekstrina, kao i pretpostavljenog kompleksa nabumeton/ β -ciklodekstrin. Dobiveni difuzijski koeficijenti iskorišteni su za izračun postotka kompleksacije. Signali u DOSY spektrima su integrirani, a vrijednosti integrala obrađene pomoću Dynamics Center 2.6.3 programa kako bi se otkrila krivulja koja najbolje opisuje njihovu ovisnost o jačini gradijenta. Dobivena krivulja opisana je funkcijom:

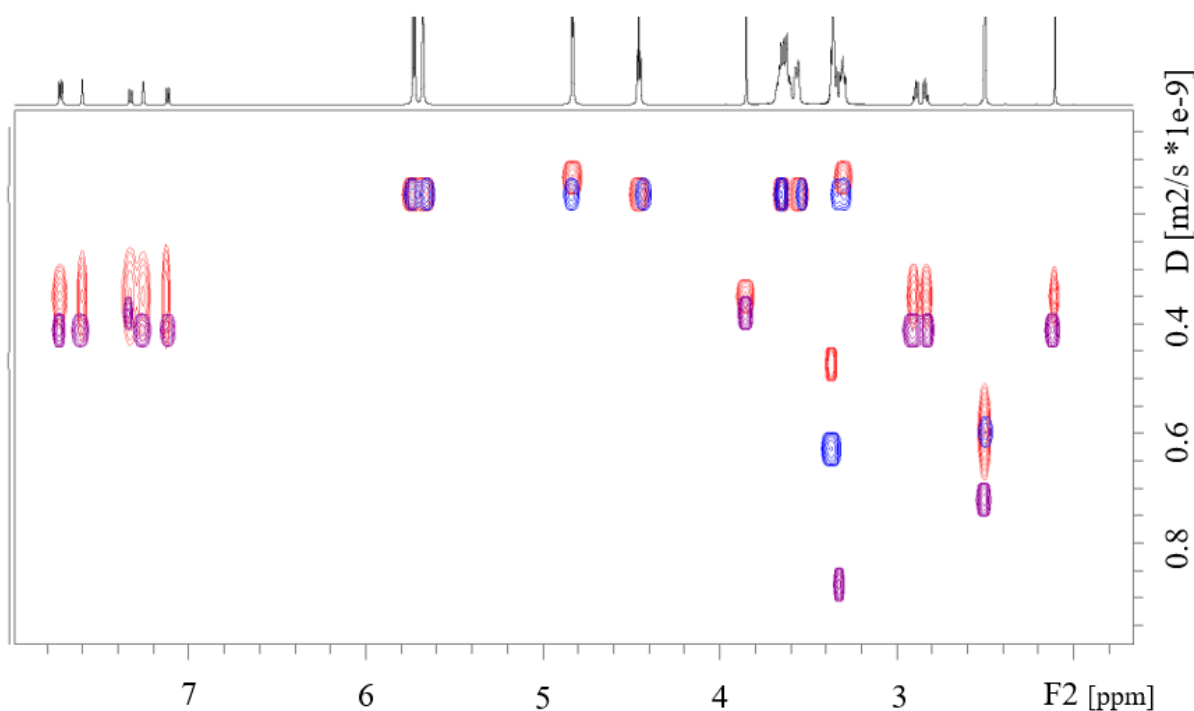
$$f(x) = I_0 * e^{-D*\gamma^2*x^2*\delta^2*(\Delta-\frac{\delta}{3})*10^4} \quad (8)$$

pri čemu je $\gamma = 26752\text{ rad/(s G)}$, I_0 predstavlja integral signala u NMR spektru, a varijabla (x) je snaga gradijenta. Krivulje svih signala su pregledane, te su iz daljnjeg računa izostavljene one s velikim greškama prilikom integracije: preklapljeni signali, kao i oni s niskim omjerom

signal/šum. Konačni koeficijent difuzije za svaku molekulu izračunat je kao prosjek svih odabranih signala. Dobiveni rezultati su sažeti u tablici 7, a grafički prikaz je na slici 40.

Tablica 7. Difuzijski koeficijenti (D) izračunati iz DOSY eksperimenata pri 25 °C u DMSO-d₆

| | D / m ² s ⁻¹ | Standardna devijacija / m ² s ⁻¹ |
|---------------------------------|------------------------------------|--|
| Nabumeton-slobodan | 3,52 · 10 ⁻¹⁰ | 0,06 · 10 ⁻¹⁰ |
| Nabumeton-vezan | 2,97 · 10 ⁻¹⁰ | 0,05 · 10 ⁻¹⁰ |
| β-ciklodekstrin-slobodan | 0,97 · 10 ⁻¹⁰ | 0,02 · 10 ⁻¹⁰ |
| β-ciklodekstrin-vezan | 0,90 · 10 ⁻¹⁰ | 0,01 · 10 ⁻¹⁰ |



Slika 40. Preklapanje DOSY spektara slobodnog nabumetona (ljubičasto), slobodnog β-ciklodekstrina (plavo) i kompleksa nabumeton/β-ciklodekstrina (crveno) pri 25 °C u DMSO-d₆

Iz tablice 7 vidljivo je da je koeficijent difuzije slobodnog β-ciklodekstrina gotovo jednak onom u vezanom stanju (kompleks). Slobodni nabumeton ima samo malo manji koeficijent difuzije u odnosu na nabumeton u kompleksu, što se može objasniti nekim postotkom vezanog nabumetona koji je u brzom izmjeni sa slobodnim nabumetonom. Upravo

u slučajevima kad su ova dva uvjeta zadovoljena, moguće je pomoću difuzijskih koeficijenata iz DOSY spektara izračunati postotak kompleksacije pomoću sljedeće jednadžbe:

$$f_{\text{kompleksacija}} = \frac{D_{\text{slobodan}} - D_{\text{vezan}}}{D_{\text{slobodan}} - D_{\beta\text{-CD}}} \quad (9)$$

Uvrštavajući vrijednosti iz tablice 7 dobiven je postotak kompleksacije nabumetona s β -ciklodekstrinom u DMSO- d_6 pri 25 °C koji iznosi oko 20 %. Ovako nizak postotak kompleksacije objašnjava nedostatak intermolekulskih interakcija u NOESY spektru, te nedostatak perturbacije kemijskih pomaka.

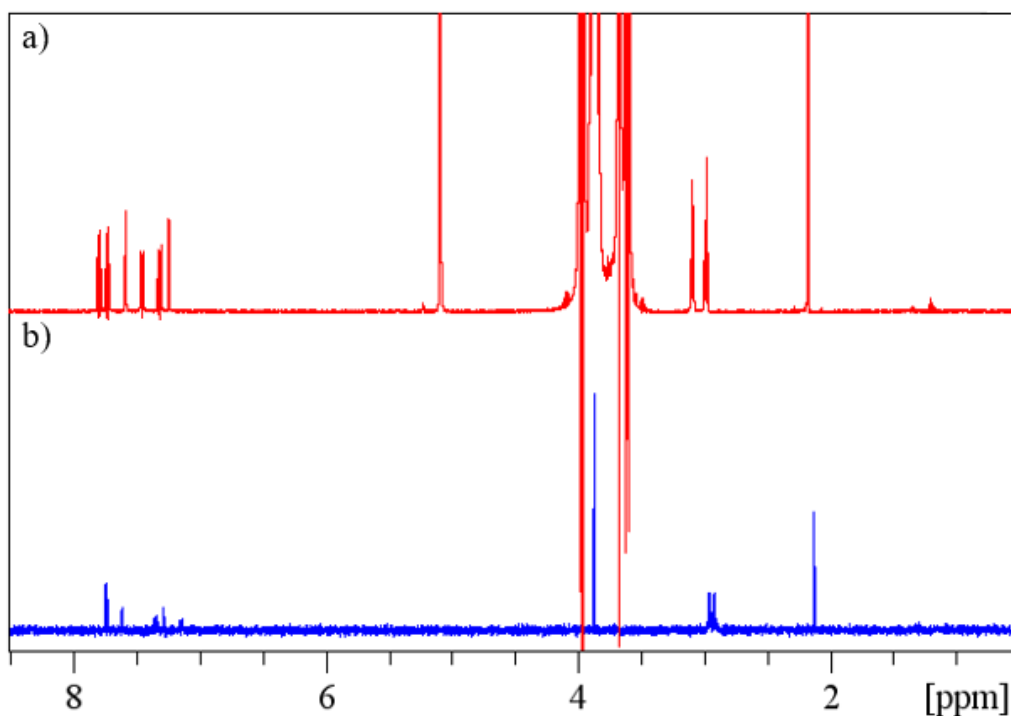
4.2. Analiza kompleksa otopljenog u D₂O

4.2.1. Potpuna asignacija signala i usporedba kemijskih pomaka nabumetona i β -ciklodekstrina

Numeriranje i struktura nabumetona prikazani su na slici 28, a β -ciklodekstrina na slici 29.

Kao i u prethodnom slučaju kad je otapalo bilo DMSO- d_6 , izvorni plan bio je u potpunosti asignirati ^1H i ^{13}C signale slobodnog nabumetona i β -ciklodekstrina u D₂O pomoću ^1H , ^{13}C , HSQCE, HMBC i COSY NMR spektara, te ih usporediti s pomacima nabumetona i β -ciklodekstrina u 1:1 kompleksu otopljenom u D₂O.

Nažalost, zbog niske topljivosti slobodnog nabumetona u D₂O nije bilo moguće snimiti niti jedan drugi NMR spektar osim protonskog (^1H). Valero i suradnici su u svojim eksperimentima u svrhu poboljšanja topljivosti nabumetona koristili smjesu otapala etanol/voda, no zbog pretpostavke⁵ da bi etanol mogao imati afinitet za šupljinu β -ciklodekstrina i time ući u natjecanje s nabumetonom, odabrali smo eksperimente u čistom D₂O. Kako bi dodatno poboljšali kvalitetu protonskog spektra, za uklanjanje signala otapala korištena je *WaterGate* tehnika za supresiju vode. Tako dobiveni spektar (slika 41a) uspoređen je sa spektrom nabumetona u kompleksu (slika 41b). Usporedba je otkrila: a) da je topljivost nabumetona u kompleksu znatno veća od topljivosti slobodnog nabumetona i b) izražene razlike u kemijskim pomacima, posebno kod protona 1-H, 5-H i 8-H (tablica 8). Oba rezultata vode do zaključka da nabumeton i β -ciklodekstrin stvaraju kompleks u D₂O pri 25 °C.

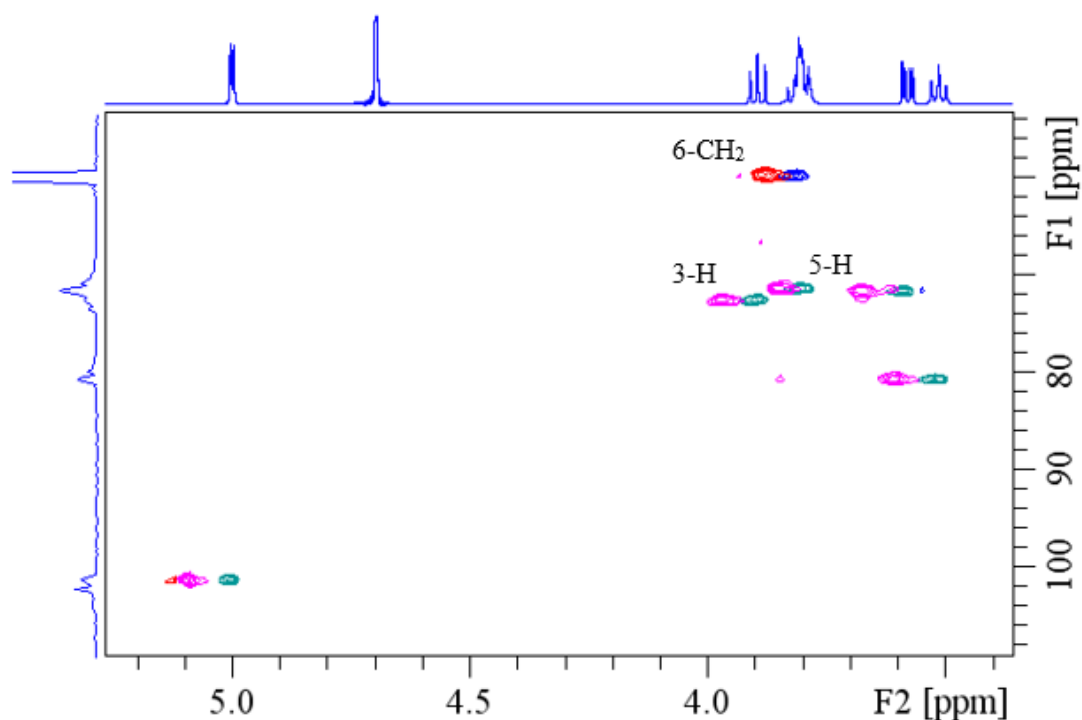


Slika 41. Usporedba protonskog spektra sa supresijom vode (*WaterGate*): a) nabumetona u kompleksu s β -ciklodekstrinom 1:1 i b) slobodnog nabumetona, oba u D_2O pri 25 °C

Tablica 8. Usporedba 1H kemijskih pomaka slobodnog nabumetona i nabumetona u kompleksu s β -ciklodekstrinom, oba u D_2O pri 25 °C, atomi s najvećim razlikama u kemijskim pomacima su označeni zeleno

| Proton | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan nabumetona | | | Nabumetona u kompleksu s β -CD | | |
|--------|---|---------------------|----|------------|--------------------------------------|----|------------|
| | | δ/ppm | | J/Hz | δ/ppm | | J/Hz |
| 4 | -0,051 | 7,846 | d | 8,96 | 7,795 | d | 9,05 |
| 8 | -0,118 | 7,846 | d | 8,96 | 7,728 | d | 9,36 |
| 1 | -0,139 | 7,720 | s | - | 7,581 | s | - |
| 3 | -0,001 | 7,454 | d | 9,10 | 7,453 | dd | 1,69; 8,78 |
| 7 | 0,064 | 7,248 | dd | 2,70; 9,38 | 7,312 | dd | 2,49; 9,24 |
| 5 | -0,155 | 7,393 | d | 2,83 | 7,238 | d | 2,44 |
| 15 | 0,013 | 3,974 | s | - | 3,987 | s | - |
| 11 | 0,026 | 3,063 | m | - | 3,089 | t | 7,10 |
| 12 | -0,043 | 3,019 | m | - | 2,976 | t | 7,26 |
| 14 | -0,054 | 2,228 | s | - | 2,174 | s | - |

Znatno veća topljivost nabumeton/ β -ciklodekstrin kompleksa omogućila je snimanje kvalitetnog HSQCe spektra (slika 42), što je rezultiralo potpunom asignacijom ^1H i ^{13}C kemijskih pomaka β -ciklodekstrina u kompleksu, te njihovu usporedbu s kemijskim pomacima slobodnog β -ciklodekstrina koji je i inače vrlo dobro topiv u vodi. Usporedba je prikazana u tablicama 9 i 10.



Slika 42. Usporedba HSQCe NMR spektara β -ciklodekstrina (plavo/zeleno) i kompleksa β -ciklodekstrina s nabumetonom (crveno/ljubičasto) u D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$

Tablica 9. Usporedba ^1H kemijskih pomaka slobodnog β -ciklodekstrina i β -ciklodekstrina u kompleksu s nabumetonom, oba u D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$, atomi s najvećim razlikama u kemijskim pomacima su označeni zeleno

| Proton | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan βCD | | | $\beta\text{-CD}$ u kompleksu s nabumetonom | | |
|--------|---|---------------------------|---|---------------|---|---|---------------|
| | | δ/ppm | | J/Hz | δ/ppm | | J/Hz |
| 1 | -0,005 | 5,091 | d | 3,46 | 5,086 | d | 3,85 |
| 3 | -0,024 | 3,989 | t | 10,08 | 3,965 | t | 9,86 |
| 6 | -0,022 | 3,901 | m | - | 3,879 | m | - |
| 5 | -0,033 | 3,881 | d | 2,47 | 3,848 | d | 3,74 |

| | | | | | | | |
|---|--------|-------|----|-------------|-------|----|-------------|
| 2 | -0,005 | 3,673 | dd | 3,58; 10,12 | 3,668 | dd | 3,82; 10,30 |
| 4 | -0,002 | 3,607 | t | 9,43 | 3,605 | t | 9,57 |

Tablica 10. Usporedba ^{13}C kemijskih pomaka slobodnog β -ciklodekstrina i β -ciklodekstrina u kompleksu s nabumetonom, u D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$

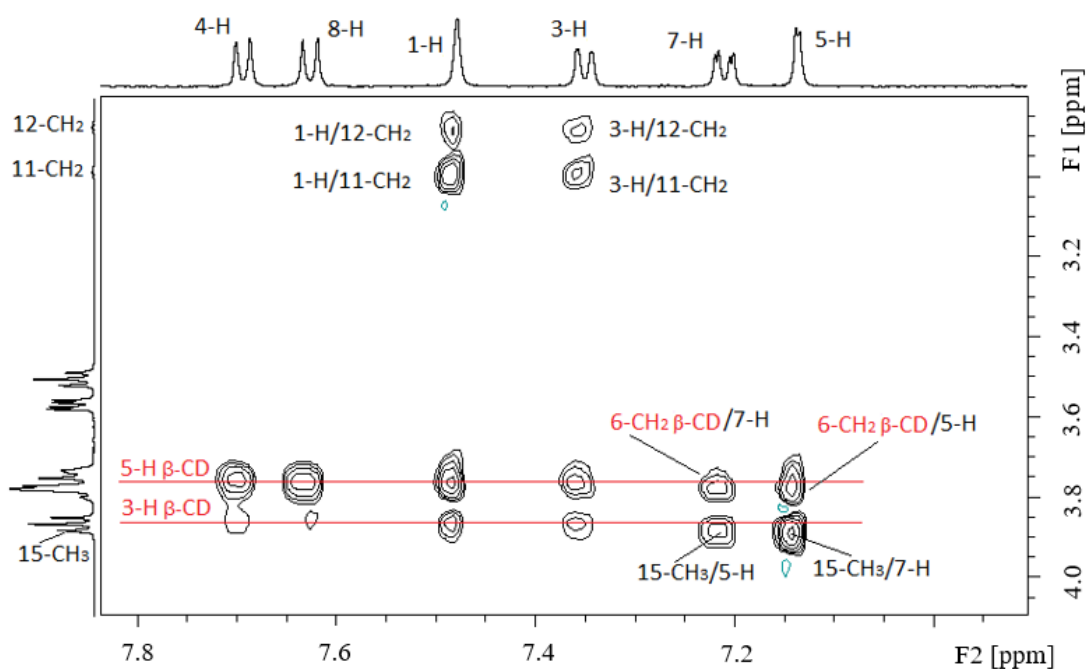
| Ugljik | $\Delta\delta$ (slobodan i u kompleksu) | Slobodan β -CD | β -CD u kompleksu s nabumetonom |
|--------|---|----------------------|---------------------------------------|
| | | δ/ppm | δ/ppm |
| 1 | 0,01 | 101,79 | 101,80 |
| 4 | -0,05 | 81,06 | 81,01 |
| 5 | 0,03 | 73,01 | 73,04 |
| 3 | -0,02 | 72,01 | 71,99 |
| 2 | 0,02 | 71,74 | 71,76 |
| 6 | -0,08 | 60,22 | 60,14 |

Iako se ^{13}C kemijski pomaci β -ciklodekstrina nisu bitno promijenili nastajanjem kompleksa (tablica 10), u tablici 9 i na slici 42 jasno je vidljiva značajna promjena u ^1H kemijskim pomacima 3-H, 5-H te 6- CH_2 β -ciklodekstrina. Ova promjena je snažan pokazatelj da se stvorio kompleks između nabumetona i β -ciklodekstrina u D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$. Budući da se promjena događa na atomima koji su smješteni na unutarnjoj strani hidrofobne šupljine β -ciklodekstrina (3-H i 5-H), možemo zaključiti da je nabumeton ušao u šupljinu i nastao je inkluzijski kompleks što se podudara s dosad objavljenim rezultatima.^{4,5} Nadalje, bitno je istaknuti i veliku promjenu u kemijskom pomaku 6- CH_2 atoma. U dosadašnjoj literaturi koja pokriva eksperimentalne NMR podatke o kompleksu nabumetona i β -ciklodekstrina^{4,5} ova promjena nije navedena, no ona bi mogla biti posljedica stvaranja vodikove veze između 6- CH_2OH β -ciklodekstrina i karbonilnog kisika nabumetona, kao što su sugerirali Suarez i Diaz na osnovu rezultata molekulske dinamike.⁴⁴ Ukoliko je to zaista tako, ova promjena u ^1H kemijskom pomaku 6- CH_2 predstavlja prvi eksperimentalni dokaz da je nabumeton u šupljini β -ciklodekstrina orijentiran svojim butan-2-on supstituentom prema širem otvoru šupljine β -ciklodekstrina.

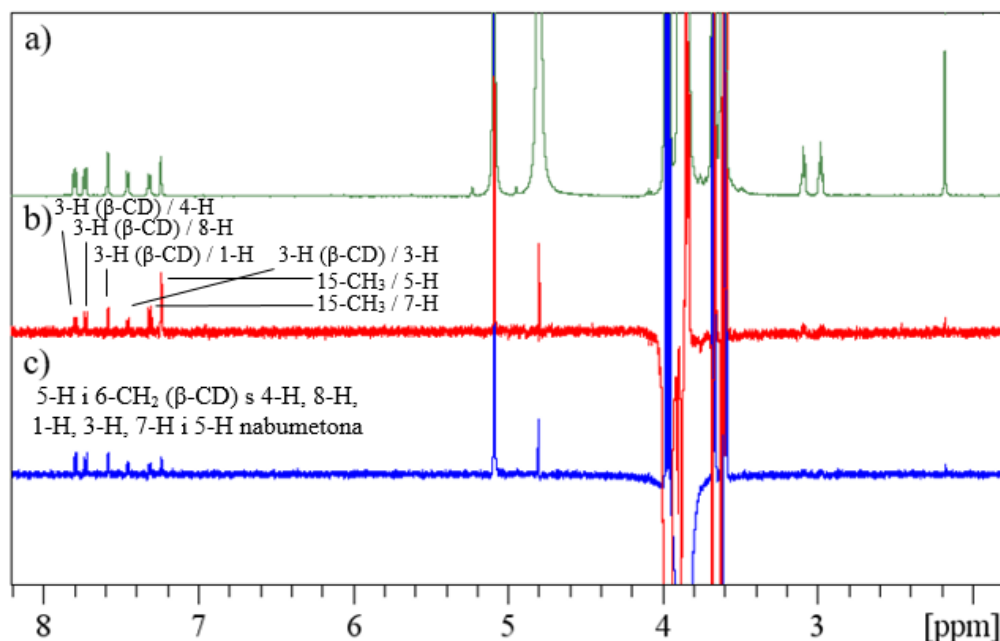
4.2.2. Analiza selektivnih 1D i 2D ROE spektara

Za razliku od otapala DMSO- d_6 gdje su korišteni 1D i 2D NOE spektri za identifikaciju intermolekulskih interakcija kroz prostor, u slučaju otapala D_2O , generirani NOE signali prolaze kroz regiju intenziteta oko nule (slabo pozitivni, nula ili slabo negativni, engl. „zero crossing“)⁴⁰, pa su umjesto njih korišteni 1D i 2D ROE (ROESY) NMR spektri. Karakteristika tih spektara je da su sve intermolekulske interakcije kroz prostor uvijek pozitivne, odnosno, suprotnog predznaka od dijagonale, tako da se kompleksacija nije mogla pratiti promjenom predznaka pozitivnih NOE signala male molekule u negativne NOE signale nakon vezanja u kompleks.

Na slici 43 nalazi se dio ROESY spektra 1:1 kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina koji prikazuje četiri trivijalne intramolekulske interakcije nabumetona (1-H i 3-H s prostorno bliskim protonima u butan-2-on supstituentu 11- CH_2 i 12- CH_2), te seriju intermolekulskih interakcija nabumetona i β -ciklodekstrina. 5-H β -ciklodekstrina pokazuje interakcije s 4-H, 8-H, 1-H, 3-H i vjerojatno 5-H, dok 6- CH_2 β -CD ima interakciju sa 7-H i 5-H nabumetona. 3-H β -ciklodekstrina je u ROE kontaktu s 4-H, 8-H, 1-H i 3-H nabumetona. Drugim riječima, 3-H i 5-H koji se nalaze na suprotnim stranama unutrašnje šupljine β -CD, oba imaju interakcije s gotovo svim protonima u naftalenskom prstenu.

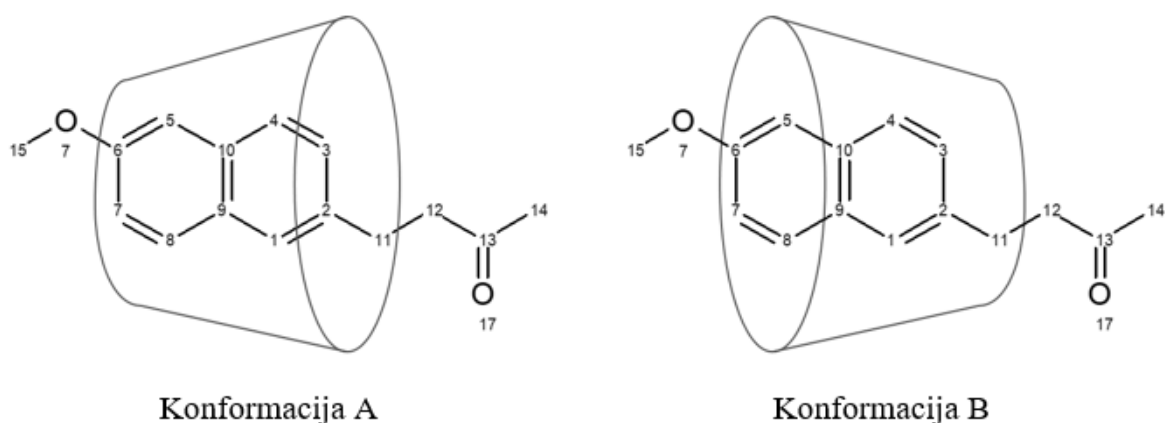


Slika 43. Dio ROESY spektra koji prikazuje inermolekulske interakcije nabumetona s β -ciklodekstrinom u 1:1 kompleksu, snimljeno u D_2O pri 25 °C



Slika 44. Usporedba NMR spektara kompleksa nabumetona i β -ciklodekstrina a) ^1H , b) 1D ROE spektra sa selektivnom pobudom na 3,97 ppm (3-H β -CD i 15- CH_3 nabumetona), c) 1D ROE spektra sa selektivnom pobudom na 3,85 ppm (5-H i 6- CH_2 β -CD) u D_2O pri 25 $^\circ\text{C}$

Kod 1D ROE spektra namjera je bila selektivno pobuditi 3-H atom iz β -ciklodekstrina kako bi se detaljnije ispitale interakcije koje taj proton ostvaruje s protonima nabumetona, no budući 15- CH_3 iz nabumetona ima vrlo sličan kemijski pomak, pobuda na frekvenciji 3,97 ppm zahvatila je oba signala. Kao što je vidljivo na slici 44b, u spektru su vidljive interakcije sa svim aromatskim protonima nabumetona, od kojih su 5-H i 7-H nabumetona vjerojatno intramolekulske interakcije s 15- CH_3 , dok su ostale intermolekulske interakcije s β -ciklodekstrinom. Slika 44c prikazuje 1D ROE spektar s pobudom na 3,85 ppm gdje su pobuđeni 5-H i 6- CH_2 atomi β -ciklodekstrina te je vidljivo da dolazi do interakcija s cijelim naftalenskim dijelom nabumetona. Ovi rezultati odgovaraju rezultatima analize ROESY spektra.



Slika 45. Dvije konformacije nabumetona u šupljini ciklodekstrina

Literaturni pregled otkriva da su raniji radovi sugerirali postojanje dvije konformacije, nastale kao rezultat jednako vjerojatnog ulaska nabumetona u β -ciklodekstrin s obje strane šupljine^{4,5}. U prvoj (slika 45, konformacija A) je 15-CH₃ nabumetona okrenut prema užem otvoru β -CD (blizina primarnih hidroksilnih skupina), a u drugoj (slika 45, konformacija B) prema širem (blizina 6-CH₂ β -CD). Chen i suradnici, na osnovu molekulskog modeliranja u sklopu istraživanja afiniteta vezanja različitih lijekova za β -CD, zaključuju da je 15-CH₃ skupina nabumetona orijentirana prema užem dijelu šupljine β -CD, dok je butan-2-on supstituent okrenut prema širem dijelu, isturen prema otapalu i slobodno rotira izvan β -CD⁴⁵ što odgovara konformaciji A. Interesantan rezultat molekulskog modeliranja predstavljaju Bensouilah i suradnici, koji su izračunali da obje konformacije imaju negativnu energiju kompleksiranja⁴⁶, čime je potvrđeno da je inkluzija nabumetona u β -ciklodekstrin termodinamički povoljan proces, bez obzira na način na koji se dogodio. Nadalje, otkrivaju da konformacija koja ima 15-CH₃ okrenut prema užem otvoru, a butan-2-on prema širem (konformacija A) ima za -0.98 kcal/mol nižu energiju u odnosu na konformaciju B, te da je ona preferirana. Isto tako, napominju da naftalenski prsten nabumetona ostvaruje jake van der Waalsove interakcije i slabe intermolekulske vodikove veze sa šupljinom β -CD, no ne izdvajaju niti jednu vodikovu vezu posebno. Na kraju, Suarez i suradnici molekulskom dinamikom pronalaze da 40 % od ukupno generiranih konformacija odgovara konformaciji A s butan-2-on-om u blizini šireg otvora, te postuliraju nastajanje vodikove veze između karbonilne skupine nabumetona i 6-CH₂OH skupine u β -CD (C=O...H₂O...HO-CH₂).⁴⁴

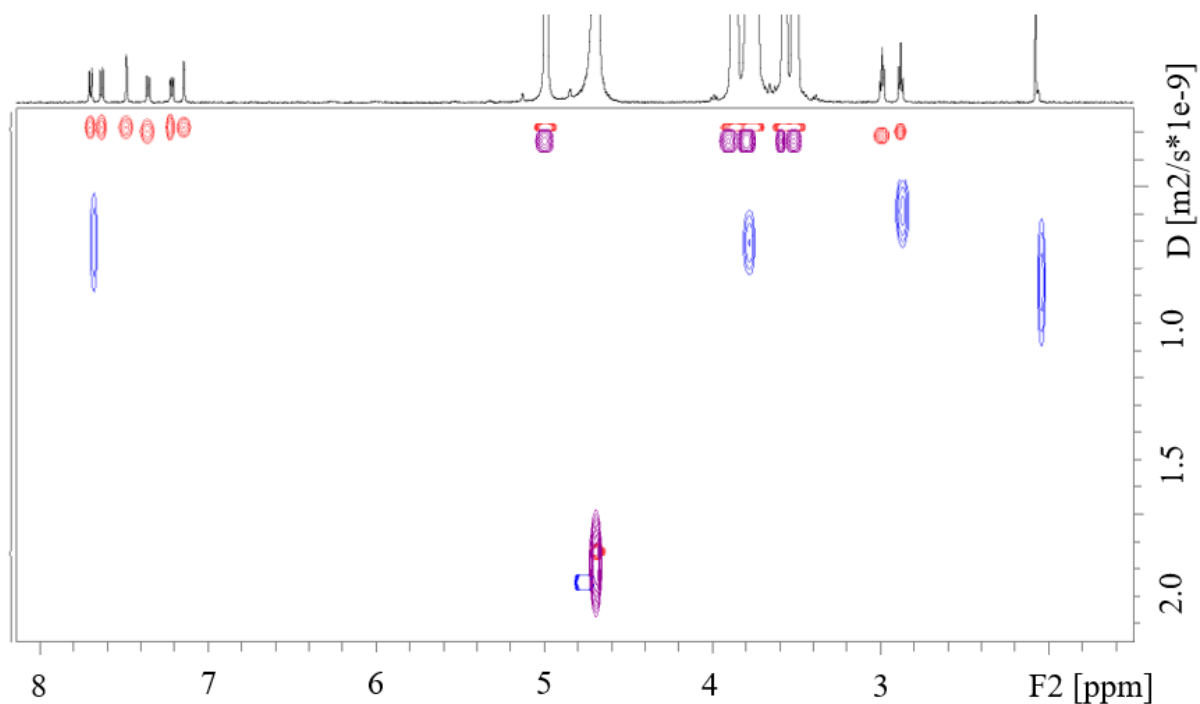
Rezultati analize ROESY i 1D ROE spektara koji uključuju intermolekulske interakcije 5-H i 3-H β -CD s gotovo svim aromatskim protonima u naftalenskom prstenu nabumetona mogući su jedino ako istovremeno u otopini postoje obje konformacije kompleksa, i to u brzom izmjeni. Kao takvi, predstavljaju eksperimentalni dokaz postojanja takve ravnoteže i savršeno se slažu s pretpostavkama iz literaturnog pregleda.

4.2.3. Analiza DOSY spektara

Difuzijska spektroskopija (DOSY) korištena je za određivanje difuzijskih koeficijenata slobodnih molekula nabumetona i β -ciklodekstrina, kao i pretpostavljenog kompleksa nabumeton/ β -ciklodekstrin. Postupak obrade podataka i izračuni jednaki su onima ranije primijenjenim i opisanim u slučaju otapala DMSO- d_6 . Dobiveni difuzijski koeficijenti (tablica 11) iskorišteni su za izračun postotka kompleksacije, a grafički prikaz preklopljenih DOSY spektara prikazan je na slici 46.

Tablica 11. Difuzijski koeficijenti (D) izračunati iz DOSY eksperimenata pri 25 °C u D₂O

| | D / m² s⁻¹ | Standardna devijacija / m² s⁻¹ |
|--|---|---|
| Nabumeton-slobodan | $6,52 \cdot 10^{-10}$ | $0,07 \cdot 10^{-10}$ |
| Nabumeton-vezan | $2,63 \cdot 10^{-10}$ | $0,08 \cdot 10^{-10}$ |
| β-ciklodekstrin-slobodan | $2,52 \cdot 10^{-10}$ | $0,02 \cdot 10^{-10}$ |
| β-ciklodekstrin-vezan | $2,53 \cdot 10^{-10}$ | $0,03 \cdot 10^{-10}$ |



Slika 46. Preklapanje DOSY spektara slobodnog nabumetona (plavo), slobodnog β -ciklodekstrina (ljubičasto) i kompleksa nabumeton/ β -ciklodekstrin (crveno) pri 25 °C u D_2O

I u ovom slučaju, kao i kod $DMSO-d_6$ pomoću podataka iz tablice 11 i jednadžbe (9) moguće je izračunati postotak kompleksacije. Uvrštavajući vrijednosti iz tablice 11 dobiven je postotak kompleksacije nabumetona s β -ciklodekstrinom u D_2O pri 25 °C koji iznosi oko 97 %.

§ 5. ZAKLJUČAK

Spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) uspješno je potvrđena strukturna formula kompleksa, te je dokazan njegov nastanak. Eksperimentalno dobiveni rezultati predstavljaju nastavak i dopunu prijašnjih istraživanja opisanih u literaturi.

U prvom dijelu istraživanja, iz izvedenih eksperimenata može se zaključiti da je u danim uvjetima (DMSO- d_6 , 25 °C) došlo do stvaranja inkluzijskog kompleksa nabumeton/ β -ciklodekstrin, ali u vrlo malom postotku. Usporedba kemijskih pomaka u kojoj nema značajne perturbacije te NOESY i ROESY analize to dokazuju. Također, postotak kompleksacije izračunat iz DOSY NMR spektra iznosio je tek oko 20 %. Uzrok tako malom postotku stvaranja kompleksa mogao bi biti u solvataciji molekula nabumetona koja otežava ulazak lijeka u šupljinu β -ciklodekstrina. Jednako tako, moguće je da i sam DMSO- d_6 ulazi u šupljinu β -ciklodekstrina, pa na taj način ulazi u natjecanje s molekulama nabumetona za isti položaju u β -ciklodekstrinu.

Drugi dio istraživanja, dao je više informacija o modelu kompleksiranja nabumetona i ciklodekstrina. Koristeći podatke dobivene eksperimentima difuzijske spektroskopije NMR (DOSY) izračunat je postotak kompleksacije koji iznosi oko 97 %. Usporedba kemijskih pomaka (^1H i ^{13}C NMR spektri) slobodnih vrsta i kompleksa otkrila je najveće razlike u kemijskim pomacima protona naftalenskog prstena nabumetona, kao i protona 3-H i 5-H koji se nalaze u šupljini β -ciklodekstrina, što svjedoči o nastajanju inkluzijskog kompleksa. Uz njih, najveći pomak je primijećen kod skupine 6- CH_2 β -ciklodekstrina, što je vjerojatno prvi eksperimentalni dokaz postojanja vodikove veze između karbonilne skupine nabumetona i 6- CH_2OH skupine u β -CD ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}_2\text{O}\cdots\text{HO}-\text{CH}_2$). Identifikacija intermolekulskih interakcija kroz prostor (1D i 2D ROE NMR) rezultirala je otkrivanjem interakcija oba 3-H i 5-H β -ciklodekstrina s gotovo svim signalima naftalenskog prstena nabumetona, što svjedoči o tome da su u kompleksu prisutne obje konformacije prethodno sugerirane na osnovu analize protonskih spektara i molekuskog modeliranja. U obje konformacije naftalenski prsten je udobno smješten unutar šupljine β -ciklodekstrina, dok su oba supstituenta na rubovima, isturena prema otapalu.

Ovim istraživanjem, spektroskopija NMR se još jednom pokazala kao dobar izbor ne samo kod istraživanja struktura organskih spojeva, već kao jedan od načina za otkrivanje

mehanizma nastanka kompleksnih spojeva inkluzijom molekule “gosta” u molekulu “domaćina”.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. C. Williams, M. Mann, R. DuBois, *Oncogene* **18** (1999) 7908–7916.
2. H. A. Friedel, H. D. Langtry, M. M. Buckley, *Drugs* **45** (1993) 131–156.
3. H. A. Friedel, P. A. Todd, *Drugs* **35** (1988) 504–524.
4. M. Valero, S. M. B. Costa, J. R. Ascenso, M. M. Velázquez, L. J. Rodríguez, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **35(4)** (1999) 663–677.
5. N. Goyenechea, M. Sánchez, I. Vélaz, C. Martín, M. C. Martínez-Ohárriz, G. González-Gaitano, *Luminescence* **16(2)** (2001) 117–127.
6. A. Villiers, *Compt. Rend. Acad. Sci.* **112** (1891) 536–538.
7. K. Freudenberg, R. Jacobi, *Ann. Chem.* **518** (1935) 102–108.
8. F. Cramer, *Einschlussverbindungen*, Springer-Verlag, Berlin, 1954.
9. M. L. Hyneck, *J. Rheumatol.* **19** (1992) 20–4.
10. G. Crini, *Chem. Rev.* **114 (21)** (2014) 10940–10975.
11. M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug, Deliv. Rev.* **59(7)** (2007) 645–666.
12. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **535(1-2)** (2018) 272–284.
13. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R. K. Khar, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **6(2)** (2005) 329–357.
14. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/51/Cyclodextrin.svg> (datum pristupa: 1. listopada 2021.)
15. L. R. Lumholdt, R. Holm, E. B. Jorgensen, K. Larsen, *Carbohydr. Res.* **362** (2012) 56–61.
16. L.R. Lumholdt, J. Pipkin, V. J. Antle, *The reaction between α -amylase and captisol and other SBE-cyclodextrins*, 4. Europska konferencija o ciklodekstrinima, Lille, France (2015).
17. H. Banović, *Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 9.
18. R. A. Rajewski, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **85** (1996) 1142–1168.
19. V. J. Stella, V. M. Rao, E. A. Zannou, V. Zia, *Adv. Drug. Deliv.* **36** (1999) 3–16.
20. K. H. Fromming, R. Sandman, I. Weyermann, *Deutsch. Apoth. Zg.* **112** (1972) 707.
21. J. Szejtli, *J. Med. Res. Rev.* **14(3)** (1994) 353–386.
22. S.V. Kurkov, T. Loftsson, T., *Int. J. Pharm.* **453(1)** (2013) 167–180.
23. J. Martín, E. J. Díaz-Montaña, A. G. Asuero (2018)
<https://www.intechopen.com/chapters/58579> (datum pristupa: 17. listopada 2021.)

24. V. J. Stella, R. A. Rajewski, *Pharm. Res.* **14**(5) (1997) 556–567.
25. H. Pfeifer, *Magn. Reson. Chem.* **37**(13) (1999), 154–159.
26. T. D. W. Claridge, Chapter 2 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 13–45.
27. https://www.researchgate.net/figure/Depiction-of-the-nuclear-magnetic-moment-of-a-spinning-nucleus_fig2_338492358 (datum pristupa: 23. listopada 2021.)
28. T. G. Kraljević, *Određivanje struktura organskih spojeva*, nastavni tekst, str. 32.
29. T. D. W. Claridge, Chapter 2 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 14.
30. I. Škorić, *Molekulska spektroskopija*, nastavni tekst, str. 70.
31. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/orgpage/nmr.htm> (datum pristupa 15. studenoga 2021.)
32. T. D. W. Claridge, Chapter 3 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 45–48.
33. https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/11b_AK2_NMR_seminar1.pdf (datum pristupa 15. studenoga 2021.)
34. N. Marjanović, *Konformacijska analiza makrocikličkih molekula metodama spektroskopije NMR i molekuskog modeliranja*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 9–19.
35. T. D. W. Claridge, Chapter 4 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 111–142.
36. T. D. W. Claridge, Chapter 5 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 147–159.
37. A. Čikoš, *Konformacijska analiza 8-metilenoleandomicina spektroskopijom NMR*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2003, str. 30.
38. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/2d/cosy/cosy.html> (datum pristupa 16. studenoga 2021.)
39. K. Pičuljan, T. Jednačak, N. Cindro, P. Novak, *Osnovni priručnik za rad sa spektrometrom NMR visoke rezolucije*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
40. T. D. W. Claridge, Chapter 8 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 276–305.

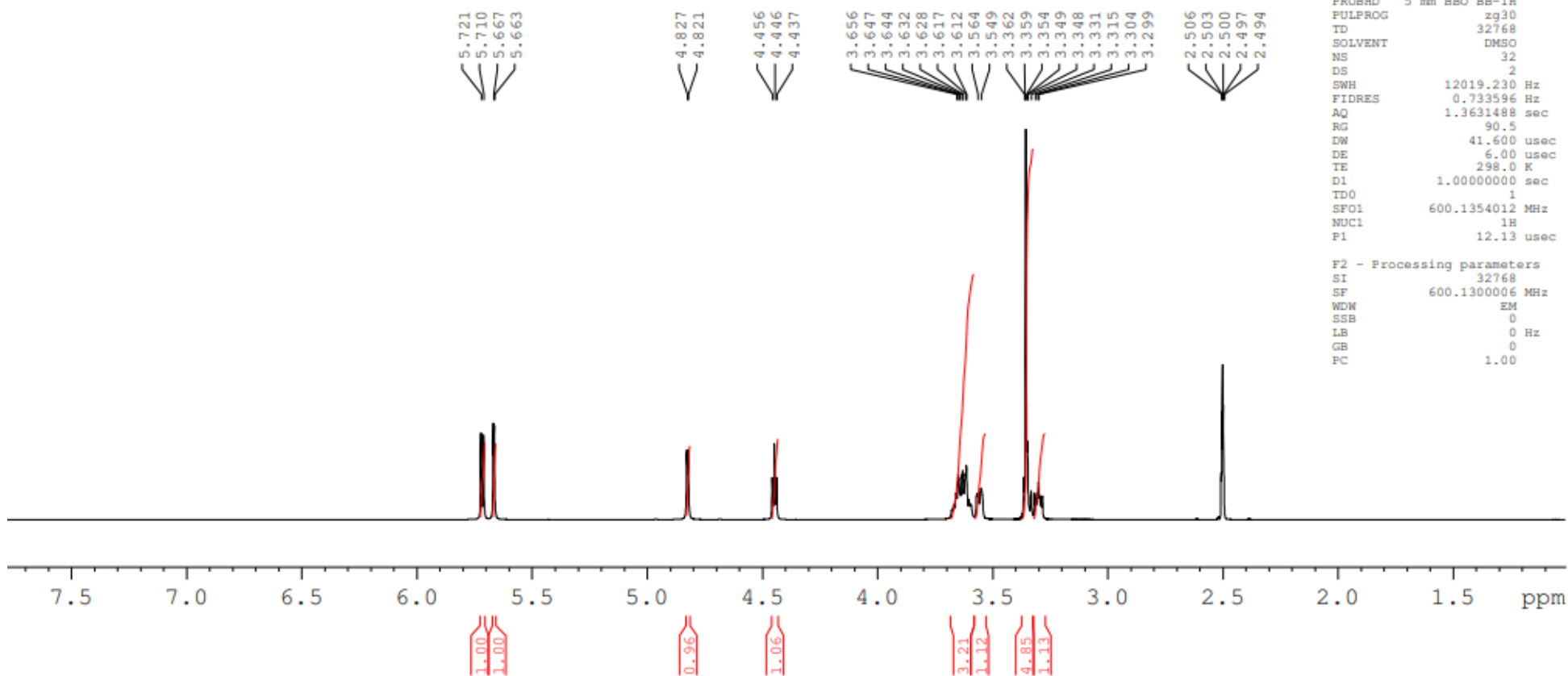
41. T. D. W. Claridge, Chapter 9 – Introducing high-resolution NMR, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, New York, 1999, str. 368–370.
42. <http://nmrweb.chem.ox.ac.uk/Data/Sites/70/userfiles/pdfs/diffusion-nmr.pdf> (datum pristupa: 16. studenoga 2021.)
43. <https://sci-hub.st/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.025.11> (datum pristupa: 12. prosinca 2021.)
44. D. Suárez, N. Díaz, *Phys. Chem.* **19(2)** (2017) 1431–1440.
45. W. Chen, C.-E. Chang, M. K. Gilson, *Biophys. J.* **87(5)**, (2004) 3035–3049.
46. N Bensouilah, B. Boutemeur-Kheddis, H. Bensouilah, I. Meddour, M. Abdaoui, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **87(1-2)** (2017) 191–206.

§ 7. DODATAK

U dodatku se nalaze spektri s eksperimentalnim uvjetima:

1. ^1H , ^{13}C , COSY, HSQCe, HMBC i NOESY β -ciklodekstrina u DMSO- d_6
2. ^1H , ^{13}C , COSY, HSQCe, HMBC i NOESY nabumetona u DMSO- d_6
3. ^1H , ^{13}C , COSY, HSQCe, HMBC i NOESY kompleksa u DMSO- d_6
4. ^1H sa supresijom vode i HSQCe β -ciklodekstrina u D_2O
5. ^1H sa supresijom vode nabumetona u D_2O
6. ^1H sa supresijom vode, HSQCe i ROESY kompleksa u D_2O

bcd
24.8 mg / 600 ul
DMSO



Slika D1. ¹H NMR spektar β-ciklodekstrina u DMSO-d₆ na 25 °C

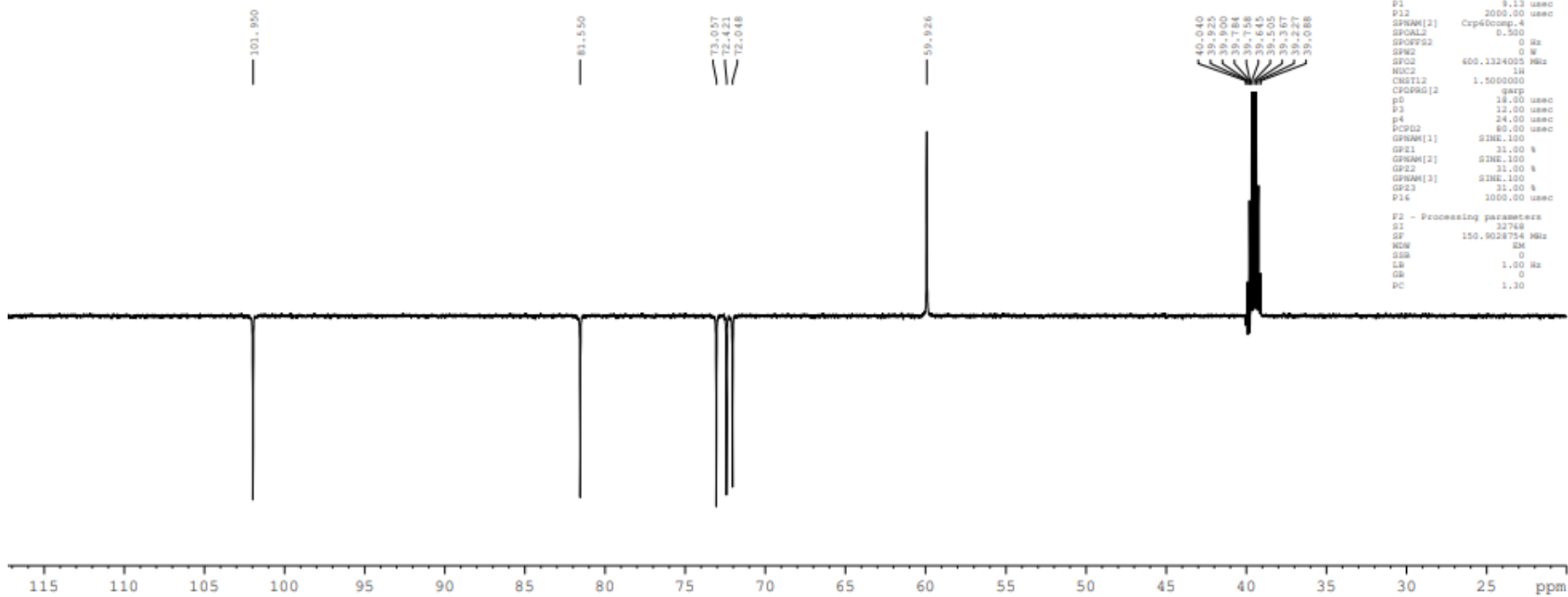
bcd
24.8 mg / 600 ul
DMSO

```

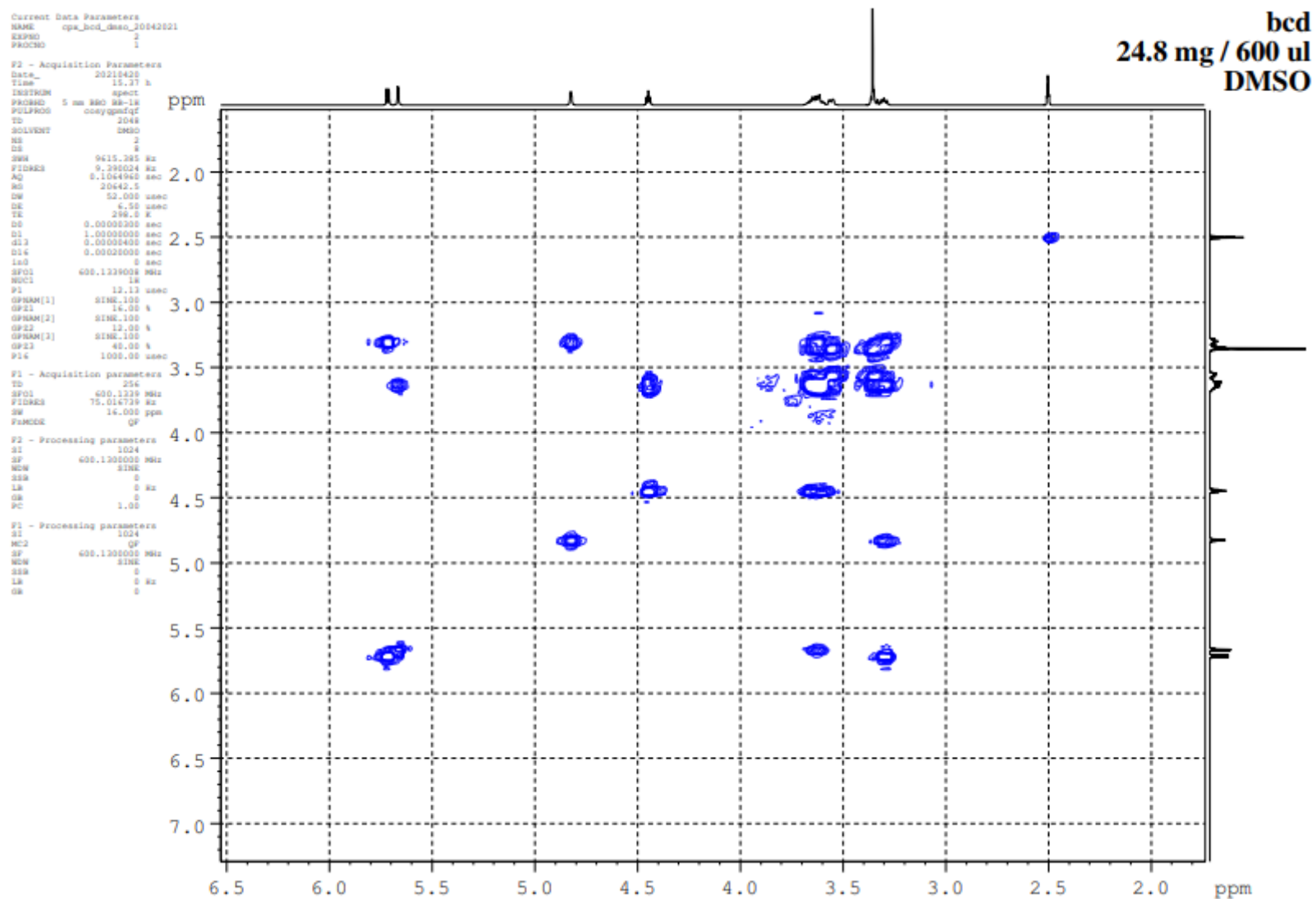
Current Data Parameters
NAME      cpa_bcd_dmsc_2042021
EXPNO     5
PROCNO    1

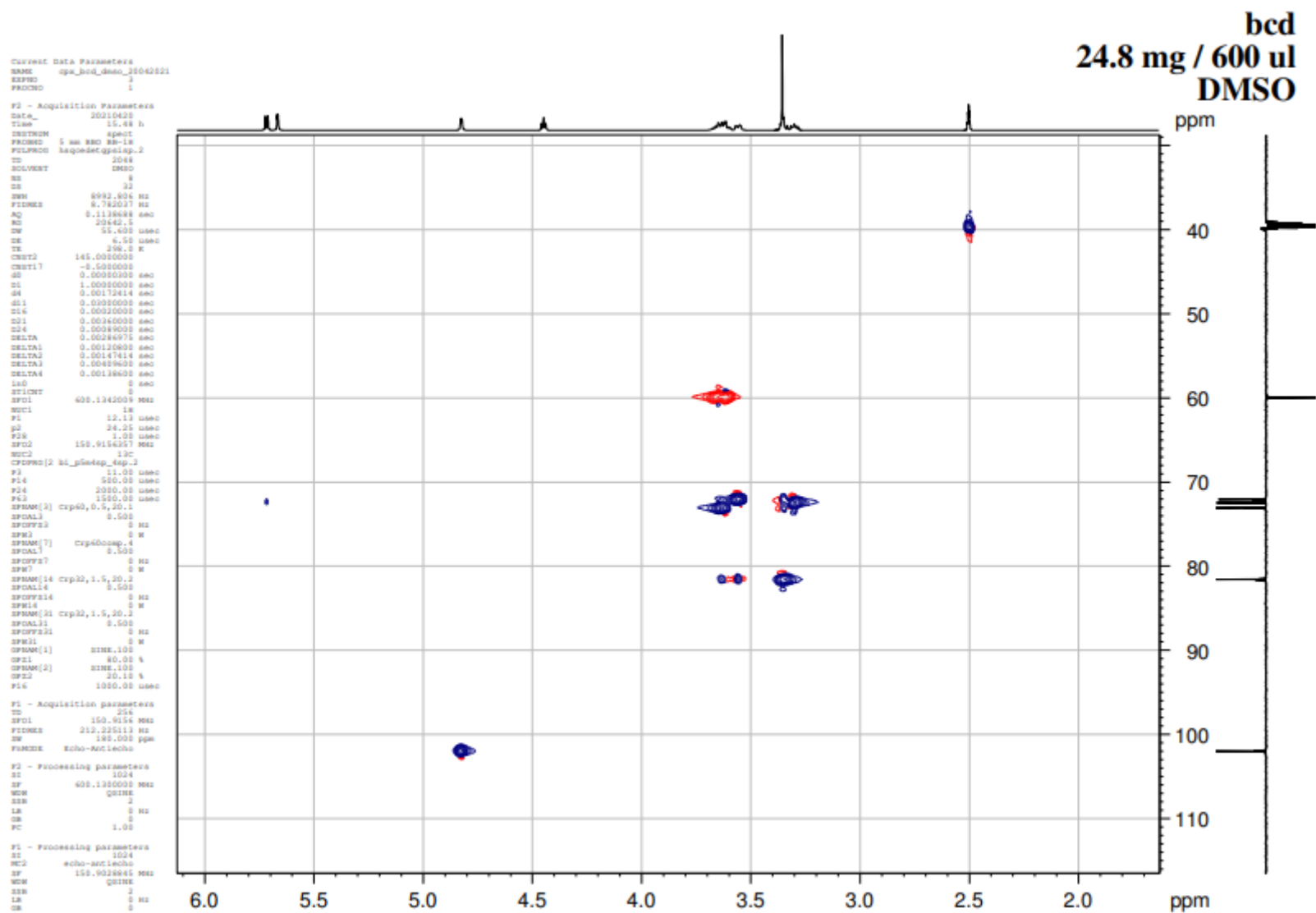
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210420
Time      17.49 h
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO BB-1H
PULPROG   deptqppp.2
TE        472.18
SOLVENT   DMSO
NS         1874
DS         4
SWH        39370.078 Hz
FIDRES    1.664882 Hz
AQ         0.5993226 sec
RG         23270.5
DW         12.700 usec
DE         6.50 usec
TE         298.0 K
CNS12     145.000000
D1         1.00000000 sec
d2         0.00344828 sec
d12        0.00020000 sec
D14        0.00030000 sec
D28        0.50000000 sec
DELTA     0.00000762 sec
DELTA1     0.00238140 sec
DELTA2     0.00235740 sec
DELTA3     0.00234828 sec
DELTA4     0.49997601 sec
TD         128
SFO1       150.9178988 MHz
NUC1        13C
P1          8.13 usec
P2         2000.00 usec
SFO12[2]   Crp60comp.4
SFO12      0.500
SFO12[2]   0 Hz
SFO2       600.1324005 MHz
NUC2        1H
CNS12      1.50000000
CPDPRG[2]  garp
p0          18.00 usec
p2          15.00 usec
p4          24.00 usec
PCPD2      80.00 usec
GPRAM[1]   SINE.100
GF21       31.00 %
GPRAM[2]   SINE.100
GF22       31.00 %
GPRAM[3]   SINE.100
GF23       31.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI          32768
SF          150.9028754 MHz
RG          0
SR          0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1.30
    
```

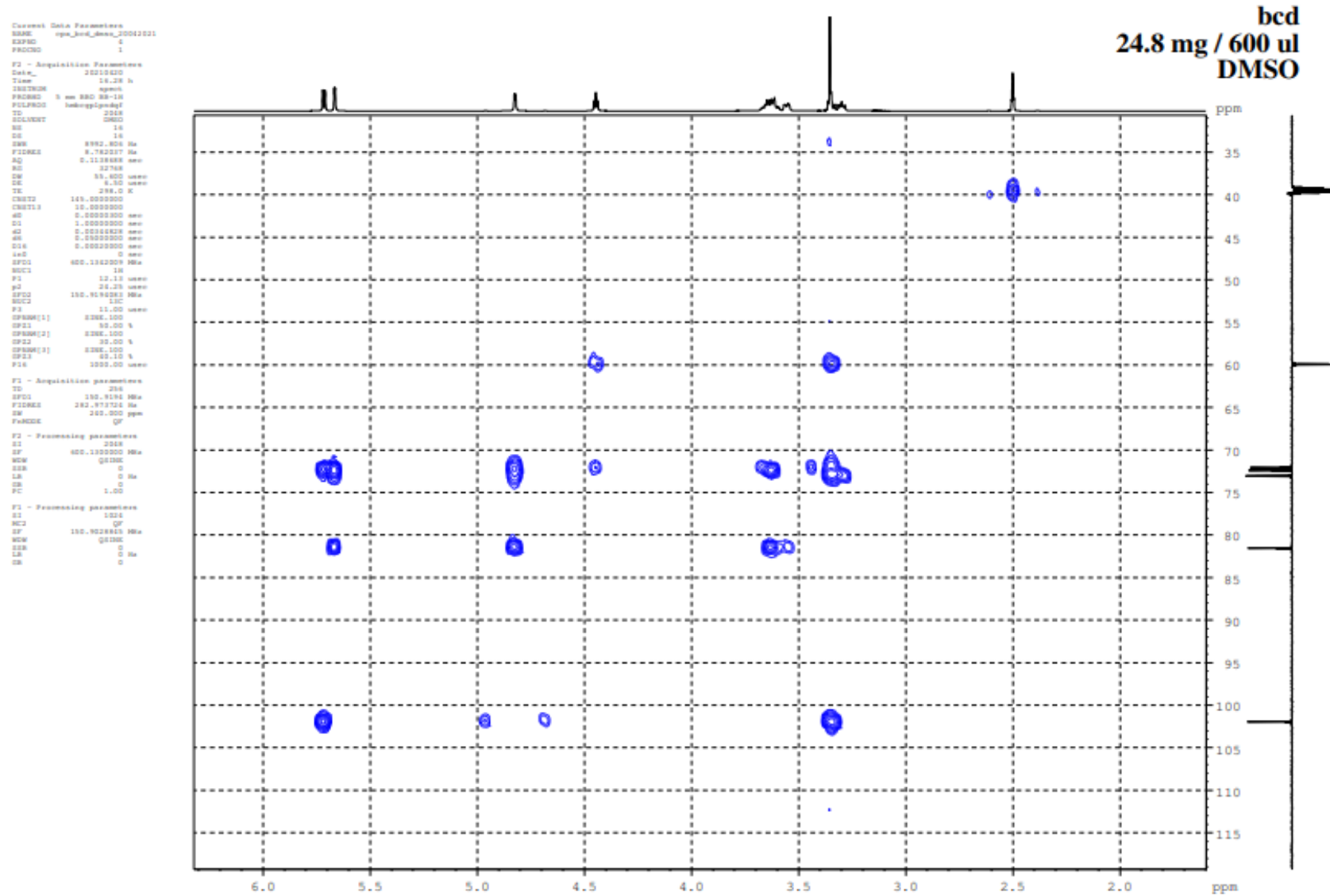


Slika D2. ¹³C NMR spektar β-ciklodekstrina u DMSO-d₆ na 25 °C

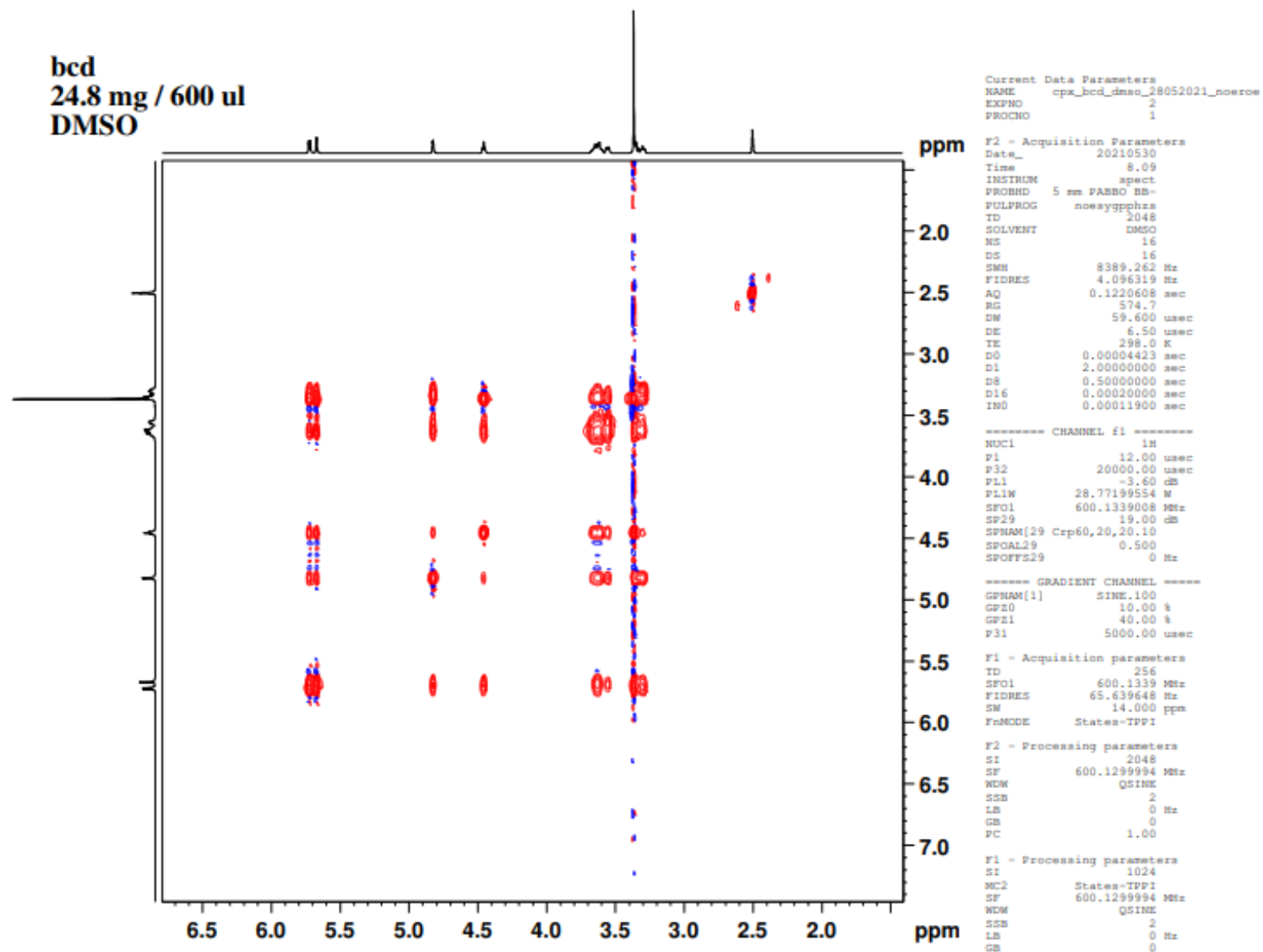
Slika D3. COSY NMR spektar β -ciklodekstrina u DMSO- d_6 na 25 °C



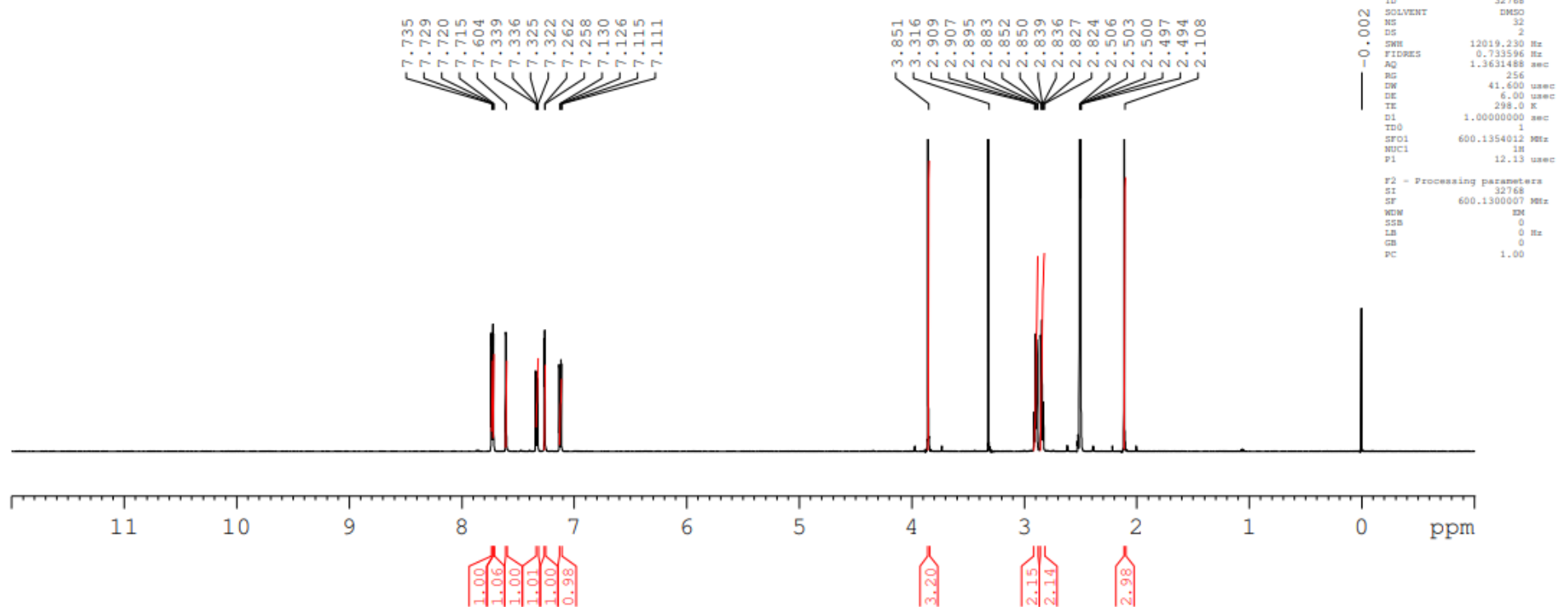
Slika D4. HSQC NMR spektar β -ciklodekstrina u DMSO- d_6 na 25 °C



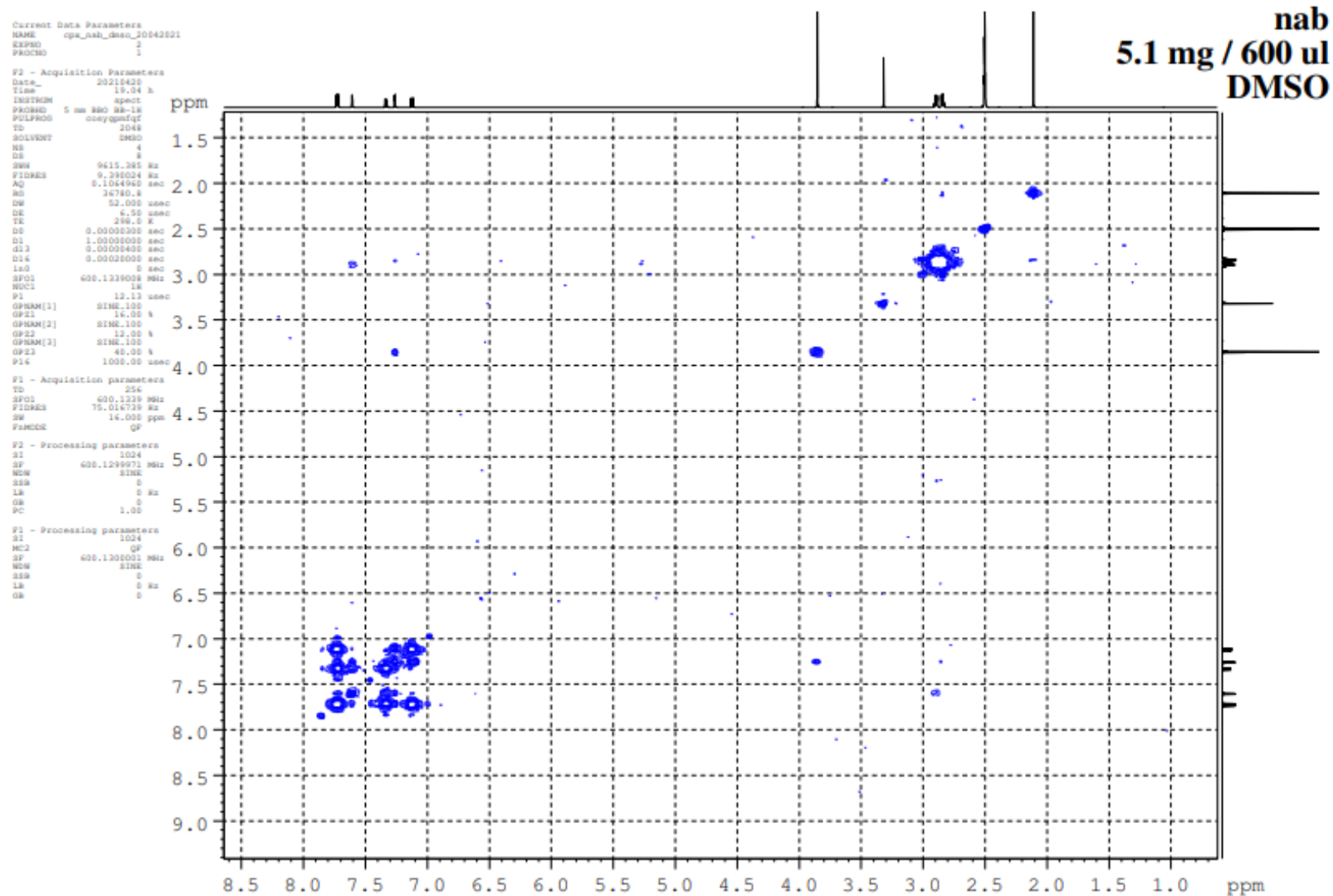
Slika D5. HMBC NMR spektar β -ciklodekstrina u DMSO-d₆ na 25 °C

Slika D6. NOESY NMR spektar β -ciklodekstrina u DMSO- d_6 na 25 °C

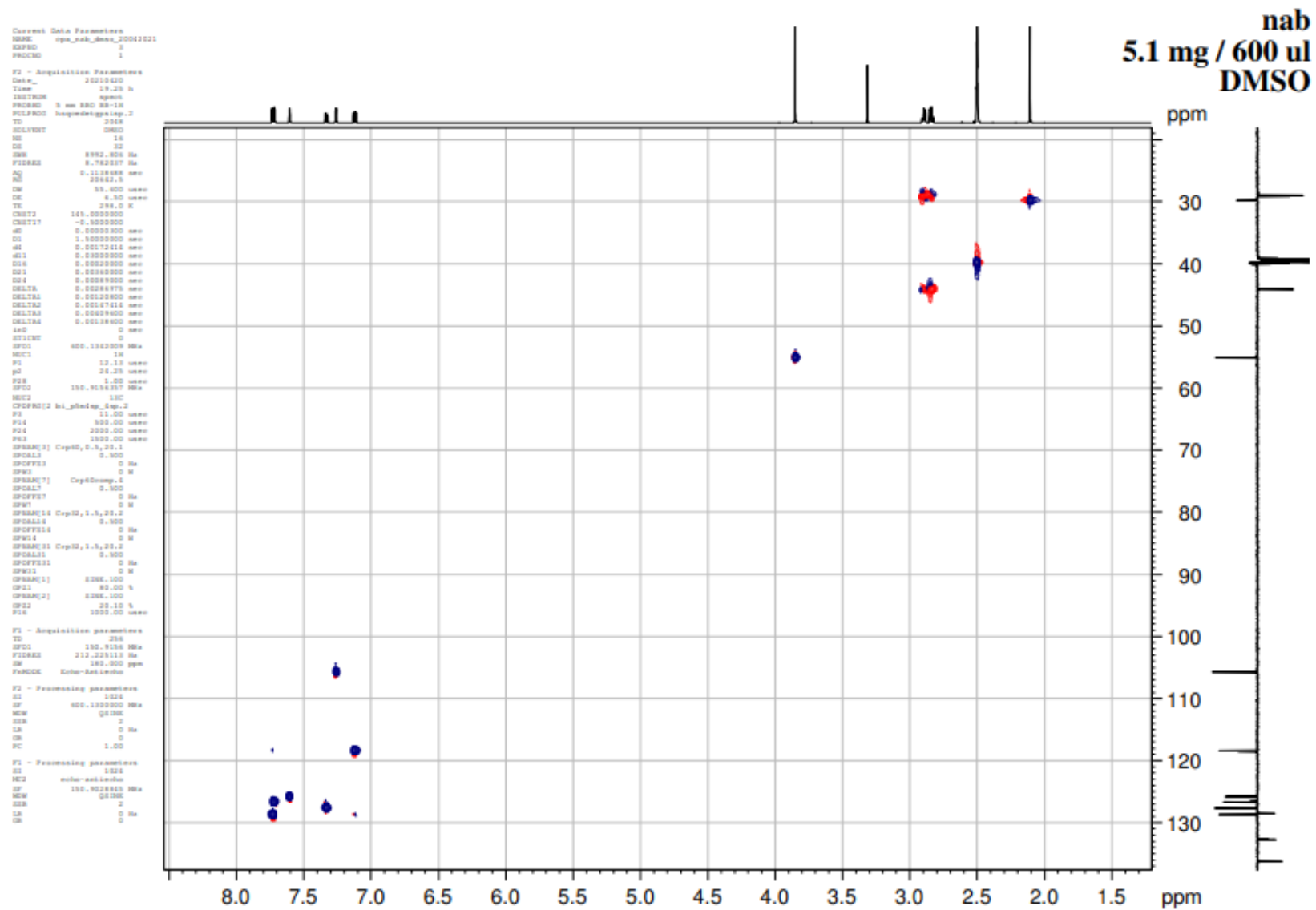
nab
5.1 mg / 600 ul
DMSO



Slika D7. ^1H NMR spektar nabumetona u DMSO- d_6 na 25 °C



Slika D9. COSY NMR spektar nabumetona u DMSO-d₆ na 25 °C



Slika D10. HSQC NMR spektar nabumetona u DMSO-d₆ na 25 °C

nab
5.1 mg / 600 ul
DMSO

```

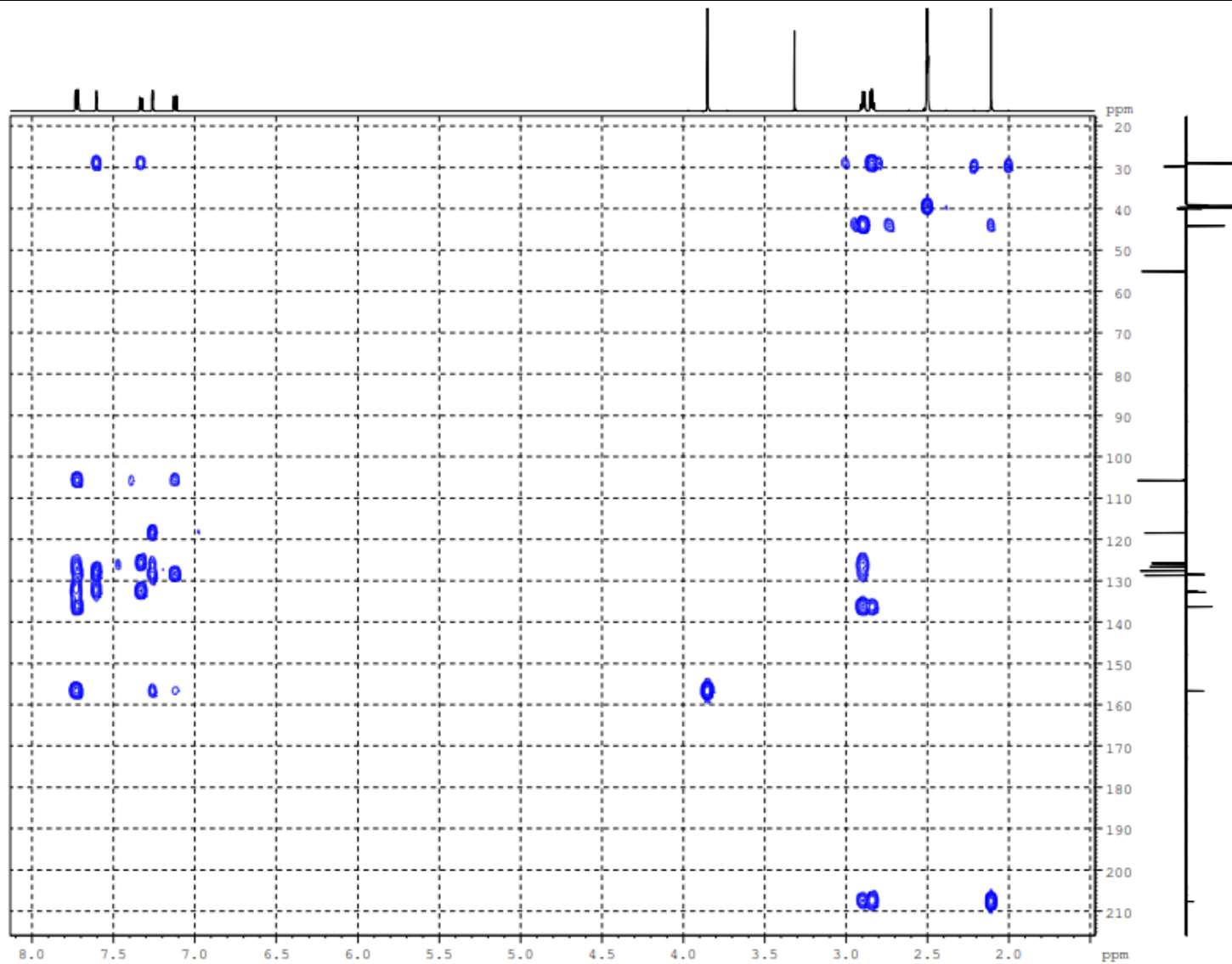
CURRAC DATA Parameters
NAME      cpa_nab_dms_25042021
EXPNO    4
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20240403
Time     21.18 h
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBO BB-1H
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  DMSO
NS        22
DS        4
SFO      400.146099 MHz
FIDRES    0.3932404 Hz
AQ        0.1118488 sec
RG        32768
AQ        55.400 usec
TE        298.0 K
CNS22    145.0000000
CNS21    10.0000000
D0        0.0000000 sec
D1        1.0000000 sec
D2        0.00244829 sec
D3        0.0000000 sec
D4        0.0000000 sec
D5        0.0000000 sec
IND       0
SFO1     400.1342009 MHz
NUC1      1H
P1        13.13 usec
P2        24.25 usec
SFO2     150.9194993 MHz
NUC2      13C
P3        11.00 usec
OPRAME[1] SINE.100
OPR1     50.00 %
OPRAME[2] SINE.100
OPR2     30.00 %
OPRAME[3] SINE.100
OPR3     60.10 %
P16      1000.00 usec

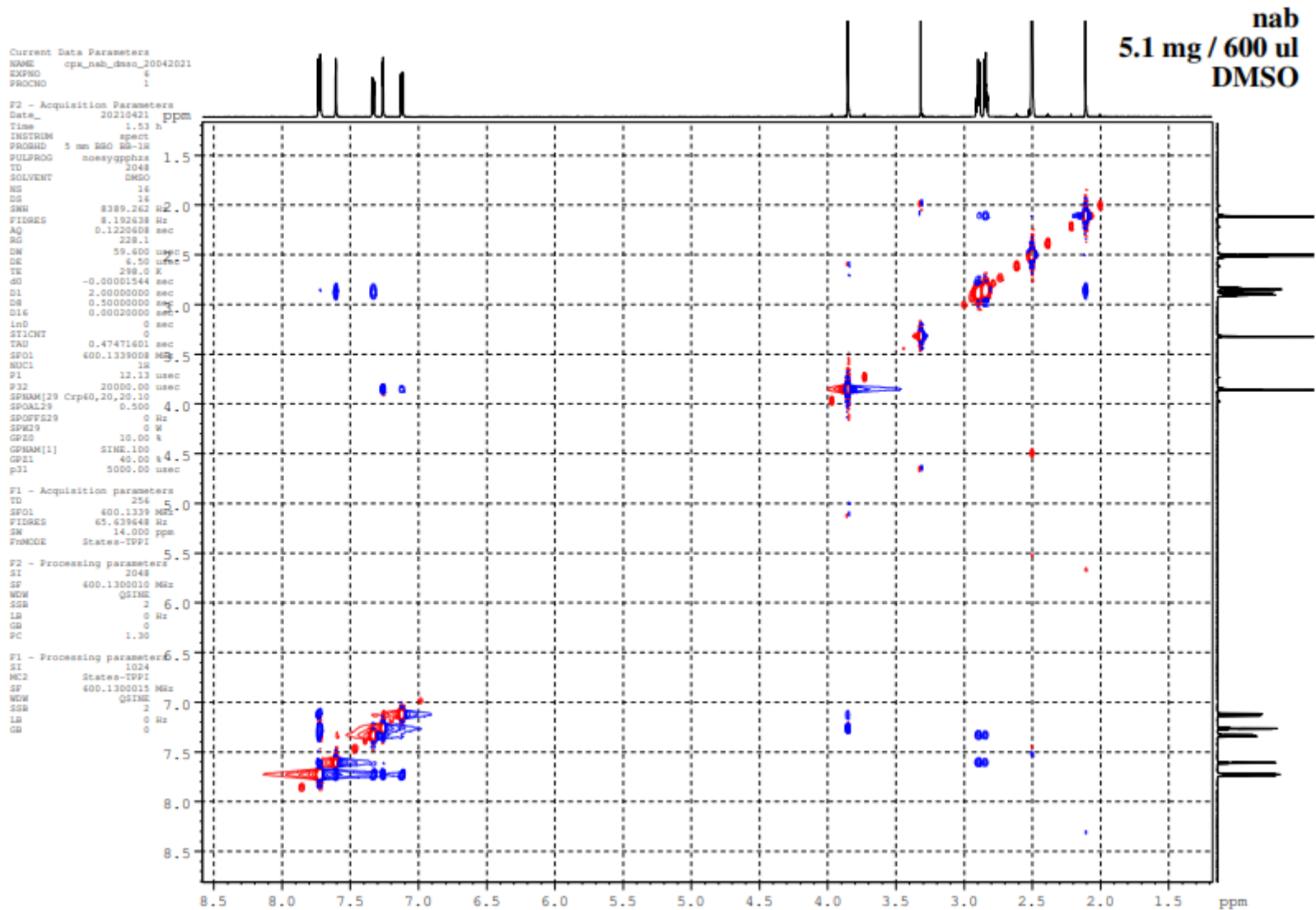
F1 - Acquisition parameters
TD        256
SFO1     150.9194993 MHz
FIDRES    282.973724 Hz
AQ        240.500 ppm
PROCNO    4

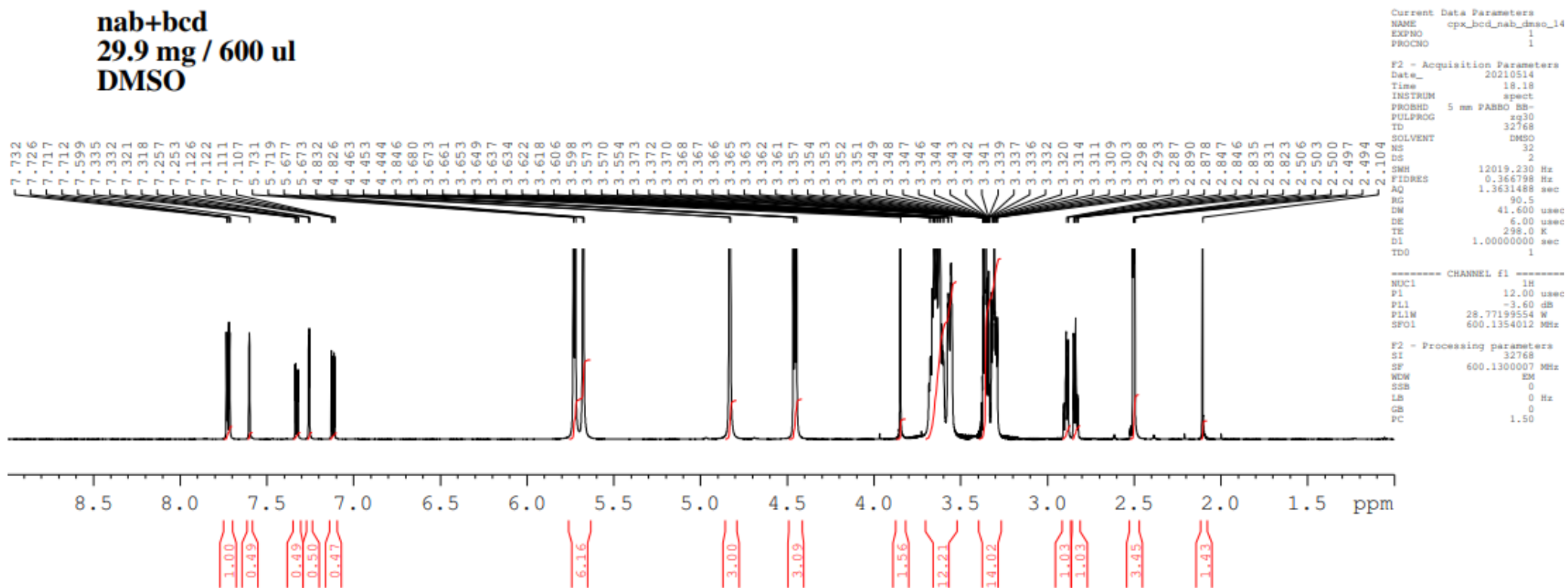
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        400.1305002 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.00

F1 - Processing parameters
SI        1524
MC2       4F
SF        150.9028910 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
  
```

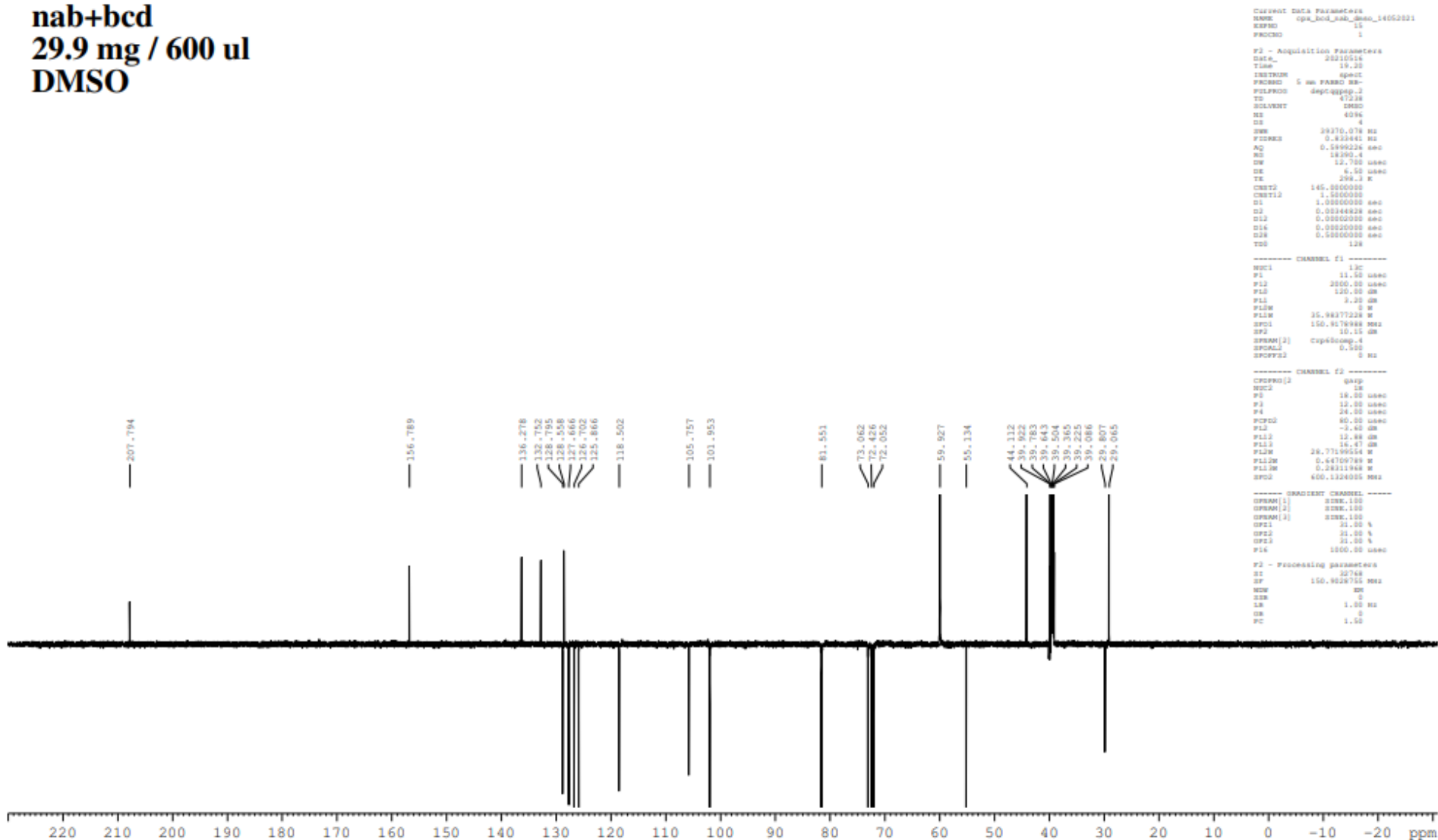


Slika D11. HMBC NMR spektar nabumetona u DMSO-d₆ na 25 °C

Slika D12. NOESY NMR spektar nabumetona u DMSO-d₆ na 25 °C

Slika D13. ^1H NMR spektar kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u DMSO- d_6 na 25 °C

nab+bcd
29.9 mg / 600 ul
DMSO



Slika D14. ¹³C NMR spektar kompleksa β-ciklodekstrina i nabumetona u DMSO-d₆ na 25 °C

nab+bcd
29.9 mg / 600 ul
DMSO

Current Data Parameters
NAME cpa_bcd_nab_dms_14052021
EXFNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20210514
Time 18.19
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG cosyypqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 4
DS 8
SWH 9415.385 Hz
FIDRES 4.495012 Hz
AQ 0.1064960 sec
RG 90.5
DW 52.000 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.0000300 sec
D1 1.0000000 sec
D13 0.0000400 sec
D16 0.0002000 sec
IND 0.00010415 sec

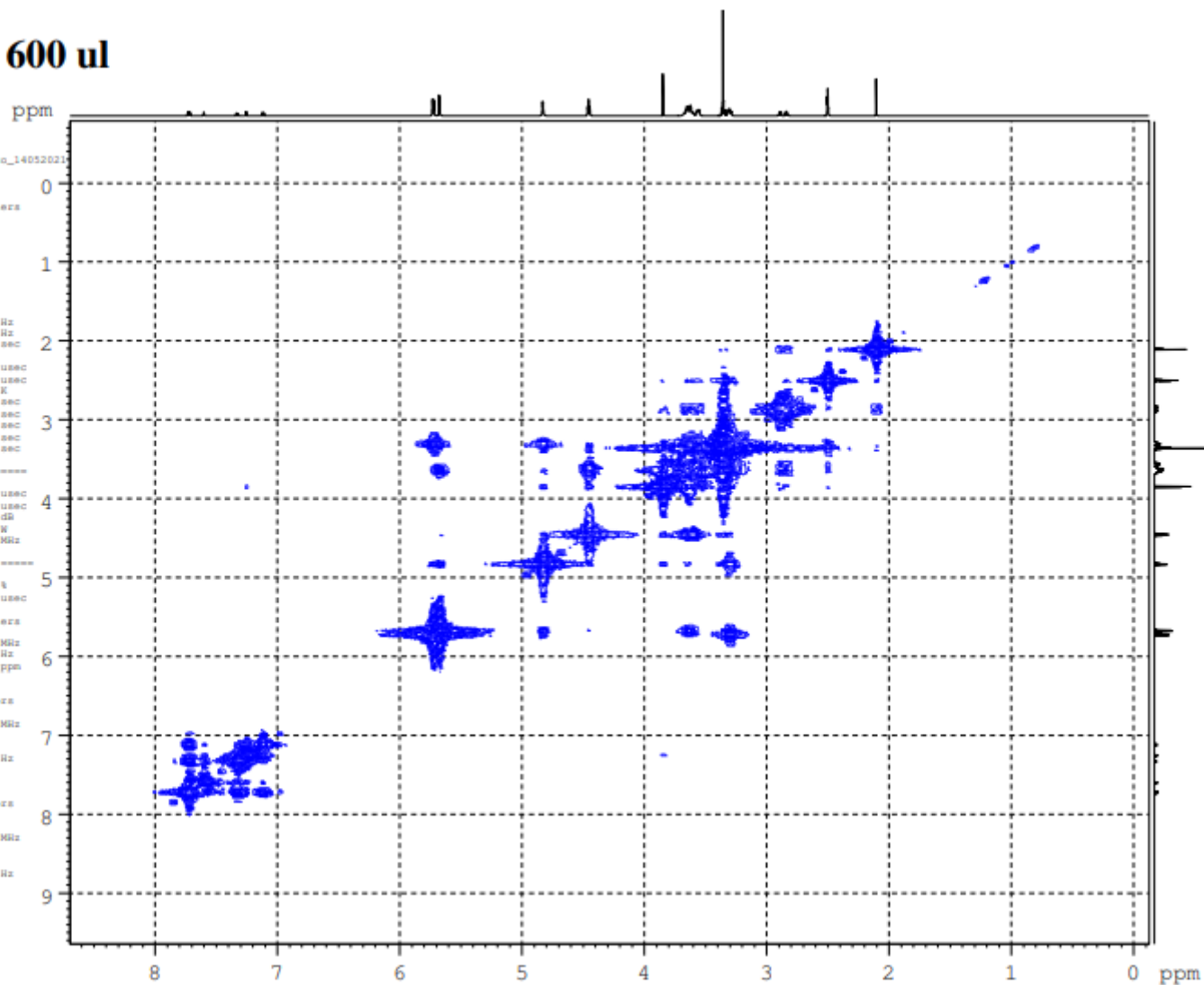
----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P0 12.00 usec
P1 12.00 usec
PL1 -1.40 dB
PL1W 28.77199554 W
SFO1 600.1339008 MHz

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPMAX[1] SINE.100
GP1 10.00 %
P16 1000.00 usec

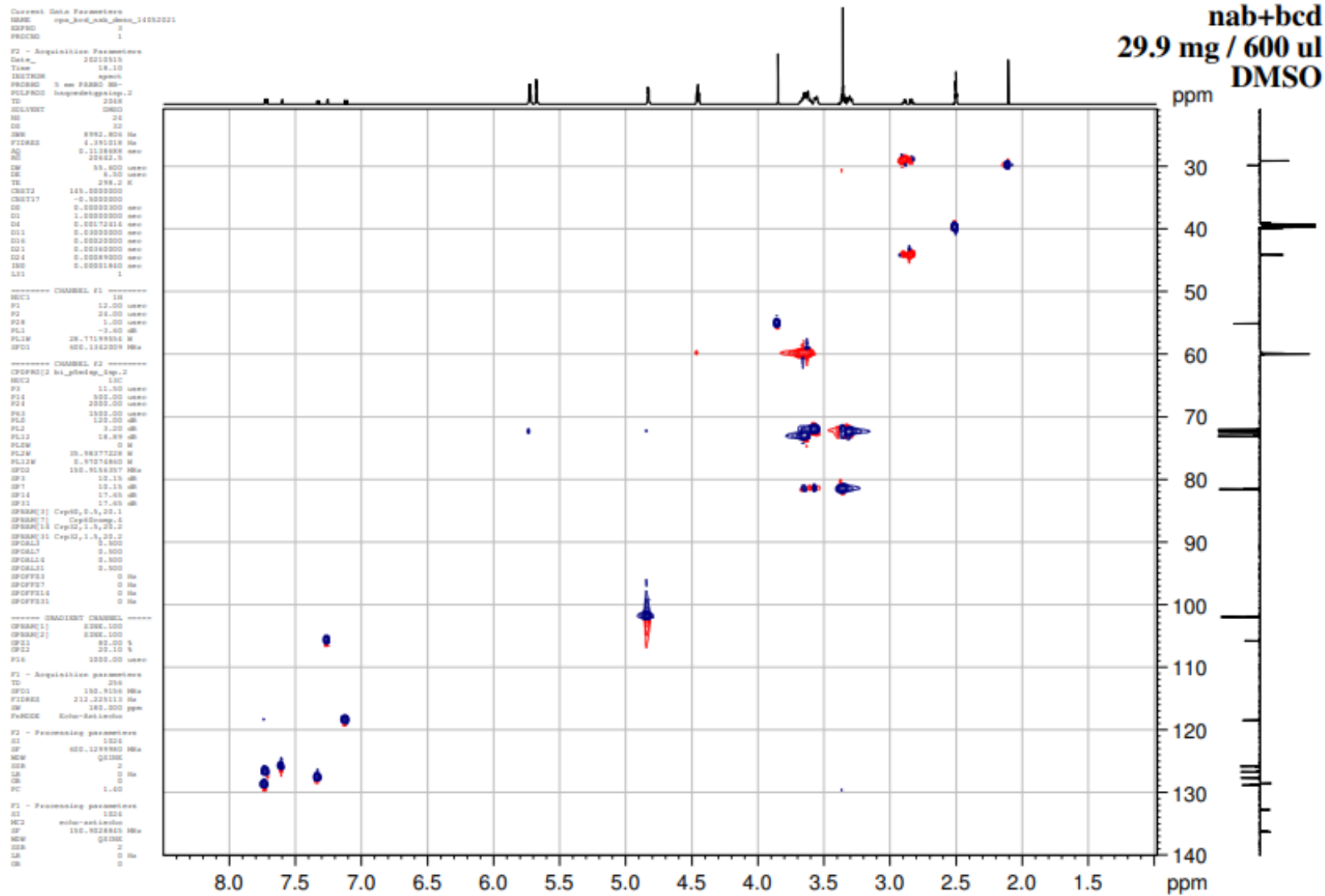
F1 - Acquisition parameters
TD 256
SFO1 600.1339 MHz
FIDRES 75.016701 Hz
SW 16.000 ppm
FWDGE GF

F2 - Processing parameters
SI 2048
SF 600.1300000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LR 0 Hz
GB 0
PC 1.40

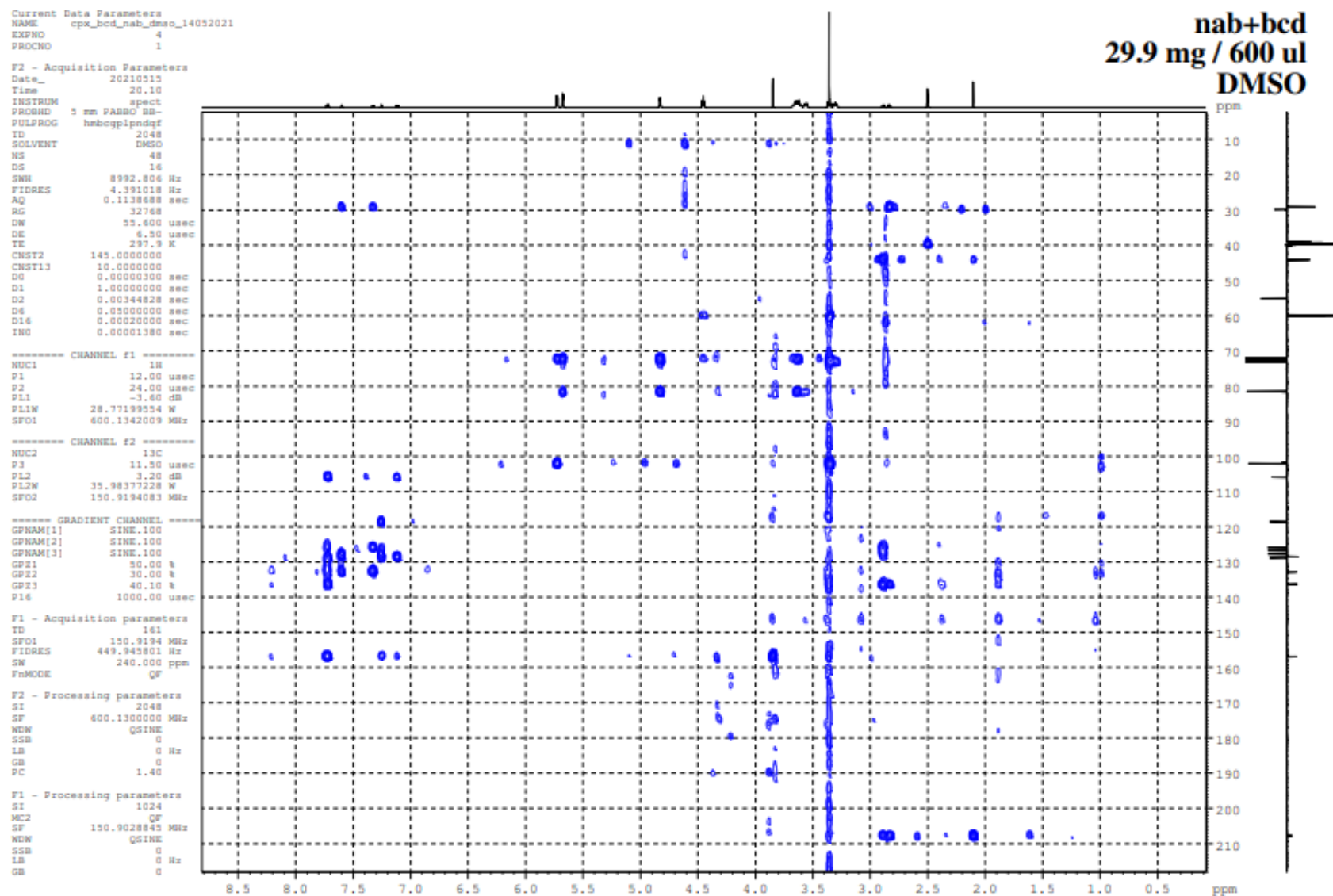
F1 - Processing parameters
SI 2048
MC2 GF
SF 600.1300000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LR 0 Hz
GB 0

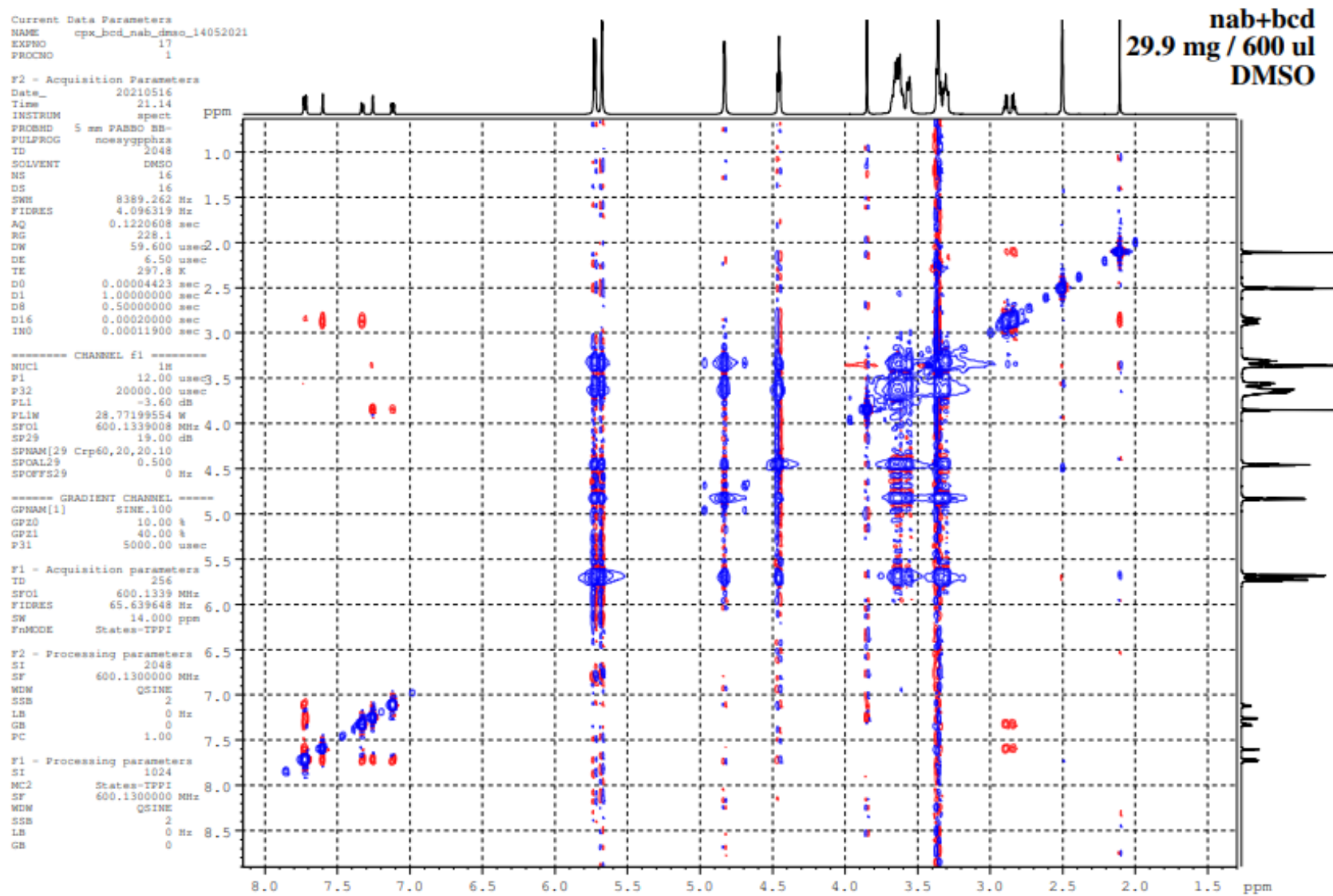


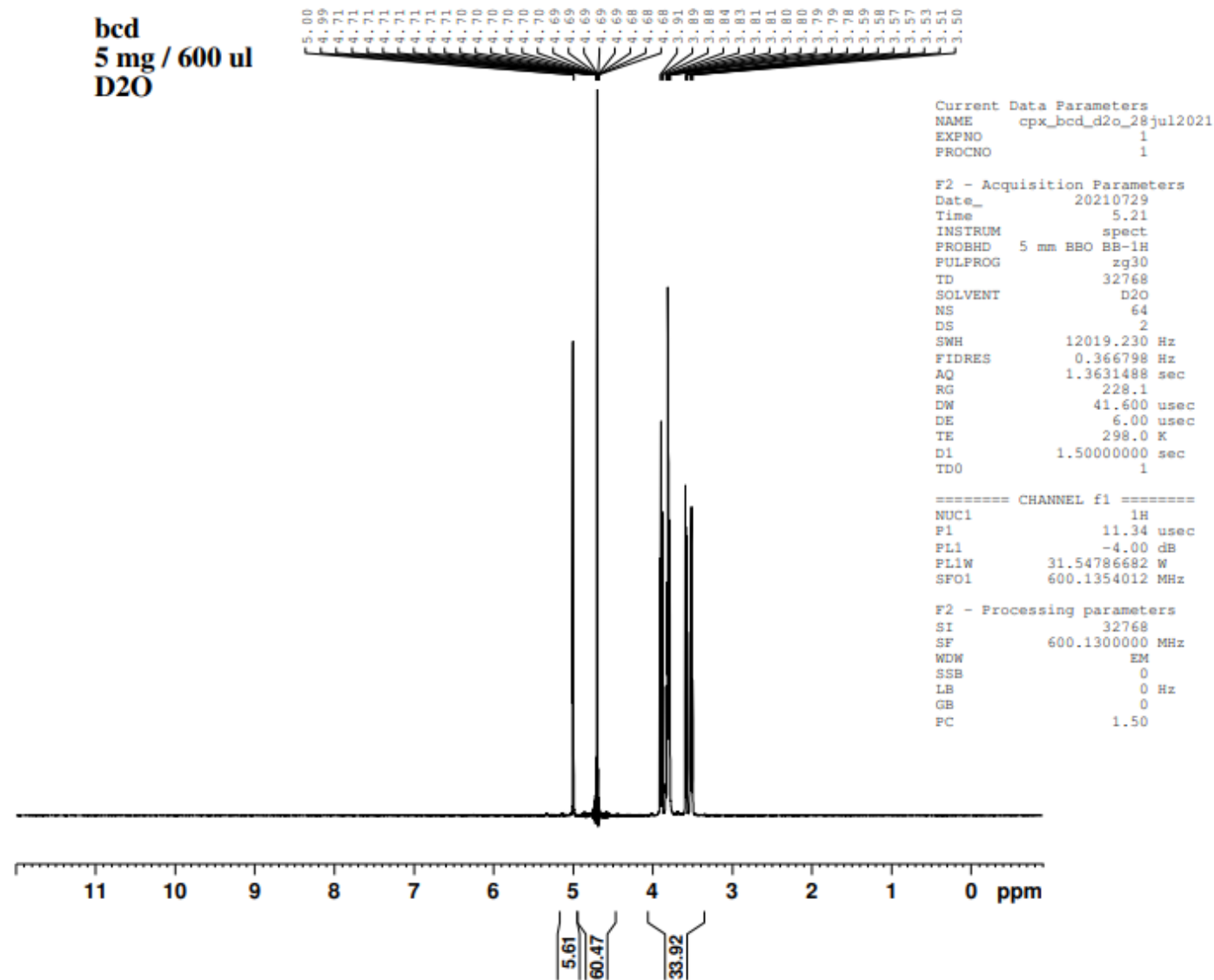
Slika D15. COSY NMR spektar kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u DMSO- d_6 na 25 °C



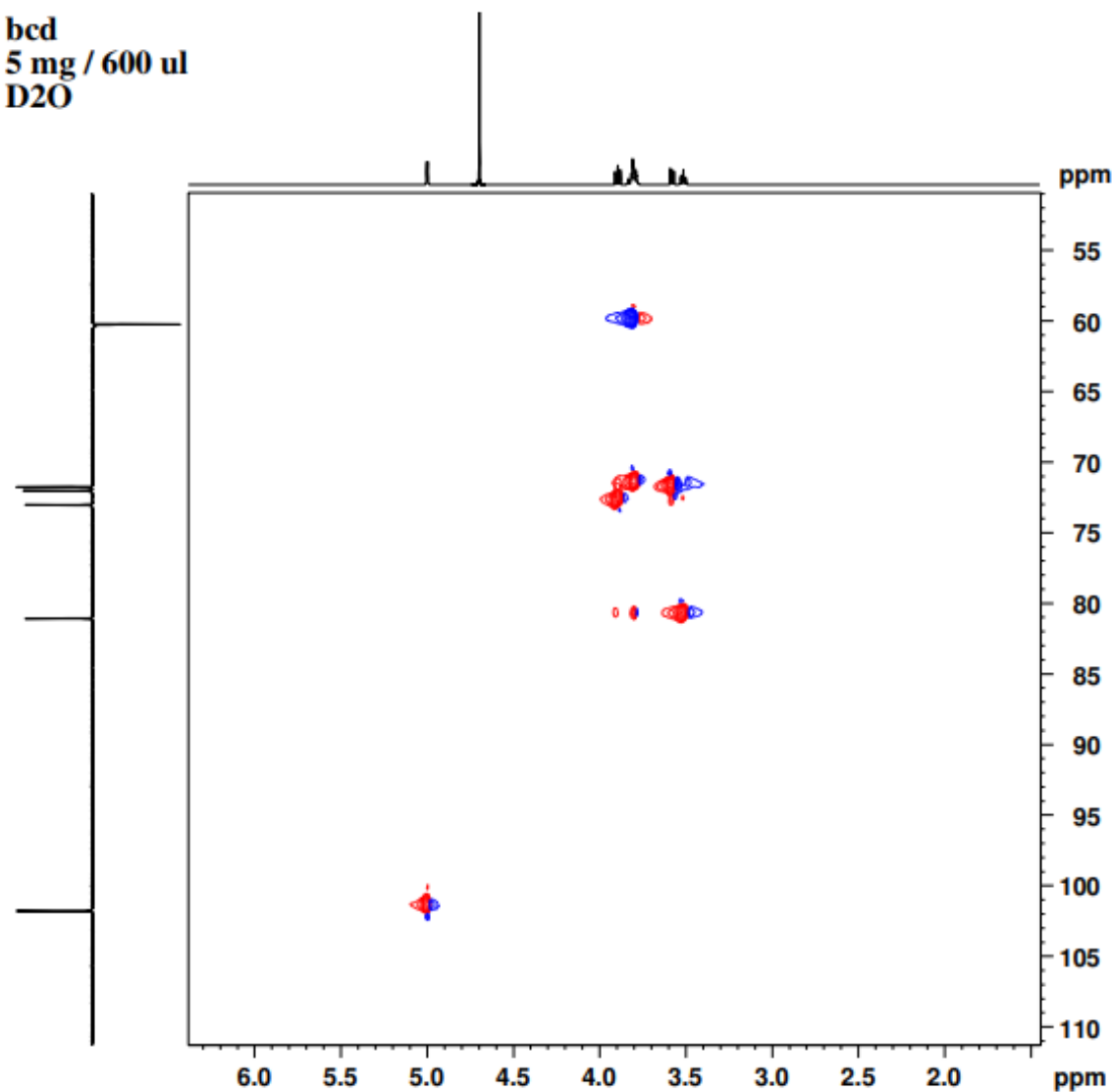
Slika D16. HSQC NMR spektar kompleksa β-ciklodekstrina i nabumetona u DMSO-d₆ na 25 °C

Slika D17. HMBC NMR spektar kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u DMSO- d_6 na 25 °C

Slika D18. NOESY NMR spektar kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u DMSO- d_6 na 25 °C

Slika D19. ^1H NMR spektar, sa supresijom vode, β -ciklodekstrina u D_2O na $25\text{ }^\circ\text{C}$

bcd
5 mg / 600 ul
D2O



```

Current Data Parameters
NAME: opa_bcd_05a_25jul2021
EXPNO: 2
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20210729
Time: 9.23
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBO BB-1H
PULPROG: zgpg30
TD: 256K
SOLVENT: D2O
NS: 24
DS: 32
SWH: 8992.806 Hz
FIDRES: 0.191118 Hz
AQ: 0.1118488 sec
RG: 32768
SQ: 58.400 usec
SE: 6.50 usec
TE: 298.0 K
CMT2: 145.000000
CMT17: -0.000000
D0: 0.0000000 sec
D1: 1.0000000 sec
D4: 0.00172416 sec
D11: 0.03000000 sec
D14: 0.00000000 sec
D21: 0.00000000 sec
D34: 0.00089000 sec
RG0: 0.00001840 sec
L31: 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1: 1H
P1: 11.34 usec
P2: 22.68 usec
P3: 1.00 usec
PL1: -6.00 dB
PL2: 31.34746482 W
PL3: 600.1342009 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2: h1_gwagp_0q_2
NUC2: 13C
P3: 11.00 usec
P14: 100.00 usec
P24: 2000.00 usec
P34: 1000.00 usec
PL3: 10.00 dB
PL4: 2.00 dB
PL12: 18.36 dB
PL14: 0 W
PL24: 47.43545201 W
PL34: 1.09170876 W
PL32: 110.9144817 MHz
SP3: 9.23 dB
SP7: 9.23 dB
SP14: 14.83 dB
SP31: 14.83 dB
SFRAN[3]: Cq40, 0.4, 20.1
SFRAN[7]: Cq40sqg, 6
SFRAN[14]: Cq32, 1.5, 20.2
SFRAN[31]: Cq32, 1.5, 20.2
SFRAL3: 0.500
SFRAL7: 0.500
SFRAL14: 0.500
SFRAL31: 0.500
SFRPF3: 0 Hz
SFRPF7: 0 Hz
SFRPF14: 0 Hz
SFRPF31: 0 Hz

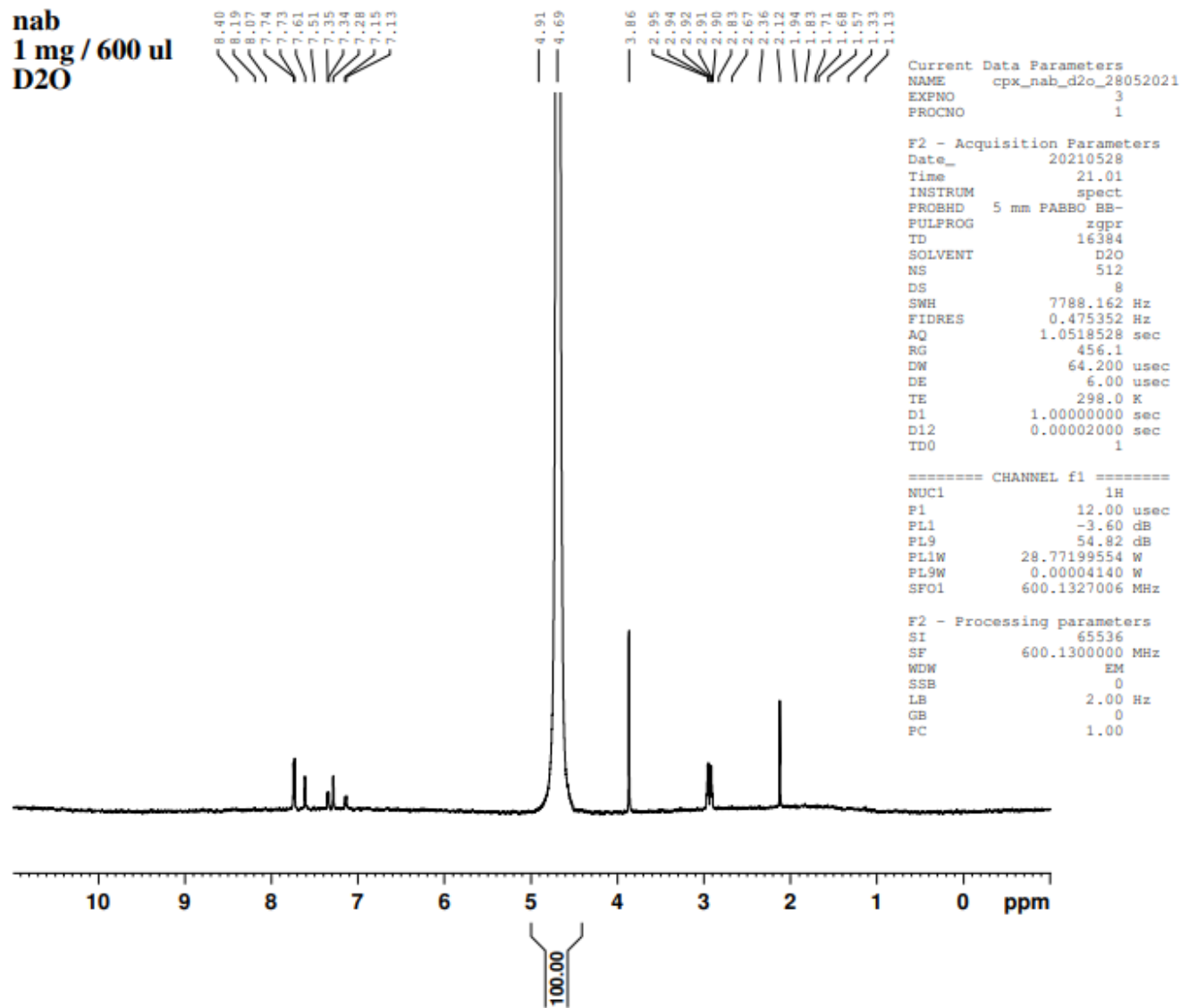
----- GRABTEST CHANNEL -----
SFRAN[1]: SINE.100
SFRAN[2]: SINE.100
SFR1: 80.00 %
SFR2: 20.10 %
P14: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 256
SFO1: 500.1342009 MHz
FIDRES: 212.221113 Hz
SQ: 180.000 ppm
PRODC: Echo-Asic0a

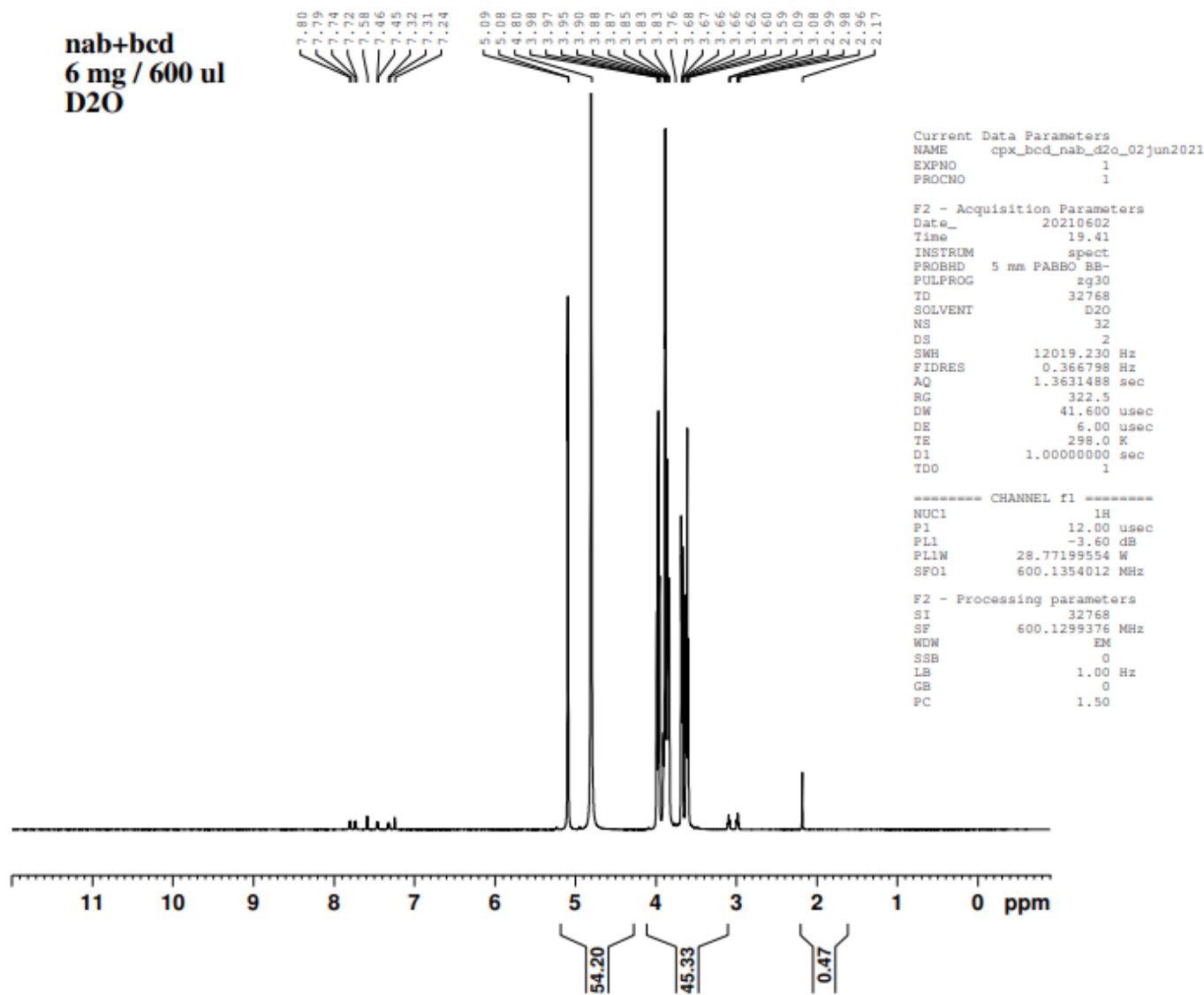
F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 600.1299860 MHz
WDW: Q310K
SSB: 2
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.60

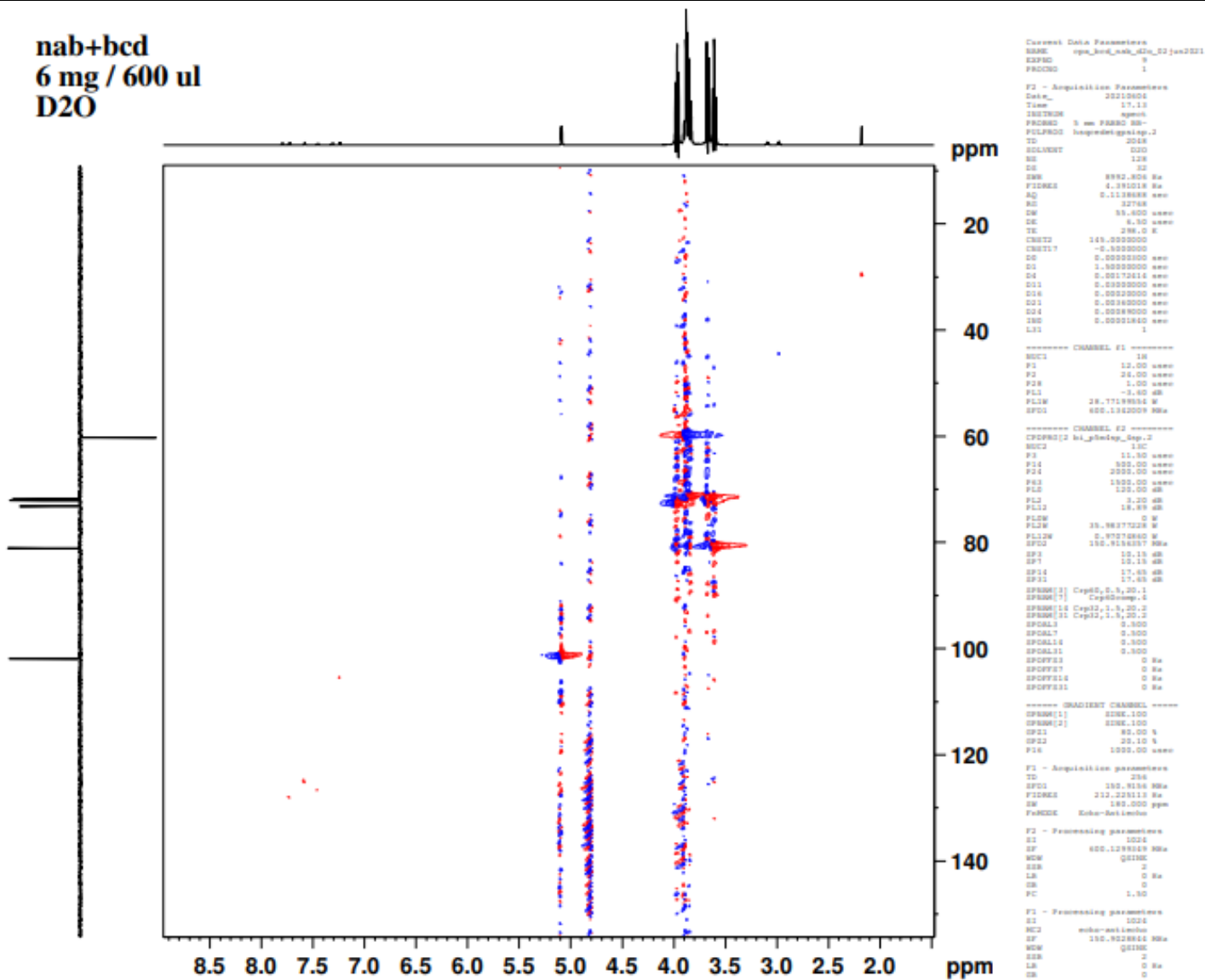
F1 - Processing parameters
SI: 1024
SFO1: Echo-Asic0a
SF: 110.9028845 MHz
WDW: Q310K
SSB: 2
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 0
    
```

Slika D20. HSQC NMR spektar β-ciklodekstrina u D₂O na 25 °C

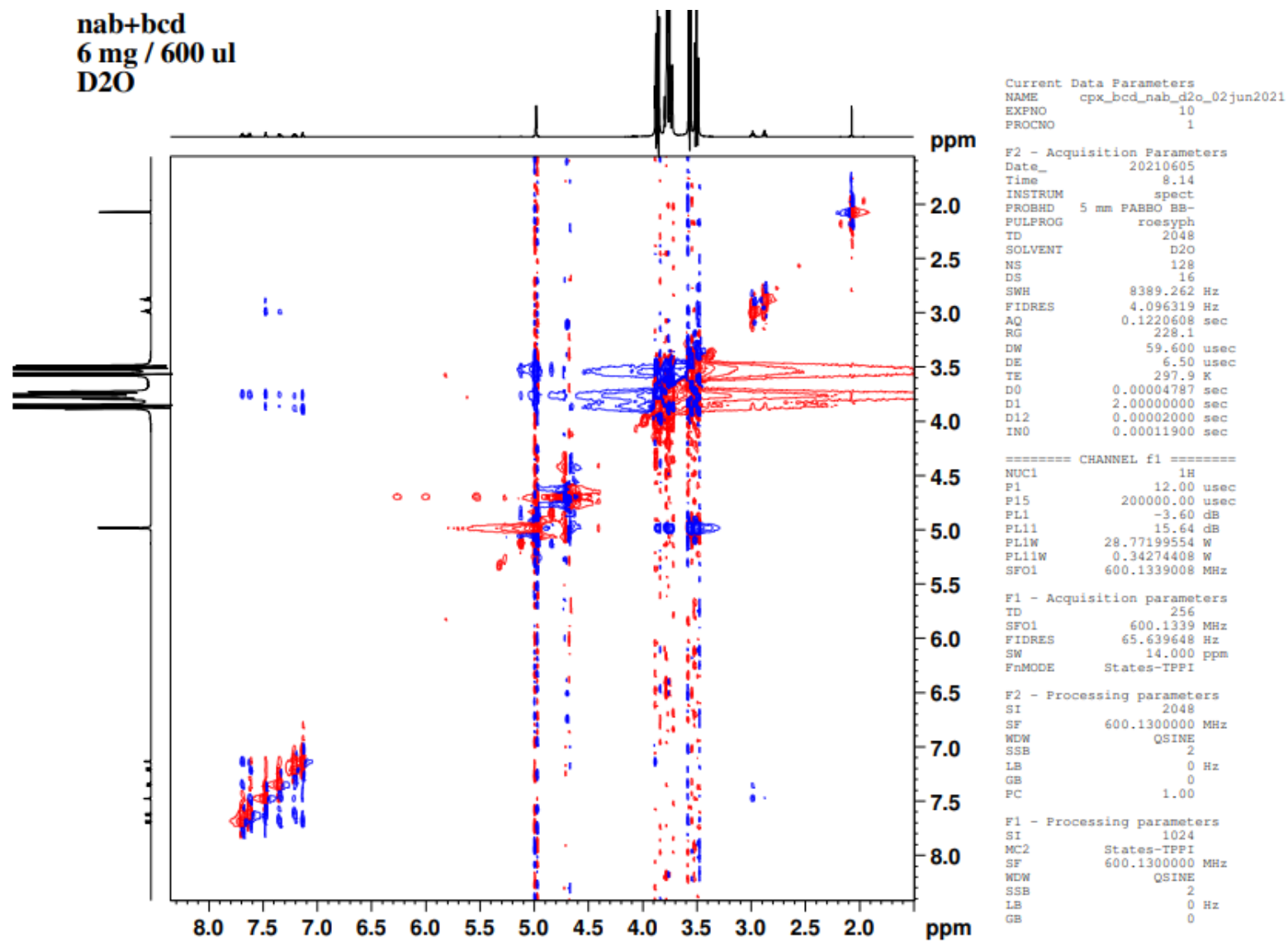


Slika D21. ¹H NMR spektar, sa supresijom vode, nabumetona u D₂O na 25 °C

Slika D22. ^1H NMR spektar, sa supresijom vode, kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u D_2O na 25°C



Slika D23. HSQC NMR spektar kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u D₂O na 25 °C

Slika D24. ROESY NMR spektar kompleksa β -ciklodekstrina i nabumetona u D₂O na 25 °C

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Melita Kelrajter

Datum rođenja: 07. kolovoza 1997.

Mjesto rođenja: Koprivnica, Hrvatska

Obrazovanje

2004-2012 Osnovna škola Andrije Palmovića u Rasinji

2012-2016 Srednja škola Koprivnica, Koprivnica

2016-2019 Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2019-2022 Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017 Otvoreni dan kemije

2018 Otvoreni dan kemije