

Razvoj metodologije LC-SPE/krio NMR za analizu bioaktivnih molekula i lijekova

Habinovec, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:217:844152>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Iva Habinovec

RAZVOJ METODOLOGIJE LC-SPE/KRIO NMR ZA ANALIZU BIOAKTIVNIH MOLEKULA I LIJEKOVA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Iva Habinovec

**DEVELOPMENT OF A LC-SPE/CRYO NMR
METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF BIOACTIVE
MOLECULES AND DRUGS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Predrag Novak, Professor

Zagreb, 2023

Zahvale

Iskreno zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Predragu Novaku, na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ove disertacije. Hvala Vam na stručnom vodstvu, velikoj podršci, savjetima, strpljenju i razumijevanju.

HVALA svim profesoricama, profesorima, kolegama i suradnicima sa Zavoda za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a na lijepoj suradnji, kolegijalnosti, ohrabivanju i bezuvjetnoj podršci u teškim trenucima. Posebno zahvaljujem dr. sc. Katarini Pičuljan za pomoć oko snimanja spektara NMR i za svaku toplu prijateljsku riječ. Također zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Tomislavu Jednačku i doc. dr. sc. Ivanu Nemetu za korisne savjete i veliku podršku tijekom pisanja disertacije.

Zahvaljujem kolegici Marijani Pocrnić, mag. chem., dr. sc. Saši Kazaziću, dr. sc. Miroslavi Harči te Ivanu Grgičeviću, mag. med. chem., za snimanje spektara MS.

Hvala kolegici dr. sc. Ivani Mikulandri za sintezu makrozona.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branimiru Bertoši i dr. sc. Antunu Barišiću za provedena računalna istraživanja.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivani Biljan za pomoć oko interpretacije spektara NMR spojeva izdvojenih iz uzorka 7-etiltriptofola.

Neizmjerne HVALA mojem Ž, mojim roditeljima, kumi Jadranki, obitelji i prijateljima na ogromnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

Najveće HVALA mojoj malenoj hrabroj Petri kojoj posvećujem ovu disertaciju. Hvala ti, lavice moja, što si mi bila najveća motivacija tijekom pisanja. Hvala ti što si mi pokazala koliko su važni optimizam i mentalna snaga. Volim najviše! ♥

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Razvoj tehnike LC-NMR.....	5
2.1.1. Načini izvedbe tehnike LC-NMR.....	7
2.1.2. Primjena tehnike LC-NMR u analizi bioaktivnih molekula i lijekova	8
2.1.3. Tehnika LC-NMR-MS	9
2.1.4 Tehnika LC-SPE-NMR.....	12
2.1.5. Primjena tehnike LC-SPE-NMR	13
2.2. Etodolak.....	15
2.2.1. Onečišćenja u lijekovima	16
2.3. Azitromicin i njegovi derivati	18
2.3.1. Analiza makrolida kromatografskim tehnikama i spektrometrijom masa.....	23
2.4. Derivati tiosemikarbazona	25
2.5. Makrozoni.....	27
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	30
3.1. Kemikalije i pribor.....	30
3.2. Instrumenti	31
3.3. Analiza derivata karbohidrazida tehnikom LC-SPE/krio NMR.....	32
3.3.1. Priprava uzoraka i pokretne faze za analizu derivata karbohidrazida.....	32
3.3.2. Analiza derivata karbohidrazida tehnikom LC-SPE.....	33
3.3.3. Snimanje spektara NMR u otopini	33
3.4. Analiza 7-etiltryptofola tehnikom LC-SPE/krio NMR.....	34
3.4.1. Priprava uzoraka i pokretne faze za analizu 7-etiltryptofola	34
3.4.2. Analiza 7-etiltryptofola tehnikom LC-SPE	34
3.4.3. Snimanje spektara NMR u otopini	35
3.4.4. Snimanje spektara MS.....	36
3.5. Analiza makrozona tehnikom LC-SPE/krio NMR.....	36
3.5.1. Priprava uzoraka i pokretne faze za analizu makrozona	36
3.5.2. Analiza reakcijskih smjesa makrozona tehnikom LC-SPE.....	37
3.5.3. Snimanje spektara NMR u otopini	38

3.5.4. Snimanje spektara MS.....	39
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. Analiza derivata karbohidrazida tehnikom LC-SPE/krio NMR.....	41
4.2. Analiza 7-etiltriptofola tehnikom LC-SPE/krio NMR.....	44
4.2.1. Analiza onečišćenja iz uzorka 7-etiltriptofola.....	46
4.3. Analiza makrozona tehnikom LC-SPE/krio NMR	70
4.3.1. Istraživanje djelotvornosti ekstrakcije spojeva na SPE-sorbense.....	73
4.3.2. Analiza reakcijske smjese makrozona 9a-1.....	77
4.3.3. Analiza reakcijske smjese makrozona 9a-16.....	81
4.3.4. Analiza reakcijske smjese makrozona 4''-16.....	85
4.3.5. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-16.....	93
4.3.6. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-8.....	102
4.3.7. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-9.....	113
§ 5. ZAKLJUČAK	122
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	124
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	126
§ 8. DODATAK	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAZVOJ METODOLOGIJE LC-SPE/KRIO NMR ZA ANALIZU BIOAKTIVNIH MOLEKULA I LIJEKOVA

Iva Habinovec
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

U ovom su radu istražene mogućnosti primjene metode LC-SPE/krio NMR za praćenje kemijskih reakcija i određivanje strukture sporednih produkata i/ili razgradnih produkata *on-line* koji nastaju u reakciji, s naglaskom na bioaktivne molekule i lijekove.

Za razvoj metodologije odabrana su tri modelna sustava. Za svaki modelni sustav istraženi su uvjeti kromatografskog odjeljivanja komponenta reakcijskih smjesâ, zatim parametri za učinkovitu ekstrakciju odabranih analita na SPE-sorbense te utjecaj parametara ekstrakcije na osjetljivost krio-probe NMR. Za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju izoliranih spojeva korištene su spektroskopija NMR i tehnika LC-MS.

Prvi modelni sustav bili su karbohidrazidi i njihovi derivati koji imaju kelirajuća svojstva te antioksidativno i antiepileptičko djelovanje. Tijekom analize karbohidrazida istražena je osjetljivost sustava LC-SPE/krio NMR. Drugi modelni sustav bio je etodolak koji pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova. Analizom 7-etiltriptofola, polazne tvari u sintezi etodolaka, identificirano je i strukturno okarakterizirano 17 onečišćenja. Treći modelni sustav bili su makrozoni, novi amidni konjugati azitromicina i derivata tiosemikarbazida, koji imaju zadovoljavajuće antibakterijsko djelovanje na odabrane susceptibilne i rezistentne bakterijske sojeve. Analizirano je ukupno 6 reakcijskih smjesâ iz triju različitih klasa nosintetiziranih makrozona. Identificirana onečišćenja bila su sporedni produkti i razgradni produkti makrolidne i tiosemikarbazonske strukture, te dijastereomeri makrozona. Konfiguracije dijastereomerâ predložene su na temelju analize spektara NOESY i računskih simulacija molekulske dinamike.

Provedeno istraživanje rezultiralo je razvojem pouzdane, brže i učinkovitije metode za analizu složenih smjesa spojeva koristeći pritom znatno manje količine uzorka i organskih otapala u usporedbi s postojećim metodama *off-line*. Metoda LC-SPE/krio NMR može imati širu primjenu u ekstrakciji, pročišćavanju i karakterizaciji nosintetiziranih spojeva i/ili onečišćenja iz reakcijskih smjesâ.

(192 stranice, 96 slika, 33 tablice, 129 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: 7-etiltriptofol/ etodolak/ karbohidrazidi/ LC-MS/ LC-SPE/krio NMR/ makrozoni

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak
Rad prihvaćen: [28. lipnja 2023. na sjednici Vijeća KO PMF]
Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Biljan, PMF, Zagreb
2. dr. sc. Vlasta Drevenkar, zn. savj. u miru i nasl. red. prof., PMF, Zagreb
3. prof. dr. sc. Dražen Vikić-Topić, MEF, Pula



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A LC-SPE/CRYO NMR METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF BIOACTIVE MOLECULES AND DRUGS

Iva Habinovec
Horvatovac 102a, Zagreb HR-10000

In this doctoral thesis, the possibilities of applying the LC-SPE/cryo NMR method for monitoring chemical reactions and determining the structure of by-products and/or degradation products *on-line*, with an emphasis on bioactive molecules and drugs, were explored.

Three different model systems were explored for methodology development. For each model system, the parameters for chromatographic separation of the reaction mixtures components, as well as parameters for the efficient extraction of the selected analytes on SPE-sorbents, were optimized. Hence, the influence of the SPE-parameters on the NMR cryoprobe sensitivity was also evaluated. NMR spectroscopy and LC-MS were used for identification and structural characterization of the extracted mixture components.

The first model system were carbohydrazides and their derivatives, which are known as chelating reagents and also show antioxidative and antiepileptic effects. Sensitivity of LC-SPE/cryo NMR system was determined by analyzing carbohydrazides. Etodolac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, was chosen as the second model system. During the analysis of 7-ethyltryptophol, a starting material in the synthesis of etodolac, 17 impurities were identified and structurally characterized. The third model system were macrozones, new amide conjugates of azitromycin and thiosemicarbazide derivatives which exhibit good antibacterial activity against susceptible and resistant bacterial strains. Six reaction mixtures from three different classes of newly synthesized macrozones were analysed. Identified impurities were classified as macrolide and non-macrolide related by-products and degradation products, as well as macrozone diastereomers. Configurations of diastereomers were proposed on the basis of NOESY NMR spectroscopy data and molecular dynamic simulations.

This research resulted in development of a reliable, faster and more efficient methodology for complex mixture analysis using significantly smaller amount of sample and organic solvents in comparison with standard *off-line* methods. LC-SPE/cryo NMR method can be applied for the extraction, purification and characterization of newly synthesized compounds and/or impurities from reaction mixtures.

(192 pages, 96 figures, 33 tables, 129 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: 7-ethyltryptophol/ carbohydrazides/ etodolac/ LC-MS/ LC-SPE/cryo NMR/ macrozones

Supervisor: Dr. Predrag Novak, Professor

Thesis accepted: [28th June 2023]

Reviewers:

1. Dr. Ivana Biljan, Associate Professor, Faculty of Science, Zagreb
2. Dr. Vlasta Drevenkar, Adjunct Full Professor, Faculty of Science, Zagreb
3. Dr. Dražen Vikić-Topić, Professor, School of Medicine, Pula

§ 1. UVOD

Kontrola kvalitete djelatne tvari i gotovog lijeka važan je korak u farmaceutskoj analizi. Onečišćenja prisutna u djelatnoj tvari određuju kvalitetu lijeka te mogu utjecati na sigurnost i učinkovitost primjene konačnog proizvoda, stoga je identifikacija svih onečišćenja imperativ u farmaceutskoj industriji. Za svaku tvar, čiji je dnevni unos u ljudski organizam manji od ili jednak 2 g, regulatorne agencije propisuju najveću dopuštenu količinu onečišćenja koja je 0,15 % za poznata onečišćenja, odnosno 0,10 % za nepoznata onečišćenja.¹ Tijekom razvoja nove djelatne tvari nužno je poznavati profil onečišćenja u svakom stupnju. Onečišćenja mogu biti procesna, razgradni produkti te onečišćenja iz polaznih sirovina korištenih u sintezi.²

Klasičan pristup analizi onečišćenja sastoji se od nekoliko koraka. Prvi korak je odjeljivanje onečišćenja od glavne komponente kromatografskim tehnikama. Nakon toga slijedi ekstrakcija, a potom detekcija onečišćenja spektrometrijom masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS), difrakcijskim tehnikama i/ili spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Informacije o strukturi analita prikupljene primjenom tehnika MS i NMR međusobno se nadopunjuju i nužne su za potpunu strukturnu karakterizaciju nepoznatog spoja. Postupak izolacije spoja preparativnim ili semipreparativnim kromatografskim tehnikama može biti dugotrajan uz utrošak velike količine organskih otapala i uzorka. Suvremeni pristup analizi onečišćenja koristi spregnute tehnike kod kojih se određene kromatografske tehnike povezuju sa spektroskopskom metodom detekcije ili sa spektrometrijom masa. Najčešće se koristi vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, LC-MS) te vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa, LC-MS/MS.³⁻⁵ Nedostatak navedenih sustava je što ne razlikuju konstitucijske izomere ili enantiomere, niti se mogu analizirati termički nestabilni spojevi koji ne podliježu učinkovitoj ionizaciji, pa je u tom slučaju nužno koristiti spektroskopiju NMR.

Vezani sustav LC-NMR pokazao se učinkovit za analizu onečišćenja u lijekovima, metabolita lijekova te bioaktivnih molekula.⁶⁻⁹ Glavni nedostatak ove tehnike je što je masa analita u probi NMR određena kapacitetom kromatografske kolone, a često ta masa nije dovoljna za snimanje dvodimenzijskih spektara NMR koji su nužni za nedvojbenu strukturnu karakterizaciju nepoznatog spoja. Razvojem krio-tehnologije i uvođenjem krio-probe u sustav

LC-NMR osjetljivost tehnike povećana je oko 4 puta.^{10,11} Primjena krio-tehnologije omogućava hlađenje probe NMR i dijela elektroničkog sustava na temperaturu tekućeg dušika ili helija, čime se termički šum znatno smanjuje, a omjer signala i šuma povećava (engl. *Signal-to-Noise, S/N*). Dodatno povećanje osjetljivosti postignuto je uvođenjem jedinice za ekstrakciju na čvrstoj fazi (engl. *Solid – Phase Extraction, SPE*) koja omogućava višestruko ukoncentriravanje analita i veću masu spoja za snimanje spektara NMR.¹² Istraživanje svojstava polimernih SPE-sorbensa (kolonice unutarnjeg promjera 2 mm) pokazalo je da je njihov kapacitet od 1 mg do 1,5 mg spoja ako je zadržavanje analita kvantitativno.¹³

Vezani sustav LC-SPE omogućava odjeljivanje komponenata smjese na kromatografskoj koloni, zatim izdvajanje i ukoncentriravanje svakog analita na SPE-sorbensu, nakon čega slijedi identifikacija i određivanje strukture izdvojenog spoja spektroskopijom NMR. Prednosti tehnike su brojne. Zbog kvantitativnog obogaćivanja analita na SPE-sorbensu, koje se postiže jednostrukim (engl. *singletrapping*) ili višestrukim (engl. *multitrapping*) izdvajanjem analita na pojedini SPE-sorbens, veća je osjetljivost mjerenja krio-probom NMR. S obzirom da se za kromatografsko odjeljivanje upotrebljavaju nedeuterirana otapala, analiza je jeftinija, osjetljivija i učinkovitija u odnosu na tehniku LC-NMR. Sušenjem SPE-sorbensa u struji dušika uklanja se većina otapala iz kromatografske analize pa su intenziteti signala otapala u spektru NMR reducirani.¹⁴ Nadalje, izolacija i identifikacija onečišćenja može biti dugotrajan proces ako se primjenjuju klasične metode pročišćavanja poput preparativne ili semipreparativne kromatografije koje zahtijevaju veliku količinu uzorka i organskih otapala. Vrlo često je masa uzorka ograničena ili je prinos reakcije nizak. Prednost tehnike LC-SPE-NMR ili LC-SPE/NMR je u tome što je moguće u jednom koraku odijeliti komponente uzorka, svaku komponentu izdvojiti na SPE-sorbens, a potom ju analizirati spektroskopijom NMR. S obzirom na visoku osjetljivost krio-probe NMR, dovoljno je nekoliko desetaka mikrograma analita za snimanje dvodimenzijskih spektara NMR.¹⁵ U posljednjih dvadeset godina tehnika LC-SPE-NMR ili LC-SPE/NMR sve više pronalazi primjenu u analizi prirodnih spojeva, metabolita, lijekova te njihovih razgradnih produkata i onečišćenja.^{16–21} Međutim, vrlo je mali broj publikacija koje opisuju praćenje kemijskih reakcija tehnikom LC-SPE-NMR ili LC-SPE/NMR.^{15,22,23}

Azitromicin je predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika nazvane azalidi zbog prisutnosti dušikovog atoma u 15-eročlanom makrolaktonskom prstenu. Zbog poboljšanih farmakokinetičkih svojstava u odnosu na eritromicin, azitromicin je postao antibiotik širokog

spektra djelovanja na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve.²⁴ Unatoč ovoj činjenici rezistencija bakterija postaje globalni problem koji može ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje. Telitromicin pripada trećoj generaciji makrolidnih antibiotika nazvanoj ketolidi te je pokazao vrlo dobro antibakterijsko djelovanje na rezistentne sojeve i povoljna farmakokinetička svojstva, ali je povučen s tržišta zbog velikog broja nuspojava i hepatotoksičnosti. Solitromicin pripada skupini fluoroketolida te je pokazao izvrsnu antibakterijsku aktivnost na rezistentni soj *S. Pneumoniae*, ali zbog strukturne sličnosti s telitromicinom Američka agencija za hranu i lijekove (engl. FDA – *Food and Drug Administration*) nije dozvolila njegov plasman na tržište.²⁵ Daljnja istraživanja u području sinteze makrolidnih antibiotika usmjerena su na modifikaciju makrolaktonskog prstena dodavanjem različitih alkilnih i/ili arilnih skupina, zatim na sintezu hibridnih makrolida (keto-azalida) te makrolidnih konjugata.^{24,26}

Tiosemikarbazoni su derivati hidrazona poznati po protuupalnom, antitumorskom i antibakterijskom djelovanju.²⁷ Konjugacijom različitih derivata tiosemikarbazona s 3-dekladinozil-3-hidroksi-15-eročlanim azalidima pripremljeni su spojevi čija je antibakterijska aktivnost na rezistentne bakterijske sojeve poput *S. Pneumoniae*, *S. Pyogenes* i *H. Influenzae* bila jednaka ili bolja od azitromicina.²⁸ Reakcijom derivata tiosemikarbazona s 4-formilbenzojevom kiselinom pripremljeni su tiosemikarbazidi koji u konjugaciji s azitromicinom također pokazuju antibakterijsku aktivnost.²⁹

U laboratoriju Zavoda za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu sintetizirane su tri nove klase konjugata azitromicina i tiosemikarbazida nazvane makrozoni. Odabrani derivati tiosemikarbazida vezani su na makrolaktonski prsten na položajima 9a-, 4"- i 3-. Antibakterijsko testiranje *in vitro* nosintetiziranih makrozona iz klase 4"- pokazalo je da spojevi imaju do 32 puta veću aktivnost na rezistentni soj *S. Pneumoniae* u usporedbi s azitromicinom, vrlo dobru aktivnost na *S. Pyogenes* te umjerenu aktivnost na Gram-negativan bakterijski soj *H. Influenzae*. Nadalje, navedeni spojevi pokazali su aktivnost na rezistentan soj *S. Aureus* na kojeg je azitromicin neaktivan.²⁹ Za pročišćavanje i analizu makrolidnih antibiotika najčešće se koristi tekućinska kromatografija obrnutih faza na kromatografskoj koloni C₁₈, dok se za identifikaciju najčešće primjenjuje tehnika LC-MS s analizatorom vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF).^{30,31} Pretraživanjem literature nije pronađena niti jedna publikacija koja primjenjuje tehniku LC-SPE/NMR za analizu makrolidnih antibiotika ili njihovih konjugata.

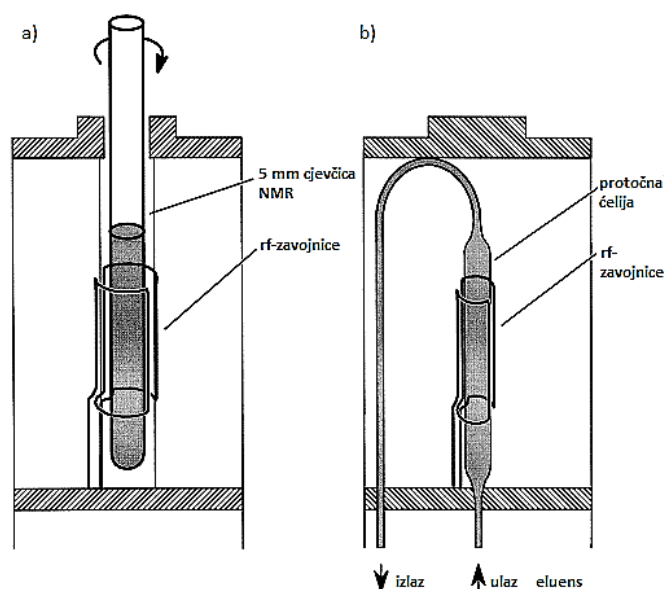
Cilj ovog istraživanja bio je razviti metodologiju LC-SPE/krio NMR koja će u jednom koraku omogućiti brzo i učinkovito odjeljivanje komponenata složenih reakcijskih smjesa, s naglaskom na lijekove i bioaktivne spojeve, zatim ekstrakciju odabranih komponenata na SPE-sorbense, a potom identifikaciju i strukturnu karakterizaciju izdvojenih spojeva spektroskopijom NMR. Isto tako, jedan od ciljeva bio je istražiti pouzdan način praćenja kemijskih reakcija karbohidrazida, etodolaka i makrozona, ekstrakcije te identifikacije nusprodukata i/ili onečišćenja koja nastaju u kemijskim reakcijama, i to uz utrošak manjih količina otapala i uzorka u odnosu na postojeće tehnike *off-line*, što ovakav pristup čini ekološki prihvatljivijim. Na temelju primjene ove tehnike, koristeći pritom tri modelna sustava bioaktivnih spojeva, cilj je bio odrediti osjetljivost sustava LC-SPE/krio NMR te prednosti i mane u usporedbi s klasičnim analitičkim pristupima *off-line*.

Pretpostavlja se da će primjena tehnike LC-SPE-NMR omogućiti bržu i učinkovitiju izolaciju novosintetiziranih konjugata azitromicina te izradu profila onečišćenja. Također se očekuje da će se uvidom u strukture nusprodukata i razgradnih produkata, te usporedbom profila onečišćenja za različite klase makrozona, olakšati pročišćavanje konačnih produkata i daljnja kromatografska analiza potencijalnih antibiotika.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Razvoj tehnike LC-NMR

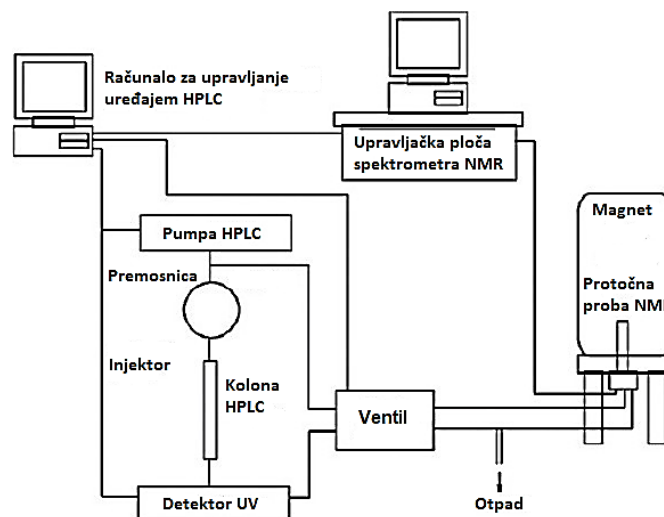
Glavni preduvjet za razvoj tehnike LC-NMR bio je razvoj protočne probe NMR i ventila smještenog između uređaja HPLC i probe NMR koji služi za detekciju i regulaciju kontinuiranog protoka, odnosno zaustavljenog protoka. Protočna proba NMR (slika 1) isprva je razvijena za primjenu u tehnici kontinuiranog protoka.



Slika 1. Shematski prikaz a) klasične probe NMR; b) protočne probe NMR. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 32

Zbog potrebe za potpunom strukturnom karakterizacijom nepoznatih spojeva protočna proba je s vremenom sve više upotrebljavana u tehnici zaustavljenog protoka koja omogućuje snimanje dvodimezijskih spektara NMR. Volumen probe može biti od 60 μl do 200 μl , a protok pokretne faze od 0,5 ml min^{-1} do 1 ml min^{-1} .³² Na slici 2 prikazan je eksperimentalni postav uređaja LC-NMR koji se koristi u većini laboratorija. Detektor UV spojen je čeličnom kapilaram unutarnjeg promjera 0,25 mm preko ventila s protočnom probom NMR. Ovisno o jakosti magnetskog polja i zaštiti magneta regulira se i udaljenost visokodjelotvornog tekućinskog kromatografa (engl. *High Performance Liquid Chromatograph*, HPLC) od spektrometra NMR. Što je udaljenost između instrumenata manja, učinkovitiji je prijenos analita do probe NMR,

širenje kromatografskih pikova je minimalno, a osjetljivost veća. Volumen prijenosa između uređaja HPLC i probe NMR je oko 150 μl .



Slika 2. Shematski prikaz uređaja LC-NMR. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 32

Prvi znanstveni rad s primjenom tehnike LC-NMR objavili su japanski znanstvenici Watanabe i Niki 1978. godine.³³ Oni su modificirali klasičnu probu NMR tako što su uveli teflonsku cjevčicu unutarnjeg promjera 1,4 mm i na taj način dobili protočnu ćeliju NMR koju su spojili s detektorom LC pomoću ventila s 3 petlje. Efektivna duljina protočne ćelije bila je 1 cm, a efektivni volumen 15 μl . Ovako dizajniran sustav LC-NMR korišten je za odjeljivanje 3 poznata spoja: 2,6-dimetilfenola, 2,3-dimetilfenola i 3,5-dimetilfenola. Spojevi su odijeljeni u sustavu normalnih faza na koloni ETH-silika uz eluiranje tetrakloretilenom. Za snimanje spektara NMR korištena je tehnika zaustavljenog protoka (engl. *stopped-flow*). Kako bi se spriječilo širenje kromatografskih pikova spojeva koji su preostali na koloni, maksimalno vrijeme snimanja spektra NMR za pojedinu komponentu bilo je 2 sata. Autori su naglasili da ovakav sustav, koji koristi kromatografiju normalnih faza, ima ograničenu primjenu te da je potrebno unaprijediti sustav LC-NMR za primjenu kromatografije obrnutih faza. Haw i njegovi suradnici su prvi puta primijenili tehniku kontinuiranog protoka (engl. *on-flow*) 1980. godine za analizu nafte i sintetskog goriva.³⁴ Albert i suradnici primijenili su tehniku kontinuiranog protoka uz supresiju signala otapala za analizu metabolita oksazolina koji su sadržavali ciklopropilne skupine. Metaboliti su odijeljeni kromatografijom obrnutih faza.³⁵

Otapala koja se koriste kao pokretne faze u kromatografiji obrnutih faza dodatno su otežavala analizu spektara NMR jer: (1) protonirana otapala puno više interferiraju s uzorkom, (2) gradijentno eluiranje tijekom kromatografske analize, odnosno promjena sastava pokretne faze, narušava homogenost magnetskog polja u protočnoj probi i (3) signali otapala često prekrivaju signale analita što otežava interpretaciju spektara NMR. Opisane poteškoće riješene su razvojem sekvence za supresiju signala otapala WET (engl. *Water suppression Enhanced through T1 effects*) kojom je bilo moguće generirati jednodimenzijske spektre visoke razlučivosti u tehnikama kontinuiranog i zaustavljenog protoka, te dvodimenzijske spektre u tehnici zaustavljenog protoka.³⁶

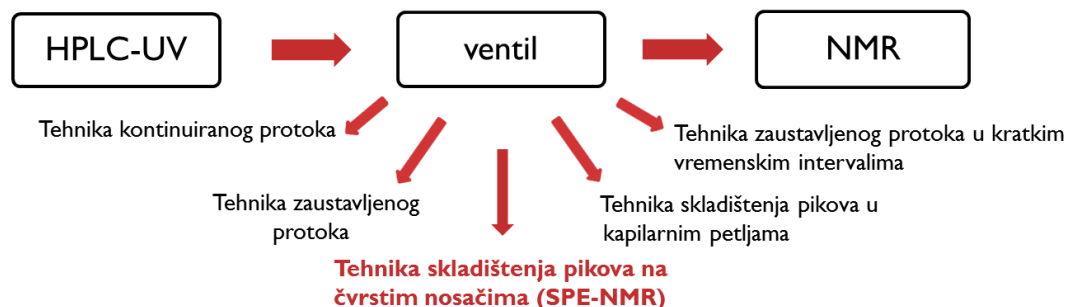
2.1.1. Načini izvedbe tehnike LC-NMR

U tehnici LC-NMR tijekom kromatografske analize u sustavu obrnutih faza kao pokretna faza upotrebljava se smjesa protoniranog i deuteriranog otapala. Najčešće je to smjesa acetonitrila i deuterirane vode. Najpogodniji način eluiranja je izokratno eluiranje. U slučaju potrebe za gradijentnim eluiranjem treba voditi računa o tome da promjena sastava pokretne faze veća od 3 % min⁻¹ narušava homogenost magnetskog polja u protočnoj probi. Signali otapala korištenih u kromatografskoj analizi često prekrivaju signale analita, stoga ih treba suprimirati. U tu svrhu koriste se sekvence za supresiju signala otapala: WET, WATERGATE (engl. *WATER-suppression by Gradient-Tailored Excitation*), prezasićenje (tip NOESY) i dvostruka pfg spinska jeka. Nedostatak supresije signala otapala je taj što će signali analita koji su u blizini signala otapala također biti suprimirani čime se gubi informacija o strukturi analita.

Masa analita koja je dostupna za snimanje spektra NMR određena je aktivnim volumenom protočne ćelije NMR. To ujedno znači da bi kromatografski pikovi trebali biti što uži i oštriji kako bi sva masa analita bila dostupna za snimanje spektara NMR. S druge strane, zbog slabe osjetljivosti spektrometra NMR, kromatografska kolona mora biti zasićena uzorkom kako bi što veća masa analita dospjela u protočnu ćeliju. Injektiranje velike količine uzorka na kromatografsku kolonu narušava razlučivanje pikova, a upotreba deuteriranih otapala često uzrokuje širenje pikova čime se znatno smanjuje osjetljivost tehnike LC-NMR. Osjetljivost se može poboljšati smanjenjem protoka pokretne faze ispod 1 ml min⁻¹.

Ovisno o vrsti ventila načini izvedbe tehnike LC-NMR mogu biti: tehnika kontinuiranog protoka, tehnika zaustavljenog protoka, tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim

intervalima (engl. *time-slice*), tehnika skladištenja kromatografskih pikova u kapilarnim petljama (engl. *loop collection*) i tehnika skladištenja pikova na čvrstom nosaču (shema 1).



Shema 1. Načini izvedbe spregnutog sustava LC-NMR

U tehnici kontinuiranog protoka analit se vrlo kratko zadržava u protočnoj ćeliji (oko 3,6 s pri protoku pokretne faze 1 ml min^{-1}) pa je moguće snimiti samo jednodimenzijske spektre ^1H i ^{19}F NMR. Tehnika je pogodna za snimanje glavnih sastojaka smjese i nestabilnih spojeva koji se brzo raspadaju ili izomeriziraju. Tehnika zaustavljenog protoka omogućava snimanje dvodimenzijskih homo- i heteronuklearnih spektara NMR jer se kromatografska analiza zaustavlja čim analit dođe u protočnu ćeliju. Tehnika je prikladna za spojeve koji imaju definirano vrijeme zadržavanja na koloni i karakteristične UV kromofore. Ako je razlučivanje sastojaka smjese loše ili dva sastojka koeluiraju s kolone, može se primijeniti tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim intervalima. Kada želimo odrediti strukture većeg broja spojeva odijeljenih na kromatografskoj koloni, najpogodnija je tehnika skladištenja kromatografskih pikova u kapilarnim petljama. U tom slučaju spojevi skladišteni u petljama moraju biti stabilni jer se spektri NMR snimaju tek po završetku kromatografskog odjeljivanja.³⁷ Skladištenje pikova na čvrstom nosaču je najnovija tehnika u kojoj su SPE-sorbensi postavljeni *on-line* između kromatografske kolone i protočne probe NMR.

2.1.2. Primjena tehnike LC-NMR u analizi bioaktivnih molekula i lijekova

Analiza onečišćenja važan je dio kontrole kvalitete farmaceutskih pripravaka. Prema uputama Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za lijekove (engl. *International Council for harmonisation*, ICH) svako onečišćenje u lijeku, čiji je udio veći od 0,1 %, treba biti identificirano i strukturno karakterizirano.¹ Onečišćenja koja se pojavljuju u formulacijama lijekova tijekom izvođenja testova stabilnosti mogu utjecati na promjenu strukture aktivne

komponente i/ili cijele formulacije. Ekstrakcija onečišćenja složen je i dugotrajan postupak u kojem se troši puno organskih otapala. Tehnika LC-NMR omogućuje bržu i jednostavniju analizu onečišćenja *on-line* uz utrošak manjih volumena otapala. Postoji veliki broj onečišćenja koja su nestabilna pa ih je nemoguće izdvojiti preparativnom tekućinskom kromatografijom. U tom je slučaju tehnika LC-NMR dobar izbor. Spraul i suradnici prvi su primijenili tehniku LC-NMR za analizu glavnih metabolita ibuprofena u ljudskom urinu naglasivši prednost vezane tehnike LC-NMR za ekstrakciju nestabilnih estera glukuronida pred klasičnim metodama ekstrakcije.³⁸ Iste je godine po prvi puta primijenjena tehnika LC-¹⁹F-NMR za analizu metabolita flurbiprofena u ljudskom urinu i to na spektrometru NMR jakosti magnetskog polja 600 MHz.³⁹

Zbog slabije osjetljivosti spektrometra NMR tijekom analize spregnutom tehnikom LC-NMR analitička kolona treba biti zasićena uzorkom što može narušiti razlučivanje kromatografskih pikova. Stoga je prilikom razvoja metode potrebno optimirati masu uzorka koja se nanosi na kolonu. Roberts i suradnici istraživali su granice detekcije tehnike LC-NMR i pokazali su da je, u slučaju spektrometra NMR 400 MHz, u tehnici kontinuiranog protoka dovoljno 50 µg analita za snimanje spektra ¹H NMR, odnosno 25 µg u tehnici zaustavljenog protoka.⁴⁰

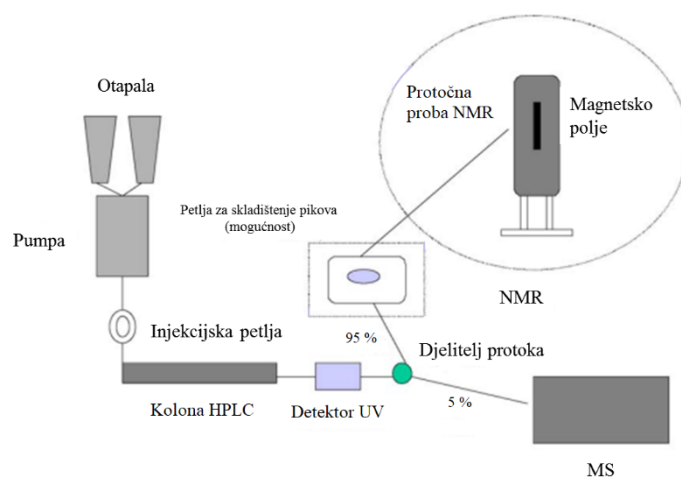
Tehnika LC-NMR našla je uspješnu primjenu u identifikaciji onečišćenja koja nastaju tijekom testova stabilnosti i forsirane razgradnje djelatnih tvari ili čitave formulacije lijeka,^{7,41,42} kao i u analizi procesnih onečišćenja.^{6,43,44} Tehnika LC-NMR intenzivno se primjenjuje i u identifikaciji bioaktivnih spojeva *in vitro* te za identifikaciju i ekstrakciju metabolita lijekova iz složenih bioloških matrica.^{8,45-48}

2.1.3. Tehnika LC-NMR-MS

Spregnuta tehnika LC-NMR-MS omogućava istodobno snimanje spektara NMR i MS u samo jednoj kromatografskoj analizi čime se znatno ubrzava analiza složenih smjesa. Upotrebom detektora NMR i MS dobivaju se komplementarne informacije neophodne za nedvojbenu identifikaciju prirodnih produkata, lijekova i njihovih metabolita. Usporedbom rezultata analize MS spojeva uz upotrebu protoniranih, odnosno deuteriranih otapala, moguće je dobiti podatak o broju izmjenjivih protona. Prvi sustav LC-NMR-MS dizajnirali su Pullen i suradnici 1995. godine, a upotrijebili su ga za analizu antimikotika flukonazola i nekih triazola.⁴⁹ Godinu dana kasnije Shockcor i suradnici primijenili su ovaj sustav za analizu acetaminofena i njegovih

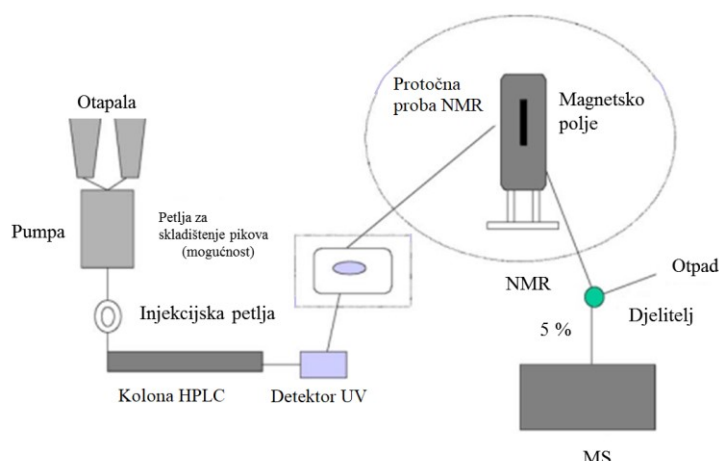
metabolita u ljudskom urinu.⁵⁰ Budući da su neki metaboliti sadržavali sulfatne skupine, koje nije moguće detektirati spektrometrom NMR, ovim primjerom pokazana je važnost i korisnost primjene vezanog sustava LC-NMR-MS.

Spektrometre NMR i MS moguće je povezati s tekućinskim kromatografom na dva načina: paralelno i serijski.⁵¹ Kod paralelnog povezivanja treba imati na umu razliku u osjetljivosti dvaju detektora. Zbog manje osjetljivosti spektrometra NMR protok pokretne faze dijeli se na izlazu iz kromatografske kolone najčešće u omjeru 20:1. To znači da se 95 % eluata usmjerava u protočnu probu NMR, a preostalih 5 % u spektrometar masa (slika 3). U ovakvom načinu povezivanja nema opasnosti od protutlačnog udara (engl. *backpressure*) koji se javlja u međuspoju LC-MS i koji može oštetiti protočnu ćeliju NMR. Spektri NMR i MS mogu se snimati istodobno, a uzorak koji je bio u spektrometru NMR može se iskoristiti za daljnje analize.



Slika 3. Paralelno povezivanje sustava LC-NMR-MS. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 51

U serijskom načinu povezivanja eluat s kromatografske kolone prvo se uvodi u spektrometar NMR (slika 4). Nakon snimanja spektara NMR uzorak dolazi do djelitelja s kojeg se 5 % uzorka usmjerava u MS, a ostatak u otpad. Druga uloga djelitelja je umanjiti protutlačni udar koji se javlja u međuspoju. Prednost serijske konfiguracije sustava je što se izmjenjivi protoni molekula analita mogu reptonirati nakon snimljenih spektara NMR, a nedostatak je moguća disperzija kromatografskih pikova i pomak u vremenu zadržavanja analita u kromatografskoj koloni.



Slika 4. Serijsko povezivanje sustava LC-NMR-MS. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 51

Kod obje konfiguracije cjelokupna izvedba određena je primijenjenom tehnikom LC-NMR. Moguće je koristiti tehniku kontinuiranog protoka, tehniku zaustavljenog protoka ili tehniku skladištenja kromatografskih pikova u kapilarnim petljama. Burton i suradnici koristili su paralelni postav sustava LC-NMR-MS za analizu metabolita paracetamola, nekih šećera, citrata i laktata u ljudskom urinu, uz to da je 98 % eluata s kolone usmjereno u spektrometar NMR te je korištena tehnika kontinuiranog protoka.⁵²

Značajno povećanje osjetljivosti sustava LC-NMR-MS postignuto je razvojem krio-probe. Kod ove vrste probe elektronički dijelovi se hlade na temperaturu do 20 K čime se znatno smanjuje pozadinski šum, a povećava omjer S/N , dok je uzorak na sobnoj temperaturi. U usporedbi s klasičnom, inverznom probom NMR, osjetljivost krio-probe je u prosjeku veća 3 do 4 puta.⁵³ Tehnologija krio-NMR omogućuje detekciju analita zastupljenih u vrlo niskim koncentracijama (na mikrogramskoj skali) u biološkim uzorcima. Spraul i suradnici prvi su puta primijenili sustav LC-NMR-MS s krio-probom za analizu metabolita acetaminofena u ljudskom urinu.⁵⁴ Netretirani uzorak injektiran je izravno u kromatografsku kolonu te su određene strukture triju novih metabolita. S obzirom na veliki potencijal tehnika LC-NMR-MS pronašla je svoju primjenu u analizi metabolita lijekova.⁵⁵⁻⁵⁷

U tehnici LC-NMR-MS upotrebljavaju se deuterirana otapala za kromatografsku analizu koja su mnogo skuplja od protoniranih otapala. Anorganski puferi kao pokretne faze idealni su za analizu jer nemaju signale u spektrima NMR, ali zbog slabe hlapljivosti nisu kompatibilni s ionizacijskim izvorom spektrometra masa. U idealnom slučaju koriste se deuterirani puferi koji

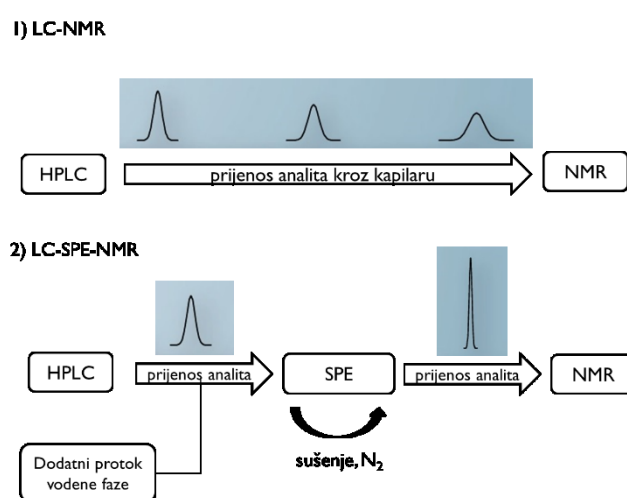
su iznimno skupi. S ciljem da se deuterirana otapala u kromatografskoj analizi zamijene protoniranim otapalima, te da se dodatno poveća osjetljivost tehnike LC-NMR, razvijena je jedinica SPE.

2.1.4. Tehnika LC-SPE-NMR

U ovoj tehnici su SPE-sorbensi postavljeni *on-line* između kromatografske kolone i protočne probe NMR. Analiti odijeljeni na kromatografskoj koloni skladište se na SPE-sorbense, a po završetku kromatografske analize eluiraju se deuteriranim otapalom u protočnu ćeliju NMR. Jedinica SPE sastoji se od automatskog izmjenjivača SPE-sorbensa (engl. *ACE – Automatic Cartridge Exchanger*) u kojem su smješteni sorbensi s različitim nepokretnim fazama (C_2 , C_8 , C_{18} , -CN, ionski izmjenjivači, polidivinilbenzenske smole i dr.). Polimerne nepokretne faze pokazale su se od 10 do 40 puta boljima za zadržavanje polarnijih organskih spojeva u usporedbi s fazama koje sadrže ugljikovodične lance vezane na silikagel.⁵⁸ Nakon razdvajanja na kromatografskoj koloni i detekcije detektorom UV s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector, DAD*) spojevi se skladište na SPE-sorbense koji su prethodno kondicionirani i ekvilibrirani odgovarajućim protoniranim otapalima koja se koriste u kromatografiji. Da bi se spojevi zadržali na SPE-sorbensu, potrebno je smanjiti elucijsku jakost organske pokretne faze, a to se postiže upotrebom dodatne pumpe (tzv. *make-up* pumpe) koja osigurava dodatni protok vodene faze. Najbolje zadržavanje analita na sorbensu postiže se kada je dodatni protok vodene faze od 2 do 4 puta veći u odnosu na protok pumpe LC. Nakon kromatografske analize sorbensi se suše u struji dušika u trajanju od 30 min do 60 min kako bi se uklonila protonirana otapala. Nakon sušenja analiti se ispiru sa SPE-sorbensa deuteriranim otapalom (150 μ l – 200 μ l) izravno u protočnu ćeliju NMR ili u cjevčicu NMR, a potom se snimaju spektri NMR.

Tehnika LC-SPE-NMR ima nekoliko prednosti u odnosu na LC-NMR. Prva prednost je upotreba protoniranih otapala u kromatografskoj analizi umjesto deuteriranih otapala čime se smanjuju troškovi analize. Sekvence za supresiju signala otapala nisu nužne jer se sorbensi suše u struji dušika, a spojevi eluiraju sa SPE-sorbensa deuteriranim otapalom. U tehnici LC-NMR važan je oblik kromatografskog pika koji se tijekom prijenosa analita kroz kapilaru širi. Posljedica toga je smanjena osjetljivost mjerenja zbog smanjenog volumena analita koji dopijeva u aktivni volumen protočne ćelije NMR. U tehnici LC-SPE-NMR nema efekta širenja pika jer se analit skladišti na SPE-sorbensu, a potom ispiru deuteriranim otapalom u vrlo uskoj i koncentriranoj zoni (slika 5). Najveća prednost sustava LC-SPE-NMR je mogućnost

višestrukog ukoncentriravanja analita na isti SPE-sorbens provođenjem više uzastopnih kromatografskih analiza. Istraživanje svojstava polimernih SPE-sorbensa poput Resin SH i Resin GP (kolonice unutarnjeg promjera 2 mm) pokazalo je da je kapacitet sorbensa od 1 mg do 1,5 mg spoja ukoliko je zadržavanje analita kvantitativno.¹³ Primjenom takvih sorbensa moguće je izdvojiti dovoljnu masu analita za snimanje svih vrsta spektara NMR neophodnih za strukturnu identifikaciju. Nasuprot tome, u tehnici LC-NMR masa uzorka koja je na raspolaganju za snimanje spektara NMR određena je kapacitetom kromatografske kolone u samo jednom injektiranju.



Slika 5. Oblik kromatografskog pika u tehnici: 1) LC-NMR; 2) LC-SPE-NMR. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 14

2.1.5. Primjena tehnike LC-SPE-NMR

Prvi prototip sustava LC-SPE-NMR objavljen je 1998. godine. Griffiths i Horton uveli su dodatnu kolonu (engl. *guard column*) i dodatni protok deuterirane vode u sustav LC-NMR. Analit je eluiran u probu NMR deuteriranim acetonitrilom.⁵⁹ Tri godine kasnije Nyberg i suradnici analizirali su kapsaicin iz ljutih papričica sustavom LC-NMR (600 MHz) uz dodatni SPE-sorbens C18 i dodatni protok deuterirane vode.⁶⁰ Godine 2003. dizajniran je moderni sustav LC-SPE-NMR s krio-probom. Exarchou i suradnici upotrijebili su sustav LC-SPE-krio NMR-MS (400 MHz i 600 MHz) za analizu ekstrakta grčkog origana u kojem su identificirali neke flavonoide, ružmarinsku kiselinu i karvakrol.⁶¹

Tehnika LC-SPE-NMR isprva je često korištena u analizi prirodnih produkata. Pretraživanjem literature pronađene su brojne publikacije koje opisuju primjenu ove tehnike u analizi antioksidacijskih flavonoida, iridoidnih glikozida, kardenolida, izoflavonoida, fenolnih spojeva u ekstraktima maslinovog ulja, lignana te oksigeniranih diterpena.^{62–68} Chang i suradnici analizirali su ekstrakte lišća rijetkog zimzelenog japanskog grma latinskog naziva *Trochodendron aralioides* tehnikom LC-SPE-NMR.⁶⁹ Budući da biljka *Trochodendron aralioides* spada među relikte, početna količina uzorka bila je ograničena. Unatoč tome izolirano je 9 novih spojeva iz skupine neolignan-ramnozida, i to većinom dijastereomeri. Konfiguracija dijastereomera određena je na temelju podataka spektroskopije NMR i cirkularnog dikroizma. Autori su naglasili da je prednost tehnike LC-SPE-NMR upotreba puno manjih masa uzorka i volumena organskih otapala u usporedbi sa semipreparativnom tekućinskom kromatografijom. Wen i suradnici objavili su zanimljivo istraživanje antihiperlipidemijskog učinka ekstrakata rakovica. Autori su uspješno izolirali, a potom identificirali 10 spojeva tehnikom LC-SPE-MS/NMR. Također su naglasili učinkovitost primjene ove tehnike u dereplikaciji prirodnih produkata koja je iznimno važna u istraživanju i razvoju novih lijekova.⁷⁰

Godejohann i suradnici prvi su puta primijenili sustav LC-SPE-NMR-MS sa spektrometrom NMR jakosti magnetskog polja 500 MHz za analizu metabolita paracetamola u ljudskom urinu.⁷¹ Usporedili su rezultate mjerenja na instrumentu bez i s instaliranom krio-probom NMR te su pokazali da je osjetljivost sustava s krio-probom veća 5 puta. Ovo istraživanje predstavlja prvu primjenu tehnike LC-SPE-NMR u analizi metabolita lijekova. Zahvaljujući napretku tehničkih postavki uređaja te povećanjem osjetljivosti tehnika LC-SPE-NMR s vremenom je postala sve češće analitičko oruđe za analizu metabolita lijekova, procesnih onečišćenja i razgradnih produkata u lijekovima.^{72–75} Nadalje, sustav LC-SPE-NMR (400 MHz s krio-probom) uspješno je primijenjen za analizu procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina koji je polazni spoj za sintezu nekih djelatnih tvari kao što su nilotinib, ponatinib, radotinib, anacetrapib i cinacalcet. Izolirano je i identificirano ukupno 10 onečišćenja čiji su udjeli u rasponu od 0,15 % do 1,87 %.⁷⁶ Schmidt i suradnici primijenili su tehniku LC-SPE-NMR-MS za analizu 16 različitih mono- i diestera flurbiprofen-polietilen glikola.⁷⁷ Autori su naglasili brzinu, učinkovitost i potencijal tehnike za primjenu u farmaceutskim analizama.

Tehnika LC-SPE-NMR također je korištena u analizi organskog sastava tla i sedimenata. Simpson i suradnici usporedili su analizu odabranih ekstrakata prirodne organske tvari tehnikom LC-SPE-NMR s tehnikom LC-NMR uz skladištenje spojeva u kapilarnim petljama. Naglasili su prednost skladištenja spojeva na SPE-sorbensima, kao i potencijal tehnike LC-SPE-NMR u analizi kompleksnijih matrica uz primjenu višedimenzijske tekućinske kromatografije za odjeljivanje većeg broja spojeva različite polarnosti.⁷⁸

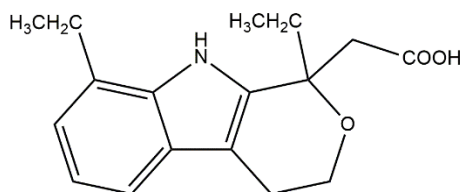
Meier i suradnici razvili su i validirali metodu LC-SPE/NMR za analizu produkata hidrolize sumpornog iperita, kožnog bojnog otrova. Metoda se pokazala prikladnom za analizu odabranih spojeva u tragovima, i to u realnim uzorcima tretiranima prema standardnim analitičkim propisima.⁷⁹

Tehnika LC-SPE-NMR nešto je rjeđe korištena za praćenje kemijskih reakcija. Seger i suradnici primijenili su tehniku LC-SPE-NMR za praćenje reakcije nastajanja Mosherovih estera određenih alkohola poliina te za određivanje njihove apsolutne konfiguracije.¹⁵ Uspješno su snimili spektre ¹H i ¹⁹F NMR s manje od 10 µg uzorka unutar 15 min na spektrometru jakosti magnetskog polja 500 MHz. Nadalje, Larsen i suradnici identificirali su i strukturno karakterizirali produkte reakcije između djelatne tvari, 5-aminosalicilne kiseline, i pomoćne tvari, limunske kiseline, nastale unutar formulacije lijeka tijekom skladištenja.²²

2.2. Etodolak

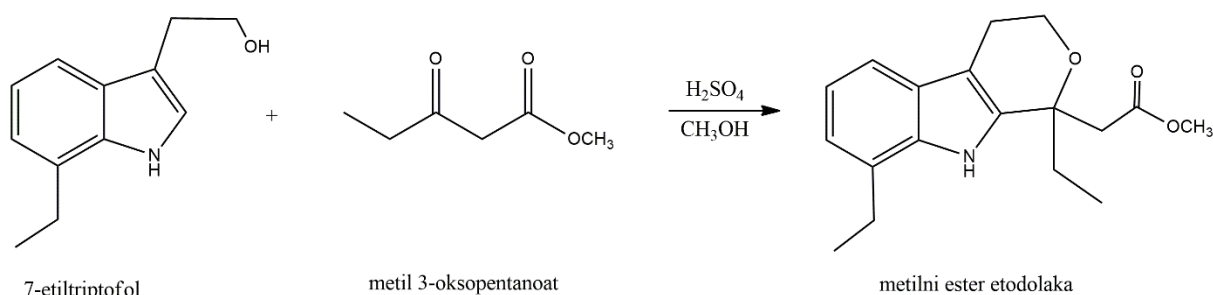
Etodolak, 2-(1,8-dietil-4,9-dihidro-3*H*-pirano[3,4-*b*]indol-1-il)octena kiselina, je kiralni nesteroidni protuupalni lijek koji dolazi na tržište kao racemična smjesa aktivnog enantiomera *S*-(+) i neaktivnog enantiomera *R*-(-). Koristi se za liječenje reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Terapijski učinak etodolaka temelji se na sprječavanju sinteze prostaglandina putem selektivne inhibicije enzima ciklooksigenaze 2.⁸⁰ Kemijska struktura etodolaka prikazana je na slici 6.

Sinteza etodolaka i njegovih prekursora patentirana je 1971. godine,⁸¹ a nakon toga objavljeni su i brojni drugi patenti koji opisuju sintezu derivata 1,3,4,9-tetrahidropiran[3,4-*b*]indola i 1,3,4,9-tetrahidrotiopiran[3,4-*b*]indola poznatih po protuupalnom, antibakterijskom i antigljivičnom djelovanju.⁸²⁻⁸⁵



Slika 6. Strukturna formula etodolaka

Ključni međuprodukt u sintezi etodolaka je njegov alkilni ester koji se pripravlja reakcijom oksa-Pictet-Spengler (slika 7) uz upotrebu različitih Brönstedovih i Lewisovih kiselina.⁸⁶ Zbog visoke cijene Lewisovih kiselina i nepraktičnosti za rad na većoj skali sinteze, preferira se upotreba anorganskih mineralnih kiselina poput HCl, HBr, H₂SO₄ i H₃PO₄.⁸⁵



Slika 7. Shematski prikaz pripreve metilnog estera etodolaka reakcijom oksa-Pictet-Spengler u metanolu uz sumpornu kiselinu kao katalizator

Polazni spoj za sintezu etodolaka je 7-etiltriptofol (slika 7). Sintezu triptofola i njegovih derivata karakterizira nizak do srednji prinos reakcije te niži stupanj čistoće konačnih produkata.⁸⁷ Sukladno tome, 7-etiltriptofol dostupan je na tržištu u različitim stupnjevima čistoće o čemu ovisi i njegova cijena. Priprava metilnog estera etodolaka reakcijom oksa-Pictet-Spengler uz upotrebu 7-etiltriptofola čistoće u rasponu od 79 % do 95 % opisana je u nekoliko patenata.^{88,89} Čistoća polaznog spoja, u ovom slučaju 7-etiltriptofola, definirat će u konačnici stupanj čistoće produkta, etodolaka. Stoga je važno poznavati profil onečišćenja polaznih tvari za sintezu kako bi pročišćavanje produkta bilo što brže i učinkovitije.

2.2.1. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenje se definira kao komponenta djelatne tvari ili gotovog lijeka koja nije kemijski jednaka toj djelatnoj tvari, pomoćnoj tvari niti aditivima prisutnima u gotovom farmaceutskom proizvodu.² Prema smjernicama ICH onečišćenja u lijekovima razmatraju se iz kemijskog i

sigurnosnog gledišta. Kemijsko gledište podrazumijeva identifikaciju i klasifikaciju onečišćenja, definiranje razine onečišćenja, uvrštavanje onečišćenja u specifikacije te detaljno opisivanje analitičkih postupaka korištenih za analizu onečišćenja.¹

Onečišćenja se mogu razvrstati na organska, anorganska i ostatna otapala. Organska onečišćenja mogu biti procesna i onečišćenja srodna djelatnoj tvari, a nastaju tijekom postupka proizvodnje i/ili skladištenja lijeka. To mogu biti polazne sirovine, nusprodukti, intermedijari, razgradni produkti, reagensi, ligandi i katalizatori. Anorganska onečišćenja potječu iz postupka proizvodnje i uglavnom su poznata. Tu spadaju reagensi, ligandi, katalizatori, teški metali i metali prisutni u tragovima, anorganske soli i tvari koje se koriste prilikom filtracije. Ostatna otapala su organske ili anorganske tekućine poznatog kemijskog sastava i toksičnosti korištene za otapanje reaktanata i kao medij za sintezu.¹

Definiranje razine onečišćenja predstavlja vrijednost iznad koje svako onečišćenje treba biti identificirano i karakterizirano relativnim vremenom zadržavanja u kromatografskoj koloni u odnosu na glavnu komponentu ili u odnosu na referentni standard. Prema smjernicama ICH za svaku tvar, čiji je dnevni unos u ljudski organizam manji od ili jednak 2 g, regulatorne agencije propisuju razinu onečišćenja koja je 0,15 % za poznata onečišćenja, odnosno 0,10 % za nepoznata onečišćenja. Ako je dnevni unos veći od 2 g, propisi su puno stroži, a dozvoljena razina onečišćenja u tom je slučaju 0,05 %.¹

S obzirom na stroge zahtjeve regulatornih agencija za niskim razinama onečišćenja analitičke metode koje se koriste u identifikaciji i kvantifikaciji onečišćenja trebaju biti prikladne te vrlo osjetljive i selektivne. Svaki analitički postupak treba biti detaljno opisan i validiran. Prema smjernicama ICH analitički postupci mogu se razvrstati na identifikacijske testove, testove određivanja sadržaja onečišćenja, granične testove za kontrolu onečišćenja i testove određivanja sadržaja djelatne ili neke pomoćne tvari u farmaceutskom proizvodu.⁹⁰

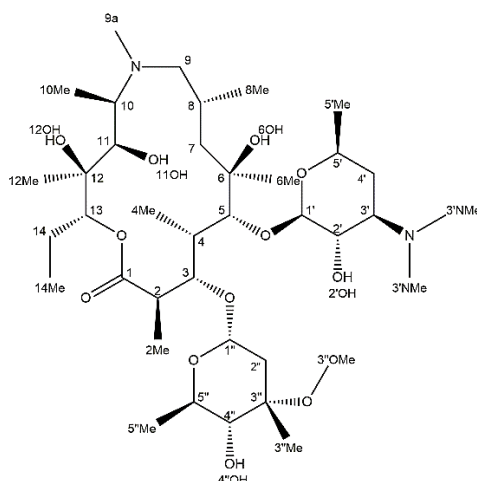
Holm i suradnici su u iscrpnom preglednom članku prikazali analitičke tehnike koje se koriste u identifikaciji onečišćenja.⁹¹ Zahvaljujući izuzetnom napretku u tehnologiji izrade kromatografskih kolona, novih monolitnih nepokretnih faza i kolona sa čvrstom jezgrom (engl. *core-shell*) najčešće korištena tehnika je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), zatim tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl., *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) i tekućinska kromatografija na temperaturama višima od 60 °C (engl. *High-Temperature Liquid Chromatography*, HTLC). Za nedvojbenu identifikaciju i strukturnu karakterizaciju nepoznatih

onečišćenja prednost ima tehnika LC-MS ili LC-MS/MS. Ako su nepoznata onečišćenja izomeri, tehnika LC-NMR ima važnu ulogu u njihovom razlikovanju. U slučajevima kada je količina onečišćenja nedovoljna za snimanje dvodimenzijskih spektara NMR, koristi se tehnika LC-SPE-NMR u kojoj se onečišćenje dodatno ukoncentrira na jedinici SPE, a zatim se snimaju spektri NMR. Za potvrdu predložene strukture onečišćenja potrebno ga je sintetizirati i na takvom sintetiziranom spoju također provesti strukturnu karakterizaciju te usporediti rezultate.⁹¹

Tijekom sinteze nove djelatne tvari vrlo često u reakcijskoj smjesi nastaju izomeri (konstitucijski izomeri, stereoizomeri) koji mogu imati različita farmakokinetička i farmakodinamička svojstva. Gotovo 56 % lijekova na tržištu su kiralne tvari od kojih se 88 % primjenjuje kao racemati.⁹² Nakon tzv. “talidomidne katastrofe” koja se dogodila 60-ih godina prošlog stoljeća, posebna se pozornost pridaje odjeljivanju i analizi izomera. Naime, talidomid je sintetiziran 1951. godine kao racemična smjesa i bio je lijek kojeg su trudnice konzumirale protiv jutarnjih mučnina i za smirenje. S vremenom se pokazalo da je konzumacija talidomida povezana s učestalim malformacijama ploda. Godine 1961. utvrđeno je da izomer (*S*)-talidomida ima teratogeno djelovanje.⁹³ Singh i suradnici su u preglednom članku prikazali brze, pouzdane i osjetljive tehnike LC i LC-MS koje su najčešće korištene za odjeljivanje enantiomera etodolaka.⁹² Tehnike LC mogu se podijeliti na izravne i neizravne. Izravne tehnike LC podrazumijevaju: (1) odjeljivanje enantiomera na kiralnim nepokretnim fazama i (2) primjenu kiralnog selektora imobiliziranog na inertnu podlogu ili dodanog pokretnoj fazi. Derivatizacija enantiomerne smjese prikladnim derivatizacijskim reagensom te odjeljivanje pripremljenih derivata na akiralnim nepokretnim fazama ubraja se u neizravne tehnike LC.

2.3. Azitromicin i njegovi derivati

Azitromicin je polusintetski derivat eritromicina A i predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika nazvane azalidi zbog prisutnosti dušikovog atoma u 15-eročlanom makrolaktonskom prstenu (slika 8). Zbog poboljšanih farmakokinetičkih svojstava u odnosu na eritromicin, azitromicin je postao antibiotik širokog spektra djelovanja na Gram pozitivne i Gram negativne bakterijske sojeve.²⁴

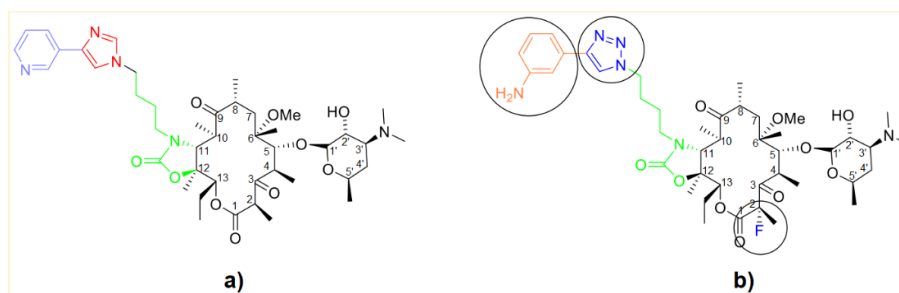


Slika 8. Struktura azitromicina s pobrojanim atomima ugljika

Koristi se za liječenje bakterijskih infekcija gornjih i donjih dišnih puteva, nekih kožnih infekcija te spolno prenosivih bolesti, a istraživanja su pokazala i dobru antimalarijsku aktivnost u kombinaciji s derivatima artemisina i kinina.⁹⁴ Mehanizam antibakterijskog djelovanja temelji se na reverzibilnom i selektivnom vezanju azitromicina na ribosomsku podjedinicu 23S rRNA u domeni V u blizini centra peptidil-transferaze u podjedinici 50S bakterijskog ribosoma te na steričkom blokiranju sinteze peptida već u ranim fazama translacije.^{24,95}

Unatoč sigurnoj i jednostavnoj primjeni, dobroj akumulaciji u tkivima, produljenom djelovanju i učinkovitom izlučivanju iz organizma, antibakterijska aktivnost azitromicina na rezistentne bakterijske sojeve poput *Streptococcus pneumoniae* nije bila zadovoljavajuća. Stoga se javila potreba za sintezom makrolidnih antibiotika treće generacije. Predstavnik ove skupine je telitromicin koji je sintetiziran 1997. godine u francusko-njemačkoj kompaniji Aventis. U strukturi telitromicina uklonjena je šećerna jedinica kladinoza, a hidroksilna skupina 3-OH na makrolaktonskom prstenu oksidirana je u keto-skupinu zbog čega je nova generacija makrolida nazvana ketolidi (slika 9a). Nadalje, položaji C-11 i C-12 makrolaktonskog prstena modificirani su vezanjem alkil-arilnog ostatka 4-(piridin-3-il)-1H-imidazol-1-il čime je dobiveno dodatno vezno mjesto antibiotika na bakterijski ribosom i prevladan problem bakterijske rezistencije na postojeće makrolidne antibiotike. Iako je telitromicin pokazivao izvrsno antibakterijsko djelovanje na rezistentne bakterijske sojeve na koje su eritromicin i azitromicin bili neaktivni, ipak je povučen s tržišta zbog prevelikog broja nuspojava i hepatotoksičnosti.²⁵ Uvođenjem atoma fluora na položaj C-2 makrolaktonskog prstena pripremljen je fluoroketolid solitromicin (slika 9b). Atom fluora u strukturi solitromicina povoljno je utjecao na ostvarivanje dodatnih

interakcija makrolida s bakterijskim ribosomom što je rezultiralo još boljom antibakterijskom aktivnošću u odnosu na telitromicin.²⁵ Unatoč navedenoj činjenici Američka agencija za hranu i lijekove nije dozvolila plasman solitromicina na tržište zbog prevelike strukturne sličnosti s telitromicinom te je on još uvijek u fazi kliničkog istraživanja.

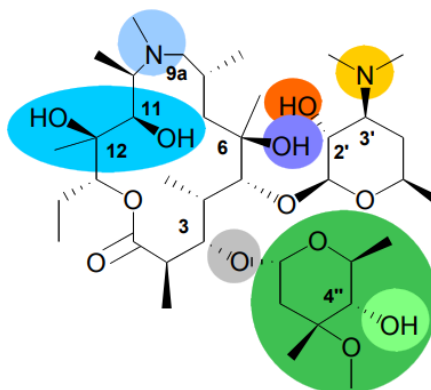


Slika 9. Strukturne formule: a) telitromicina i b) solitromicina. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 25

Daljnja istraživanja u području sinteze makrolidnih antibiotika usmjerena su na modifikaciju makrolaktonskog prstena dodavanjem različitih alkilnih i/ili arilnih skupina, zatim na sintezu hibridnih molekula te makrolidnih konjugata. Budući da je uvođenje heteroaromatskih spojeva u strukturu telitromicina i solitromicina rezultiralo dodatnim povoljnim interakcijama s ribosomom, analogna strategija primijenjena je u sintezi konjugata eritromicina, azitromicina i klaritromicina s nukleozidima i nukleobazama. Međutim, ovi spojevi nisu pokazali zadovoljavajuću antibakterijsku niti antitumorsku aktivnost te su isključeni iz daljnjih istraživanja.²⁴

Konjugatima se smatraju molekule u kojima su farmakoforne jedinice povezane metabolički stabilnom poveznicom (tzv. linkerom). Cjepni konjugati (engl. *cleavage conjugates*) su molekule kod kojih je poveznica metabolički nestabilna i čija je uloga u metabolizmu otpuštanje dvaju farmakofora koji će neovisno reagirati s biološkom metom. Hibridne molekule mogu biti spojeni hibridi (engl. *fused hybrids*) i udruženi hibridi (engl. *merged hybrids*). Spojeni hibridi sadrže poveznicu odgovarajuće veličine koja omogućuje farmakoforima da budu prostorno blizu. Kod udruženih hibrida početne su građevne jedinice kombinirane i ujedinjene u cjelinu što rezultira dobivanjem manjih i jednostavnijih molekula. Većina hibridnih molekula makrolida sintetizirana je u obliku konjugata, spojenih hibrida te udruženih hibrida, dok su cjepni konjugati nešto rjeđi.⁹⁶

Na slici 10 različitim su bojama prikazani položaji na makrolaktonskom prstenu i šećernim jedinicama azitromicina pogodni za kemijsku modifikaciju i vezanje različitih farmakofora. Među prvim konjugatima su bili spojevi u kojima je kemijski modificiran položaj 9a-N na makrolaktonskom prstenu.



Slika 10. Položaji u strukturi azitromicina pogodni za kemijsku modifikaciju. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 96

Tako su sintetizirani konjugati azitromicina s derivatima sulfonamida koji su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost na Gram-pozitivne bakterijske sojeve *S. pyogenes* i *S. pneumoniae* u odnosu na azitromicin.⁹⁷ Derivati uree i tiouree s različitim alkilnim i arilnim supstituentima vezani su na 9a-(γ -aminopropil) derivat azitromicina koji je pripremljen Michaelovom adicijom akrilonitrila na azitromicin i katalitičkim hidrogeniranjem uz Pt kao katalizator. Novosintetizirani spojevi karakterizirani su spektroskopijom IR i NMR te spektrometrijom masa. Rezultati antibakterijskog testiranja pokazali su vrlo dobru aktivnost na Gram-pozitivne patogene dišnih puteva poput *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* i *S. aureus* te Gram-negativne sojeve kao što su *M. catarrhalis* i *H. influenzae*.⁹⁸ Nadalje, konjugati 9a-(γ -aminopropil) derivata azitromicina s karbamoil, tiokarbamoil, aminoetil i cijanoetil ureom/tioureom pokazali su izvrsnu antibakterijsku aktivnost na uzročnika malarije *P. falciparum*, dok su amino- i amido-derivati imali aktivnost usporedivu s klorokinom, jednim od prvih lijekova protiv malarije, te su bili podvrgnuti testiranju *in vivo*.^{99,100}

Osim modifikacije određenih položaja na makrolaktonskom prstenu, šećerne jedinice, posebno kladinoza, su prepoznate kao važna mjesta za vezanje farmakofora. Kineski znanstvenici sintetizirali su derivate azitromicina modificirane na položaju C-4'' šećera kladinoze te na položajima C-11 i C-12 makrolaktonskog prstena. Ovi su derivati imali vrlo

dobru antibakterijsku aktivnost na soj *S. pneumoniae* koji je bio rezistentan na eritromicin.¹⁰¹ Povezivanjem azitromicina s fluorokinolonskim antibiotikom ciprofloksacinom na položaju C-4' preko propenoilne poveznice nastala je nova skupina makrolidnih konjugata nazvana makroloni. Makroloni su pokazivali vrlo dobru antibakterijsku aktivnost na širokom spektru rezistentnih bakterijskih sojeva, te zadovoljavajuću aktivnost na *H. influenzae*.¹⁰²

Poznato je da uklanjanje šećerne jedinice kladinoze iz strukture azitromicina negativno utječe na antibakterijsku aktivnost derivata budući da kladinoza sudjeluje u ostvarivanju interakcija s bakterijskim ribosomom.¹⁰³ Međutim, sintetizirani su derivati 3-dekladinozil-3-hidroksi-azitromicina koji su na položaju 9a-N imali vezane različite alkilne, odnosno arilne derivate uree i tiouree. Ovi spojevi su pokazivali antibakterijsku aktivnost na bakterijski soj *S. pneumoniae* usporedivu s azitromicinom i značajno bolju aktivnost u usporedbi s 3-dekladinozil-azitromicinom. Na temelju navedenih činjenica pretpostavljeno je da poveznice na položaju 9a-N zamjenjuju ulogu kladinoze i da su odgovorne za ostvarivanje interakcija s bakterijskim ribosomom.²⁸ Ovo je istraživanje potaknulo znanstvenike na daljnje proučavanje dekladinoznih derivata azitromicina.

Također je poznato da skupine 2'OH i 3'-NMe₂ iz šećerne jedinice desozamina sudjeluju u ključnim interakcijama makrolida s bakterijskim ribosomom uzrokujući inhibiciju translacije.¹⁰⁴ Modifikacijom položaja C-3' na desozaminu vezanjem klorokinolina pomoću alkilnih poveznica različite duljine lanca pripremljeni su konjugati azitromicina koji su imali značajno smanjenu antibakterijsku aktivnost, ali izrazito povećanu antimalarijsku aktivnost. Međutim, zbog nepovoljnih farmakokinetičkih svojstava i povećane citotoksičnosti ova klasa spojeva nije dalje istraživana.⁹⁶ Položaj C-2' na desozaminu modificiran je analogno prethodno opisanoj promjeni na položaju C-3's istim supstituentima. Ti su derivati imali 800 puta veću antimalarijsku aktivnost na *P. falciparum* u usporedbi s azitromicinom, a njihova se aktivnost smanjivala kada bi se atom klora na kinolinskoj jezgri zamijenio atomom vodika ili kada bi se uklonila kladinoza iz azalidne okosnice.⁹⁶

Osim antibakterijske i antimalarijske aktivnosti makrolidi pokazuju i određena protuupalna svojstva.¹⁰⁵ Znanstvenici iz istraživačkog instituta PLIVA razvili su strategiju sinteze konjugata azitromicina s kortikosteroidima koji su nazvani makrolaktonolidi. Najpoznatiji predstavnici ove skupine spojeva su hibridi azitromicina s deksametazonom i dezoksimetazonom koji su vezani na azitromicin na položaju 9a-N.¹⁰⁶

Znanstvenici Janas i Przybylski objavili su iscrpan pregledni članak u kojem su opisane strukture, mehanizmi djelovanja i biološka aktivnost svih 14-eročlanih i 15-eročlanih makrolida te njihovih analoga i hibrida sa steroidima, heterocikličkim spojevima, nukleozidima i peptidima sintetiziranim u razdoblju od 2009. godine do 2019. godine.¹⁰⁷ Autori su naglasili da, unatoč brojnim istraživanjima u ovom području, terapijski potencijal makrolida još uvijek nije u potpunosti otkriven te da je potrebno nastaviti istraživati nove i učinkovitije derivate makrolida koji će imati drugačije mehanizme djelovanja i prihvatljive nuspojave, a sve s ciljem borbe protiv rastuće bakterijske rezistencije.

2.3.1. Analiza makrolida kromatografskim tehnikama i spektrometrijom masa

Tradicionalan pristup analizi makrolidnih antibiotika uključuje tehnike mikrobiološkog testiranja koje su dugi niz godina bile sastavni dio monografije pojedinih antibiotika. S obzirom na stroge zahtjeve regulatornih agencija za određivanjem niskih koncentracija analita nedostatak mikrobioloških tehnika vrlo je često nedovoljna osjetljivost i nespecifičnost. Tehnike LC i LC-MS danas su najčešće korištene tehnike za analizu makrolidnih antibiotika u različitim biološkim matricama kao što su krv, urin, krvni serum, krvna plazma i mišićno tkivo, zatim u hrani (mlijeko, med, jaja, riba), vodi, tlu i tabletama.¹⁰⁸⁻¹¹¹

Za kromatografsko odjeljivanje makrolida koristi se tekućinska kromatografija obrnutih faza na kromatografskoj koloni C₁₈ uz eluiranje smjesom acetonitrila i/ili metanola i fosfatnog pufera u različitim volumnim omjerima. Valna duljina detekcije ovisi o analitu, a najčešće je u rasponu od 210 nm za klaritromicin do 254 nm za rosamicin. Budući da makrolidi imaju slabo osjetljive kromofore, detekcija UV nije prikladna za određivanje vrlo niskih koncentracija makrolida, odnosno makrolida u tragovima. Osim detektora UV(DAD) primjenjuju se amperometrijski i kulometrijski detektori, spektrometar masa te fluorimetrijski detektori ako je makrolid prethodno derivatiziran.¹¹² Da bi riješili problem različite i slabe apsorpcije UV zračenja za veći broj komponenata u smjesi, Wang i suradnici razvili su metodu HPLC-CAD koristeći detektor s nabijenim aerosolom (engl. *Charged Aerosol Detector*, CAD).¹¹³ Primjenom detektora CAD autori su kvantitativno određivali razgradne produkte 16-eročlanih makrolida jozamicina, leukomicina i meleumicina. Granica kvantifikacije bila je 0,03 % u odnosu na početnu koncentraciju uzorka koja je bila 5,0 mg mL⁻¹. Strukture razgradnih produkata određene su tehnikom MS sa stupicom iona i analizatorom vremena leta (engl. *Ion Trap-Time-of-Flight/Mass Spectrometry*, IT-TOF/MS).

Ekstrakcija makrolida iz bioloških matrica uključuje ekstrakciju tekuće-tekuće organskim otapalima poput acetonitrila i *tert*-butil-metil-etera. Analiti se po potrebi dodatno pročišćavaju ekstrakcijom na čvrstoj fazi koristeći SPE-sorbens C18 ili polimerni sorbens Oasis-HLB.^{108,111} Räder i suradnici su 1985. godine primijenili automatiziranu metodu HPLC s mogućnošću izmjene dviju kolona za pročišćavanje *on-line*, i to za analizu jozamicina u krvnoj plazmi.¹¹⁴ Uzorak je bez prethodnog pročišćavanja injektiran na kolonu C₁₈. Kolona je isprana vodom kako bi se uklonile sve hidrofilne komponente, a jozamicin je potom eluiran povratnim ispiranjem (engl. *backflushing*) na analitičku kolonu s cijano-nepokretnom fazom. Analitički povrat bio je 100 %, a granica detekcije 25 ng mL⁻¹. Još jedan primjer analize i pročišćavanja makrolida *on-line* rad je znanstvenika Dowa i njegovih suradnika u kojem su opisali potpuno automatiziranu metodu HPLC za određivanje spiramicina u ljudskoj krvnoj plazmi.¹¹⁵ Nakon pročišćavanja uzorka *on-line* spiramicin je eluiran u analitičku kolonu te kvantificiran metodom unutarnjeg standarda. Analitički povrat bio je u rasponu od 71 % do 96 %, a granica kvantifikacije 50 ng mL⁻¹. Prednost opisanog automatiziranog sustava bila je što su se korištene kolone mogle paralelno isprati i rekondicionirati, za razliku od sustava kojeg su koristili Räder i suradnici.

Analiza makrolida u različitim uzorcima tehnikom HPLC usmjerena je uglavnom na analizu manjeg broja analita, najčešće jednog makrolida. U slučaju potrebe za analizom većeg broja makrolidnih antibiotika istovremeno tehnika izbora je LC-MS, dok se za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju makrolida i/ili nepoznatih onečišćenja primjenjuje tehnika LC-MS/MS.¹¹⁰ Postupak pripreme uzorka i pročišćavanje jednaki su kao za tehniku HPLC. Osim ekstrakcije tekuće-tekuće pri atmosferskom tlaku i ekstrakcije na čvrstoj fazi koriste se tehnike ekstrakcije tekuće-tekuće pri povišenom tlaku (engl. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Micro-Extraction*, SPME) i disperzija matrice u čvrstoj fazi (engl. *Matrix Solid-Phase Dispersion*, MSPD). Tehnike ionizacije koje se koriste za makrolide su elektroraspršenje (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Za makrolide se koristi pozitivan način ionizacije, budući da oni sadrže jedan do tri dušikova atoma koji se lako protoniraju pa mogu nastati jednostruko, dvostruko ili trostruko nabijeni molekularni ioni. U slučaju azitromicina gotovo uvijek nastaju jednostruko nabijeni ion $[M + H]^+$ i dvostruko nabijeni ion $[M + 2H]^{2+}$. Trostruki kvadrupol i analizator vremena leta su najpogodniji i najčešće korišteni analizatori za analizu makrolida zbog velikog dinamičkog

raspona, osjetljivosti i reproducibilnosti.¹¹⁰ Liu i suradnici određivali su onečišćenja u uzorcima jozamicina, mideamicina i meleumicina tehnikom IT-TOF-MS/MS uz pozitivan način ionizacije.³¹ Uspješno su identificirali i strukturno karakterizirali 53 onečišćenja od kojih je 28 komponenata bilo potpuno novo. Istraživanje je pridonijelo bržoj i učinkovitijoj kontroli kvalitete makrolidnih antibiotika u farmaceutskoj proizvodnji.

Nadalje, ista grupa znanstvenika primijenila je spregnuti sustav “Trap-free” 2D LC/IT-TOF-MS za analizu citotoksičnih razgradnih produkata u uzorku jozamicina.¹¹⁶ Tehnika “Trap-free” 2D LC je tehnika dvodimenzijske kromatografije *on-line* u kojoj se komponente odjeljuju na kromatografskoj koloni u prvoj dimenziji uz eluiranje prikladnom pokretnom fazom. Nakon detekcije detektorom UV(DAD) odabrana komponenta se “zarobi” (engl. *trapped*) pomoću preklopnog ventila (engl. *switching valve*), a zatim ispere na kromatografsku kolonu u drugoj dimenziji s ciljem da se nehlapljiva pokretna faza korištena u prvoj dimenziji zamijeni hlapljivom pokretnom fazom prikladnom za analizu spojeva spektrometrijom masa.¹¹⁷

2.4. Derivati tiosemikarbazona

Tiosemikarbazoni i njihovi analozi s kisikom (semikarbazoni) su derivati hidrazona (slika 11). To su Schiffove baze opće kemijske formule $R_1R_2C=N-NH-C(=S)-NR_3R_4$, a dijele se na monotiosemikarbazone i bistiosemikarbazone. Prisutnost tionske, iminske i amino skupine u strukturi tiosemikarbazona čini ove spojeve izvrsnim polidentatnim ligandima koji mogu koordinirati ione metala. Podložni su keto-enolnoj tautomeriji, pa su moguća dva tautomerne oblika: neutralni keto-oblik i deprotonirani enolni oblik. Obje tautomerne forme mogu koordinirati metale ovisno o pH otopine. Prajapati i Patel su u preglednom članku prikazali sve novosintetizirane derivate tiosemikarbazona i njihove komplekse s metalima u razdoblju od 2014. godine do 2019. godine te su naglasili da su kompleksi tiosemikarbazona s metalima značajno biološki aktivniji od nekoordiniranih spojeva.¹¹⁸

Zahvaljujući kelirajućim svojstvima tiosemikarbazoni imaju biološku aktivnost i poznati su po protuupalnom, antitumorskom, antigljivičnom, antibakterijskom, antiproliferativnom, antikorozivnom i herbicidnom djelovanju.¹¹⁸ Mehanizam antitumorskog djelovanja tiosemikarbazona temelji se na: (1) stabilizaciji kompleksa DNA s enzimom topoizomeraza II zbog alkilacije tiolnih ogranaka na kompleksu što posljedično dovodi do apoptoze i (2) inhibiciji enzima ribonukleotid-reduktaze koja katalizira sintezu deoksiribonukleotida čime se sprječava sinteza DNA.¹¹⁹



Slika 11. Opća strukturna formula: a) tiosemikarbazona i b) semikarbazona

Bistiosemikarbazoni, za razliku od monotiosemikarbazona, manje su istraživani spojevi, iako su njihova kelirajuća svojstva bolja jer mogu praviti vrlo stabilne komplekse ponašajući se kao tetra-, penta- i heksadentatni ligandi. Kompleksi bistiosemikarbazona s radioaktivnim izotopima metala (bakar, galij, indij, tehnecij) primjenjuju se u neinvazivnoj medicinskoj dijagnostici onkoloških, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te u ciljanoj radiološkoj terapiji kao prijenosnici određene doze zračenja do specifičnog tkiva.¹²⁰

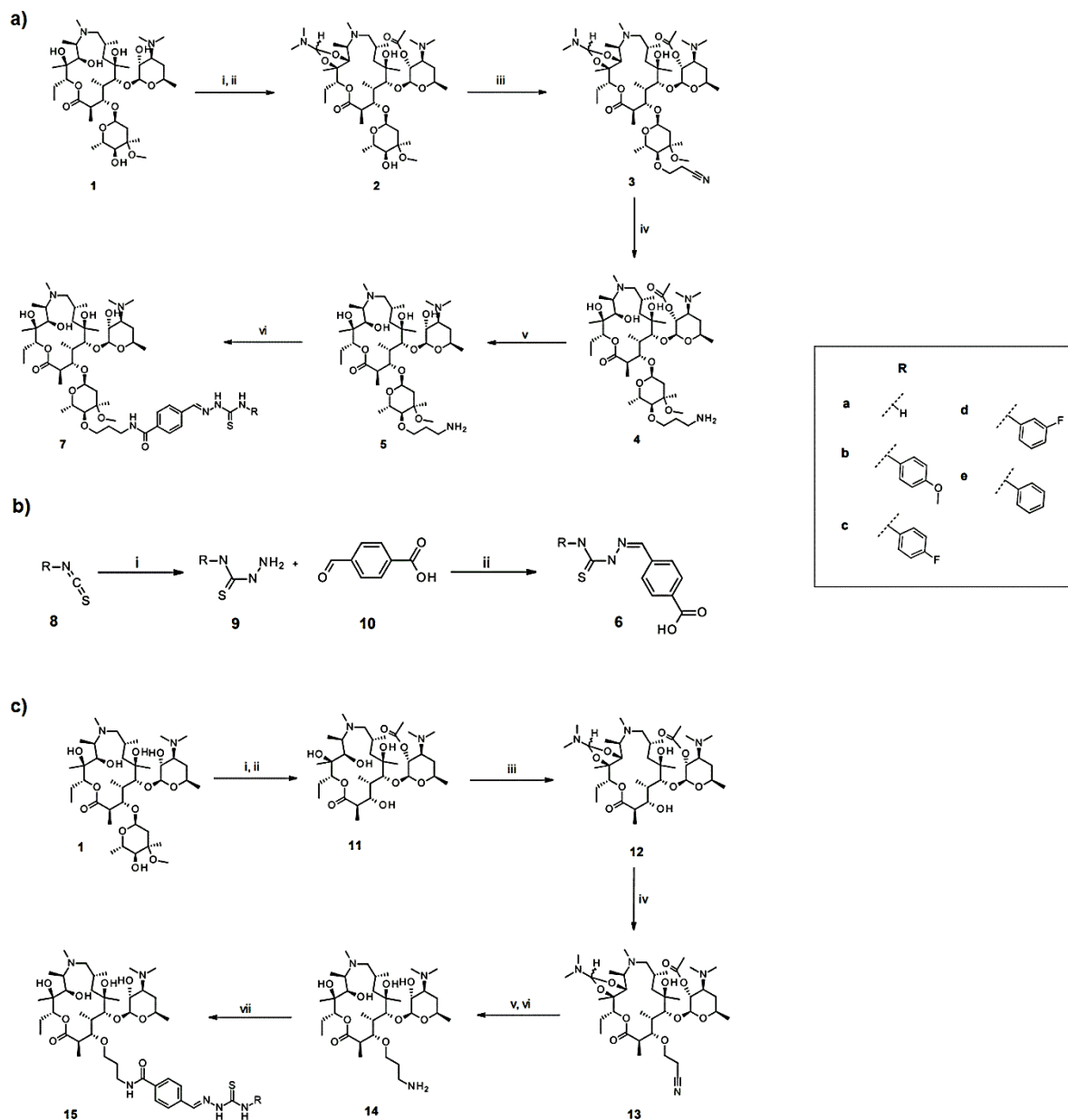
Tiosemikarbazoni se također primjenjuju kao kemijski senzori u kolorimetriji za određivanje kationa metala, aniona, pesticida, boja i lijekova, zatim kao fluorimetrijski senzori za selektivno prepoznavanje iona teških i toksičnih metala, te kao elektrokemijski (potenciometrijski i voltametrijski) senzori.¹²¹ Tang i suradnici sintetizirali su tiosemikarbazon derivatiziran kinolinom i primijenili ga kao kombinirani kolorimetrijsko-fluorimetrijski senzor za brzo, selektivno i osjetljivo određivanje bakrovih kationa i sulfidnih aniona u vodenoj otopini.¹²²

Neki tiosemikarbazoni, poput tiacetazona i perklozona, poznati su kao učinkoviti antituberkulotici. To su prolijekovi koji se tek nakon primjene metaboliziraju u aktivan farmakološki oblik, a zatim inhibiraju sintezu proteina u bakteriji *M. tuberculosis*.²⁷ Istraživanja su također pokazala da neki derivati tiosemikarbazona mogu utjecati na mehanizam efluks pumpe kod rezistentnog soja bakterije *S. aureus*. Stoga su se pokazali kao potencijalni antibiotici.¹²³ S obzirom na globalni problem sve veće otpornosti bakterija na makrolidne antibiotike daljnja istraživanja usmjerena su na dizajn i sintezu konjugata azalida s derivatima tiosemikarbazona. Pretpostavka je da će se povezivanjem povoljnih kemijskih svojstava makrolida i tiosemikarbazona postići sinergijski učinak poboljšanog antibakterijskog djelovanja na određene rezistentne sojeve bakterija, ali i proširiti primjena ovih spojeva u smjeru antimalarijske i protuupalne aktivnosti.

2.5. Makrozoni

Makrozoni su amidni konjugati azitromicina i derivata tiosemikarbazida sintetizirani u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu u suradnji s farmaceutskom kompanijom Selvita, Zagreb (ranije Fidelta).¹²⁴ Sintetski put makrozona sastoji se od nekoliko koraka. Prvi korak je priprava aminopropilnog derivata azitromicina koji se dobiva Michaelovom adicijom akrilonitrila na azitromicin i katalitičkim hidrogeniranjem uz Pt kao katalizator. Aminopropilna skupina ima ulogu poveznice između makrolida i tiosemikarbazida. U slučaju novosintetiziranih makrozona aminopropilna poveznica vezana je na položaje 9a-N i C-3-O- makrolaktonskog prstena te na položaj C-4'' šećerne jedinice kladinoze. Stoga su pripravljene 3 nove klase makrolidnih konjugata.¹²⁴ Drugi korak u sintezi makrozona je priprava derivata tiosemikarbazida. Reakcijom odabranih derivata izotiocijanata s hidrazin-monohidratom u propan-2-olu nastaju *N*-aril/alkilhidrazinkarbotioamidi odnosno tiosemikarbazoni. Nastali tiosemikarbazoni u reakciji s 4-formilbenzojevom kiselinom uz dodatak ledene octene kiseline u propan-2-olu prave tiosemikarbazide. Zadnji korak je reakcija amidacije između aminopropilnog derivata azitromicina i derivata tiosemikarbazida uz dodatak heksafluorofosfat azabenzotriazol tetrametil-uronijeve soli (HATU) i *N,N*-diizopropiletilamina (DIPEA).

Grgičević i suradnici sintetizirali su makrozone iz klase 4''- i 3- prema reakcijskim shemama prikazanim na slici 12.²⁹



Slika 12. Shematski prikaz sinteze: **a)** makrozona iz klase 4''; (i) *N,N*-dimetilformamid/dimetil acetal (DMF/DMA) (8 ekv.), toluen, 60 °C, 17 h; (ii) acetanhidrid (1 ekv.), NaHCO₃ (3 ekv.), DCM, sobna temp., 17 h; (iii) *t*-BuOH/THF 1/1, akrilonitril (6 ekv.), NaH (1,1 ekv.), od -10 °C do sobne temp., 1 h; (iv) PtO₂, H₂, 5 bara, CH₃COOH, sobna temp., 17 h; (v) CH₃OH, sobna temp., 17 h; (vi) produkt **6**, HATU, DIPEA, DCM, sobna temp.; **b)** tiosemikarbazida; (i) hidrazin monohidrat, propan-2-ol, sobna temp., 1 h; (ii) propan-2-ol, sobna temp., 17 h i **c)**

makrozona iz klase 3-O-; (i) acetanhidrid (1 ekv.), NaHCO₃ (3 ekv.), DCM, sobna temp., 17 h; (ii) 6 M HCl, 4 h; (iii) DMF/DMA (8 ekv.), toluen, 60 °C, 17 h; (iv) *t*-BuOH/THF 1/1, akrilonitril (6 ekv.), NaH (1,1 ekv.), od -10 °C do sobne temp., 1 h; (v) PtO₂, H₂, 5 bara, CH₃COOH, sobna temp., 17 h; (vi) CH₃OH, sobna temp., 17 h; (vii) produkt **6**, HATU, DIPEA, DCM, sobna temp. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 29

Antibakterijsko testiranje *in vitro* novosintetiziranih makrozona iz klase 4"- pokazalo je da spojevi imaju do 32 puta veću aktivnost na rezistentni soj *S. Pneumoniae* u usporedbi s azitromicinom, vrlo dobru aktivnost na *S. Pyogenes* te umjerenu aktivnost na Gram negativan bakterijski soj *H. Influenzae*. Nadalje, navedeni spojevi pokazali su aktivnost na rezistentan soj *S. Aureus* na kojeg je azitromicin neaktivan, dok je jedan spoj iz klase 3- imao 32 puta bolju aktivnost na bakterijski soj *E. faecalis* u usporedbi s azitromicinom. Računalno istraživanje interakcija novosintetiziranih makrozona s ribosomom pokazalo je da makrolaktonski prsten makrozona ostvaruje većinu Van der Waalsovih interakcija s ribosomom kao i azitromicin, ali su također uočene dodatne vodikove veze i π - π interakcije bočnih lanaca tiosemikarbazida s određenim nukleotidima koje najvjerojatnije doprinose učinkovitijem vezanju makrozona u aktivno mjesto i boljoj antibakterijskoj aktivnosti.^{29,124}

Provedena istraživanja pokazala su da makrozoni imaju zadovoljavajuću antibakterijsku aktivnost na rezistentne i susceptibilne bakterijske sojeve te, stoga, imaju potencijal za daljnje istraživanje i razvoj s ciljem dobivanja novih antibiotika.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i pribor

- acetonitril-D3 (D, 99,8 %), Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, SAD
- acetonitril, HPLC čistoće, Fisher Chemical, Velika Britanija
- acetonitril, HPLC čistoće, J. T. Baker, Pennsylvania, SAD
- amonijev hidrogenkarbonat, HPLC čistoće, Sigma Aldrich, Missouri, SAD
- 4-formilbenzojeva kiselina, čistoće 97 %, Sigma Aldrich, Missouri, SAD
- deionizirana voda pročišćena pomoću uređaja Milli-Q Integral Water Purification System, Merck, New Jersey, SAD
- 9a-(γ -aminopropil)azitromicin, Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- dimetilsulfoksid-D6 (D, 99,8 %), Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, SAD
- 2-feniletil-izotiocijanat, čistoće 96 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3-oksidi heksafluorofosfat, HATU, Acros Organics, New Jersey, SAD
- hidrazin monohidrat, čistoće 98 %, Sigma Aldrich, Missouri, SAD
- 1,5-bis(saliciliden)karbohidrazid, Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, PMF
- kalijev dihidrogenfosfat, *p.a.*, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- karbohidrazid, čistoće minimalno 98 %, Sigma Aldrich, Missouri, SAD
- metanol, HPLC čistoće, Carl Roth, GmbH, Karlsruhe, Njemačka
- metanol, HPLC čistoće, J. T. Baker, Pennsylvania, SAD
- mono(saliciliden)karbohidrazid, Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, PMF, Zagreb
- *N,N*-diizopropiletilamin, DIPEA, Acros Organics, New Jersey, SAD
- natrijev hidroksid, *p.a.*, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- octena kiselina, čistoće 96 %, Carlo Erba Reagents, Milano, Italija
- otopina amonijaka, $w = 25$ %, *p.a.*, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- *p*-(trifluormetoksifenil)-izotiocijanat, čistoće 97%, Alfa Aesar, Njemačka
- piperidin, čistoće minimalno 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- salicilaldehid, čistoće minimalno 98 %, Sigma Aldrich, Missouri, SAD
- tetrahidro-2-furfuril-izotiocijanat, Acros Organics, New Jersey, SAD

- 3-(2-hidroksietil)indol, čistoće 97 %, Sigma Aldrich, Missouri, SAD
- 3-fenilpropil-izotiocijanat, čistoće 98 %, Alfa Aesar, Njemačka
- uzorak 7-etiltriptofola, PLIVA, Zagreb, Hrvatska (5. studenog 2015.), kontrolni broj: 6834054
- filtri PTFE za injekcijsku špricu s promjerom pora 0,45 μm , Chromafil Xtra 45/25, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka
- filtri PTFE za injekcijsku špricu s promjerom pora 0,22 μm , Acrodisc CR13, Waters Associates, Milford, MA, SAD
- kromatografska kolona C18, Agilent Poroshell 120, dimenzije 250 mm x 4,6 mm, promjer čestica punila 4 μm
- kromatografska kolona C18, Waters Symmetry Shield RP, dimenzije 250 mm x 4,6 mm, promjer čestica punila 5 μm
- kromatografska kolona C18, Waters Xbridge, dimenzije 150 mm x 4,6 mm, promjer čestica punila 3,5 μm
- kromatografska kolona fenil, Waters XBridge, dimenzije 150 mm x 4,6 mm, promjer čestica punila 3,5 μm

3.2. Instrumenti

Za kromatografsko odjeljivanje spojeva korišten je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Infinity 1260 proizvođača Agilent Technologies opremljen kvaternom pumpom, automatskim uzorkivačem te injektorom, termostatiranim prostorom za kolonu i detektorom UV(DAD). Kromatogrami su obrađeni u programskom paketu *Agilent OpenLab CDS ChemStation*, Kalifornija, SAD.

Za izolaciju spojeva korišten je uređaj za ekstrakciju na čvrstoj fazi Prospekt2 proizvođača Spark Holland, Nizozemska. Uređaj se sastoji od automatskog izmjenjivača SPE-sorbensa (engl. *Automatic Cartridge Exchanger*, ACE), pumpe Knauer K-120 koja osigurava dodatni protok pokretne faze te visokotlačnog raspršivača s dvije injekcijske igle (engl. *High Pressure Dispenser*, HPD). Lijeva injekcijska igla služi za kondicioniranje i ekvilibriranje SPE-sorbensa acetonitrilom i vodom, dok desna injekcijska igla služi za eluiranje analita sa SPE-sorbensa u cjevčicu NMR deuteriranim otapalom. Za obradu podataka korišten je programski paket *Hystar* 3.2. tvrtke Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka.

Spektri NMR snimljeni su na spektrometrima u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu:

- Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend s izravnom krio-probom 5 mm BBO Prodigy i z-gradijentnom zavojnicom
- Bruker Avance NEO 600 MHz s neizravnom krio-probom 5 mm BBO Prodigy i z-gradijentnom zavojnicom

Snimljeni spektri NMR analizirani su u programskom paketu *TopSpin 3.6.1* tvrtke Bruker, Kalifornija, SAD.

Spektri MS snimljeni su na spektrometrima:

- Agilent 6550 LC-QTOF-MS proizvođača Agilent Technologies, u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu
- amaZon ETD s ionskom stupicom tvrtke Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka, u Institutu Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska
- Waters Acquity UPLC-MS proizvođača Waters, Massachusetts, SAD, opremljenog s detektorom PDA (engl. *Photo-Diode Array*) i jednostrukim kvadrupolnim analizatorom u tvrtki Selvita d.o.o. (ranije Fidelta), Zagreb, Hrvatska.
- spojevi izdvojeni iz uzorka 7-etiltriptofola snimljeni su na spektrometru Agilent 6490 LC-QQQ-MS s trostrukim kvadrupolnim analizatorom proizvođača Agilent Technologies u tvrtki Pliva, TAPI, Zagreb, Hrvatska

Spektri MS snimljeni su koristeći elektroraspršenje kao tehniku ionizacije u pozitivnom i/ili negativnom ionizacijskom načinu.

3.3. Analiza derivata karbohidrazida tehnikom LC-SPE/krio NMR

3.3.1. Priprava uzoraka i pokretne faze za analizu derivata karbohidrazida

Standardna otopina mono(saliciliden)karbohidrazida pripravljena je otapanjem 5,48 mg spoja u 10,0 mL acetonitrila.

Standardna otopina 1,5-bis(saliciliden)karbohidrazida pripravljena je otapanjem 4,68 mg spoja u 10,0 mL acetonitrila.

Standardna otopina karbohidrazida pripravljena je otapanjem 0,50 mg spoja u 1 mL acetonitrila.

Standardna otopina salicilaldehida pripravljena je otapanjem 26,28 mg spoja u 10,0 mL acetonitrila.

Standardna smjesa pripravljena je otapanjem 0,1 mL svake standardne otopine u 0,6 mL acetonitrila tako da je konačna masena koncentracija svake pojedine komponente iznosila

približno $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, osim salicilaldehida čija je konačna koncentracija u otopini bila $0,26 \text{ mg mL}^{-1}$.

Uzorci za analizu pripremljeni su razrjeđivanjem alikvota reakcijske smjese ($20 \mu\text{L}$) s $480 \mu\text{L}$ acetonitrila. Alikvoti su uzorkovani nakon 3 min, 5 min, 10 min, 25 min i 40 min od početka reakcije.

Sve standardne otopine i uzorci su prije analize HPLC profiltrirani u vialu kroz filtre PTFE veličine pora $0,22 \mu\text{m}$.

Fosfatni pufer pH 7 pripremljen je otapanjem $6,81 \text{ g}$ kalijevog dihidrogenfosfata u 1000 mL deionizirane vode. pH otopine korigiran je pomoću pH-metra polaganim dodatkom vodene otopine natrijevog hidroksida ($c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$). Tako pripremljena otopina profiltrirana je pod sniženim tlakom kroz filter PTFE veličine pora $0,45 \mu\text{m}$.

3.3.2. Analiza derivata karbohidrazida tehnikom LC-SPE

Za odjeljivanje komponenata standardne i reakcijske smjese karbohidrazida korištena je kromatografska kolona C_{18} , Agilent Poroshell 120, dimenzija $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ i promjera čestica punila $4 \mu\text{m}$. Spojevi su eluirani izokratno smjesom acetonitrila i fosfatnog pufera (pH = 7) u volumnom omjeru ψ (acetonitril, fosfatni pufer) = 50 : 50. Valna duljina detekcije bila je 217 nm , volumen injektiranja $25 \mu\text{L}$, a temperatura kolone $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Vrijeme kromatografske analize bilo je 10 min . Nakon kromatografskog odjeljivanja odabrane komponente reakcijske smjese ekstrahirane su na SPE-sorbense s nepokretnom fazom C_{18} , i to u jednostrukom i višestrukom načinu ukoncentriravanja uz dodatni protok vode od 3 mL min^{-1} . Nakon ekstrakcije SPE-sorbensi sušeni su u struji dušika 59 min , a potom su analiti eluirani deuteriranim acetonitrilom u cjevčice NMR promjera 3 mm te su snimljeni spektri NMR.

3.3.3. Snimanje spektara NMR u otopini

Spektri NMR sa supresijom signala otapala (NOESY tip supresije) snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend s izravnim krio-probom 5 mm BBO Prodigy i z -gradijentnom zavojnicom. U svim eksperimentima spektri uzoraka snimljeni su u deuteriranom acetonitrilu pri 298 K koristeći tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard.

Spektri ^1H NMR snimljeni su sa spektralnom širinom od 6002 Hz i digitalnim razlučivanjem od $0,36 \text{ Hz}$ po točki, a broj snimaka bio je 64 i 128 .

Spektri gCOSY snimljeni su upotrebom 2048 točaka u dimenziji f_2 i 128 inkremenata u dimenziji f_1 . Za svaki inkrement broj snimaka je bio 16, a spektralna širina 6010 Hz. Digitalno razlučivanje bilo je 5,87 Hz po točki u dimenziji f_2 , odnosno 93,78 Hz po točki u dimenziji f_1 .

Spektri gHSQC i gHMBC snimljeni su sa 64, odnosno 128 snimaka. Spektralna širina bila je 6009 Hz u dimenziji f_2 te 20124 Hz u dimenziji f_1 za oba eksperimenta. Broj točaka u dimenziji f_2 bio je 1024, a broj inkremenata 256. Digitalno razlučivanje bilo je 5,86 Hz po točki u dimenziji f_2 , odnosno 314,4 Hz po točki u dimenziji f_1 .

3.4. Analiza 7-etiltriptofola tehnikom LC-SPE/krio NMR

3.4.1. Priprava uzoraka i pokretne faze za analizu 7-etiltriptofola

Standardna otopina 3-(2-hidroksietil)indola, triptofola, pripravljena je otapanjem 10,00 mg spoja u 5,0 mL acetonitrila.

Uzorci 7-etiltriptofola dobivenog iz tvrtke PLIVA pripremljeni su otapanjem odgovarajuće količine spoja u acetonitrilu tako da su konačne masene koncentracije uzorka iznosile 2,0 mg mL⁻¹, 50,0 mg mL⁻¹ i 123,0 mg mL⁻¹.

Standardna otopina i uzorci su prije analize HPLC profiltrirani u viala kroz filtre PTFE veličine pora 0,22 μm.

Fosfatni pufer pH 7 pripremljen je otapanjem 6,81 g kalijevog dihidrogenfosfata u 1000 mL deionizirane vode. pH otopine korigiran je pomoću pH-metra polaganim dodatkom vodene otopine natrijevog hidroksida ($c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$). Tako pripravljena otopina profiltrirana je pod sniženim tlakom kroz filter PTFE veličine pora 0,45 μm.

Acetatni pufer pH 4 pripremljen je razrjeđivanjem 5 mL octene kiseline u 1000 mL deionizirane vode. pH otopine korigiran je pomoću pH-metra polaganim dodatkom vodene otopine natrijevog hidroksida ($c = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$). Tako pripravljena otopina profiltrirana je pod sniženim tlakom kroz filter PTFE veličine pora 0,45 μm.

3.4.2. Analiza 7-etiltriptofola tehnikom LC-SPE

Za istraživanje optimalnog odjeljivanja komponenata uzorka 7-etiltriptofola korištene su kromatografske kolone Waters Xbridge Phenyl (150 mm x 4,6 mm; 3,5 μm), Waters Xbridge C18 (150 mm x 4,6 mm; 3,5 μm) i Waters Symmetry Shield C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μm). Spojevi su eluirani s kromatografskih kolona koristeći pokretne faze: metanol/fosfatni pufer pH 7, acetonitril/voda i acetonitril/acetatni pufer pH 4 u različitim volumnim omjerima te

kombinacijom izokratnog i gradijentnog načina eluiranja. Protok pokretne faze bio je u rasponu od 1 mL min^{-1} do $1,6 \text{ mL min}^{-1}$. Temperatura kolone bila je $25 \text{ }^\circ\text{C}$, volumen injektiranja bio je $20 \text{ }\mu\text{l}$, a valne duljine detekcije bile su 225 nm i 273 nm .

Nakon kromatografskog odjeljivanja komponente uzorka ekstrahirane su na SPE-sorbense s nepokretnom fazom C_{18} i Resin GP, i to jednostrukim i višestrukim načinom ukoncentriravanja uz dodatni protok vode od 3 mL min^{-1} . Nakon ekstrakcije SPE-sorbensi sušeni su u struji dušika 59 min , a potom su analiti eluirani deuteriranim acetonitriplom u cjevčice NMR promjera 3 mm te su snimljeni spektri NMR.

3.4.3. Snimanje spektara NMR u otopini

Spektri NMR sa supresijom signala otapala (NOESY tip supresije) snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend s izravnom krio-probom 5 mm BBO Prodigy i z -gradijentnom zavojnicom. U svim eksperimentima spektri uzoraka snimljeni su u deuteriranom acetonitrilu pri 298 K koristeći tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard.

Spektri ^1H NMR snimljeni su sa spektralnom širinom od 8000 Hz i digitalnim razlučivanjem od $0,24 \text{ Hz}$ po točki, a broj snimaka bio je 32 i 128 .

Broj snimaka za homonuklearne i heteronuklearne eksperimente 2D ovisio je o koncentraciji izoliranog spoja, odnosno o omjeru S/N u spektru ^1H NMR. Omjer S/N određen je automatski u programu *TopSpin*, a izračunat je u području od $9,0 \text{ ppm}$ do $5,5 \text{ ppm}$.

Spektri gCOSY snimljeni su upotrebom 2048 točaka u dimenziji f_2 i 256 inkremenata u dimenziji f_1 . Za pojedini inkrement broj snimaka bio je od 8 do 16 , a spektralna širina 6394 Hz . Digitalno razlučivanje bilo je $6,24 \text{ Hz}$ po točki u dimenziji f_2 , odnosno $49,95 \text{ Hz}$ po točki u dimenziji f_1 .

Spektralna širina za spektre HSQC bila je 6394 Hz u dimenziji f_2 te $18\ 116 \text{ Hz}$ u dimenziji f_1 . Broj točaka u dimenziji f_2 bio je 1024 , a broj inkremenata 256 . Za pojedini inkrement primijenjeno je od 12 do 140 snimaka, ovisno o omjeru S/N . Digitalno razlučivanje bilo je $12,49 \text{ Hz}$ po točki u dimenziji f_2 , odnosno $141,53 \text{ Hz}$ po točki u dimenziji f_1 . Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je 2 s .

Spektri HMBC snimljeni su uz spektralnu širinu od 5330 Hz u dimenziji f_2 , odnosno $22\ 345 \text{ Hz}$ u dimenziji f_1 . Korišteno je 4096 točaka u dimenziji f_2 i 256 inkremenata u dimenziji f_1 . Za pojedini inkrement primijenjeno je od 48 do 180 snimaka. Relaksacijsko vrijeme odgode

bilo je 1,5 s. Digitalno razlučivanje bilo je 2,60 Hz po točki u dimenziji f_2 te 174 Hz po točki u dimenziji f_1 .

3.4.4. Snimanje spektara MS

Spektri masa spojeva izdvojenih iz uzorka 7-etiltriptofola snimljeni su na uređaju Agilent 6490 LC-QQQ-MS s trostrukim kvadrupolnim analizatorom u tvrtki Pliva, TAPI, Zagreb, Hrvatska. Analiti su eluirani s kromatografske kolone Waters BEH C18 (dimenzija 100 mm × 2.1 mm i promjera čestica punila 1,7 μm) pokretnom fazom koja se sastojala od acetonitrila i vode uz dodatak mravlje kiseline volumnog udjela 0,1 % u obje komponente, te uz linearni gradijent i protok od 0,5 mL min⁻¹ u trajanju od 5 min. Volumen injektiranja bio je 2 μL.

Parametri analize MS bili su sljedeći: temperatura ionizacijskog izvora bio je 200 °C, protok plina dušika u izvoru bio je 12 L min⁻¹, a napon kapilare 3 kV. Desolvacijska temperatura iznosila je 350 °C, dok je desolvacijski protok dušika bio 20 L min⁻¹.

Spektri masa izoliranih spojeva snimljeni su uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem u rasponu vrijednosti m/z od 50 do 700.

3.5. Analiza makrozona tehnikom LC-SPE/krio NMR

3.5.1. Priprava uzoraka i pokretne faze za analizu makrozona

Makrozoni su sintetizirani u laboratoriju Zavoda za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka, PMF-a u Zagrebu. Reakcijske smjese triju novih klasa makrozona (9a-, 4"- i 3-) uparene su do suhog i skladištene na 4 °C do analize tehnikom LC-SPE.

Za analizu su odabrane reakcijske smjese 9a-(2-feniletil) makrozona (**9a-1**), 9a-tetrahidrofurfuril makrozona (**9a-16**), 4"-tetrahidrofurfuril makrozona (**4"-16**), 3-tetrahidrofurfuril makrozona (**3-16**), 3-trifluormetoksifenil makrozona (**3-8**) i 3-(3-fenilpropil) makrozona (**3-9**). Neposredno prije analize suhi ostaci odabranih reakcijskih smjesa su izvagani i otopljeni u acetonitrilu do konačne masene koncentracije koja je bila u rasponu od 2 mg mL⁻¹ za uzorak **9a-1** do 23,0 mg mL⁻¹ za uzorak **3-9**.

Amonijačni pufer pH 10 pripremljen je otapanjem 0,79 g amonijeva hidrogenkarbonata u 1000 mL deionizirane vode. pH otopine korigiran je pomoću pH-metra polaganim dodatkom vodene otopine amonijaka ($w(\text{NH}_3) = 25\%$). Dobivena otopina profiltrirana je pod sniženim tlakom kroz filtar PTFE veličine pora 0,45 μm.

3.5.2. Analiza reakcijskih smjesa makrozona tehnikom LC-SPE

Za istraživanje optimalnog odjeljivanja komponenata reakcijskih smjesa makrozona korištene su kromatografske kolone: Ascentis Express C18 (100 x 4,6 mm; 2,7 μm), Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm), Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 μm), Poroshell 120 EC-C18 (250 x 4,6 mm; 4 μm), Hypersil ODS (150 x 4,6 mm; 5 μm), XBridge C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 μm) te XBridge Phenyl (150 x 4,6 mm; 3,5 μm). Spojevi su eluirani s kromatografskih kolona smjesom acetonitrila (**A**) i amonijačnog pufera pH 10 (**B**) uz protok 1 mL min⁻¹. Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize makrozona prikazan je u tablici 1. Temperatura kolone bila je 25 °C, volumen injektiranja 15 μL , a valna duljina detekcije 210 nm.

Tablica 1. Sastav pokretne faze za analizu reakcijskih smjesa makrozona.

<i>t</i> / min	φ (A) / %
0,0	50
20,0	68
21,0	100
25,0	100
25,1	50
30,0	50

Istraživanje djelotvornosti ekstrakcije spojeva na SPE-sorbense provedeno je na uzorku **9a-1**. Korišteno je osam vrsta SPE-sorbensa prikazanih u tablici 2. Spojevi su ekstrahirani na pojedinu vrstu SPE-sorbensa 5 puta uzastopno uz stalan dodatni protok vodene faze od 3,0 mL min⁻¹. Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika, spojevi su eluirani deuteriranim acetonitrilom u cjevčice NMR. Snimljeni su spektri ¹H NMR iz kojih je dobiven podatak o omjeru *S/N*. Omjer *S/N* određen je automatski u programu *TopSpin 3.6.1.*, a izračunat je u području od 9,0 ppm do 5,5 ppm. Osim različitih vrsta SPE-sorbensa istražen je utjecaj dodatnog protoka vodene faze na ekstrakciju odabranih komponenata reakcijske smjese. Dodatni protok vodene faze bio je 0,5 mL min⁻¹, 1,0 mL min⁻¹ i 3,0 mL min⁻¹.

Nadalje, istražena je djelotvornost ekstrakcije odabranih novosintetiziranih makrozona iz triju različitih klasa (9a-, 4"- i 3-) na SPE-sorbense C18 uz dodatni protok vodene faze od 1,5 mL min⁻¹. Spojevi su skladišteni na SPE-sorbense višestrukim ukoncentriravanjem, a broj uzastopnih injektiranja ovisio je o koncentraciji analita u uzorku. Nakon sušenja SPE-sorbensa

u struji dušika, spojevi su eluirani deuteriranim acetonitrilom u prethodno izvagane bočice. Izolirani spojevi upareni su do suhog u struji dušika, a potom izvagani.

Tablica 2. Vrste SPE-sorbensa korištene za istraživanje djelotvornosti ekstrakcije makrozona.

SPE-sorbens	Opis	Veličina čestica punila / μm
CN	cijanopropilna faza na bazi silikagela	7
C2	etilna faza na bazi silikagela	7
C8	oktilna faza na bazi silikagela	7
C18	oktadecilna faza na bazi silikagela	7
Resin GP	modificirani divinilbenzenski polimer	5–15
Resin SH	modificirani stiren-divinilbenzenski polimer	15–25
MM* anion	anionski izmjenjivač s polidivinilbenzenskom bazom	10
MM* kation	kationski izmjenjivač s polidivinilbenzenskom bazom	10

*engl. *Mixed Mode*

3.5.3. Snimanje spektara NMR u otopini

Spektri NMR sa supresijom signala otapala (NOESY tip supresije) snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend s izravnom krio-probom 5 mm BBO Prodigy i *z*-gradijentnom zavojnicom te na spektrometru Bruker Avance NEO 600 MHz s neizravnom 5 mm BBO Prodigy krio-probom i *z*-gradijentnom zavojnicom. U svim eksperimentima spektri uzoraka snimljeni su u deuteriranom acetonitrilu pri 298 K koristeći tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard.

Spektri ^1H NMR snimljeni su sa spektralnom širinom od 11 905 Hz i digitalnim razlučivanjem od 0,98 Hz do 1,45 Hz po točki, a broj snimaka bio je od 128 do 512, ovisno o koncentraciji analita.

Spektri gCOSY snimljeni su upotrebom 2048 točaka u dimenziji *f*₂ i 256 inkremenata u dimenziji *f*₁. Za pojedini inkrement broj snimaka bio je od 6 do 16, a spektralna širina od

5342 Hz do 9615 Hz, te relaksacijsko vrijeme odgode 2 s. Digitalno razlučivanje bilo je od 5,22 Hz do 9,39 Hz po točki u dimenziji f_2 , odnosno od 37,56 Hz do 41,73 Hz po točki u dimenziji f_1 .

Spektralna širina za spektre HSQC bila je od 6394 Hz do 9615 Hz u dimenziji f_2 te od 18 112 Hz do 27 166 Hz u dimenziji f_1 . Broj točaka u dimenziji f_2 bio je 4096, a broj inkremenata 256. Za pojedini inkrement primijenjeno je od 48 do 50 snimaka. Digitalno razlučivanje bilo je od 3,12 Hz do 4,70 Hz po točki u dimenziji f_2 , odnosno od 141,50 Hz do 212,24 Hz po točki u dimenziji f_1 . Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je 1,5 s.

Spektri HMBC snimljeni su uz spektralnu širinu od 9090 Hz u dimenziji f_2 , odnosno 33 204 Hz u dimenziji f_1 . Korišteno je 4096 točaka u dimenziji f_2 i 256 inkremenata u dimenziji f_1 . Za pojedini inkrement primijenjeno je od 48 do 100 snimaka. Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je 1,5 s. Digitalno razlučivanje bilo je od 2,93 Hz do 4,44 Hz po točki u dimenziji f_2 te od 129,7 Hz do 174,6 Hz po točki u dimenziji f_1 .

Za snimanje spektara NOESY primijenjeni su sljedeći parametri: 2048 točaka u F2 dimenziji, 512 inkremenata u F1 dimenziji, spektralna širina 11 904 Hz u F2 dimenziji, odnosno 12 003 Hz u F1 dimenziji, 72 snimka po inkrementu, relaksacijsko vrijeme odgode od 2 s uz vrijeme miješanja 400 ms te digitalno razlučivanje 11,63 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 46,89 Hz u F1 dimenziji.

3.5.4. Snimanje spektara MS

Spektri masa kromatografski odijeljenih spojeva iz uzoraka **9a-1**, **9a-16** i **4''-16** snimljeni su na spektrometru Waters Acquity UPLC-MS opremljenog s detektorom PDA i jednostrukim kvadrupolnim analizatorom u tvrtki Selvita d.o.o., Zagreb, Hrvatska. Analiti su eluirani s kromatografske kolone Waters BEH C18 (dimenzija 50 mm × 2,1 mm i promjera čestica punila 1,7 μm) pokretnom fazom koja se sastojala od acetonitrila (**A**) i vode (**B**) s dodatkom amonijaka volumnog udjela 0,05 % u obje komponente te uz gradijentno eluiranje i protok od 0,9 mL min⁻¹ u trajanju od 8 min. Sastav pokretne faze prikazan je u tablici 3. Volumen injektiranja bio je 2 μL. Spektri masa odijeljenih spojeva snimljeni su uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, i to u rasponu vrijednosti m/z od 50 do 1500.

Tablica 3. Sastav pokretne faze za analizu LC-MS izoliranih spojeva iz uzoraka **9a-1**, **9a-16** i **4''-16**.

<i>t</i> / min	ϕ (A) / %
0,0	3
3,50	97
3,90	97
3,91	3
8,00	3

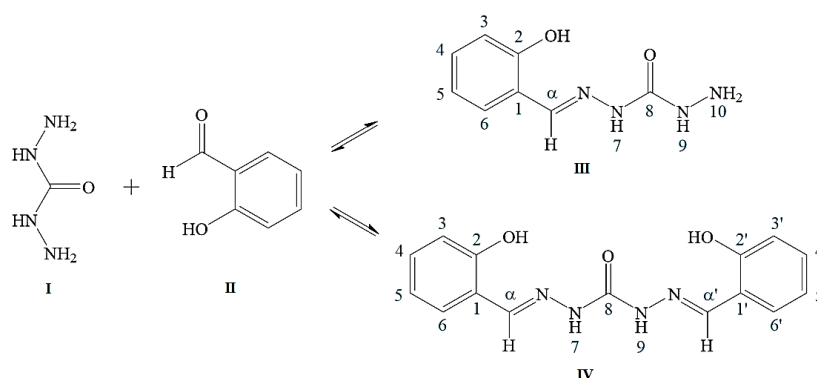
Spektri masa izoliranih spojeva iz uzorka **3-16** snimljeni su na spektrometru Agilent 6550 LC-QTOF-MS u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a. Uzorci su injektirani izravno u spektrometar koristeći Agilent 1290 Infinity II UHPLC sustav. Spektri masa izoliranih spojeva snimljeni su uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, i to u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 1000. Parametri analize MS bili su sljedeći: temperatura ionizacijskog izvora bila je 200 °C, protok plina dušika u izvoru bio je 11 L min⁻¹, a napon kapilare 3,5 kV. Desolvacijska temperatura iznosila je 350 °C, dok je desolvacijski protok dušika bio 14 L min⁻¹.

Spektri masa izoliranih spojeva iz uzoraka **3-8** i **3-9** snimljeni su na spektrometru amaZon ETD s ionskom stupicom u Institutu Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska. Suhi ekstrakti izoliranih spojeva otopljeni su u acetonitrilu (čistoće za MS) u rasponu masenih koncentracija od 0,11 mg mL⁻¹ do 0,52 mg mL⁻¹ i razrijeđeni 1000 puta smjesom otapala ψ (acetonitril : voda s 0,1 % mravlje kiseline) = 50 : 50. Tako pripremljeni uzorci injektirani su izravno u spektrometar masa pomoću injekcijske pumpe uz protok od 1 μ L min⁻¹. Spektri masa izoliranih spojeva snimljeni su uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem u rasponu vrijednosti m/z od 100 do 1500. Parametri analize MS bili su sljedeći: temperatura ionizacijskog izvora bila je 200 °C, a napon kapilare 4,5 kV. Desolvacijska temperatura bila je 200 °C, dok je desolvacijski protok dušika bio 5 L min⁻¹.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza derivata karbohidrazida tehnikom LC-SPE/krio NMR

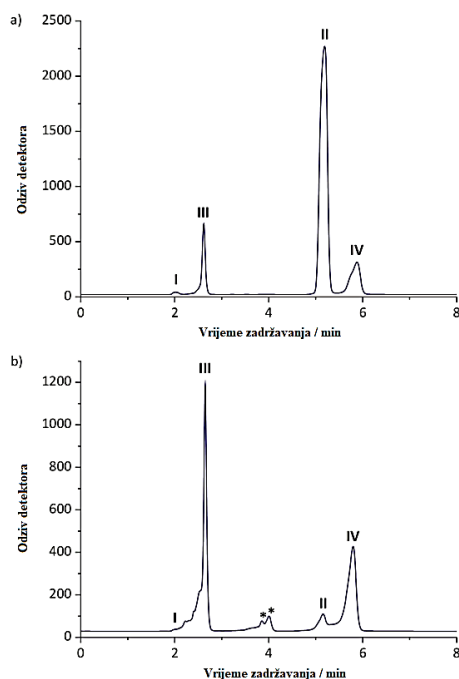
Reakcijom kondenzacije karbohidrazida (I) i salicilaldehida (II) nastaje smjesa mono- (III) i 1,5-bis(saliciliden)karbohidrazida (IV) kako je prikazano na slici 13. U prethodnim istraživanjima opisana kemijska reakcija analizirana je tehnikom Ramanove spektroskopije *in-line* u kombinaciji s multivarijantnim statističkim metodama s ciljem praćenja tijeka kemijske reakcije i procjene sastava nastale smjese produkata.¹²⁵ Autori su naglasili nekoliko nedostataka primijenjene metodologije, a to su: niska osjetljivost, složenost reakcijske smjese i preklapanje vrpci u Ramanovim spektrima, zbog čega je identifikacija komponenata te određivanje završetka reakcije bilo otežano.



Slika 13. Shematski prikaz reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida. Preuzeto i prilagođeno prema literaturnom izvoru 125

U ovom istraživanju je kemijska reakcija kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida analizirana tehnikom LC-SPE/krio NMR.²³ Zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje sastojaka standardne reakcijske smjese postignuto je na kromatografskoj koloni C₁₈ prema uvjetima opisanima u poglavlju 3.3.2. Kromatogram standardne reakcijske smjese prikazan je na slici 14a. Iz kromatograma je vidljivo da je vrijeme zadržavanja produkta III $t_R = 2,6$ min, a produkta IV $t_R = 5,9$ min. Identifikacija reaktanata i produkata u uzorcima alikvota reakcijske smjese uzorkovanih u određenim vremenskim intervalima provedena je usporedbom vremena zadržavanja komponenata u kromatogramima reakcijskih smjesa s vremenima zadržavanja komponenata u kromatogramu standardne smjese. Na slici 14b prikazan je reprezentativni

kromatogram alikvota reakcijske smjese uzorkovanog nakon 5 min od početka reakcije. Zvjezdicom su označeni kromatografski pikovi nepoznatih komponenata koje nisu identificirane u sklopu ovog istraživanja.

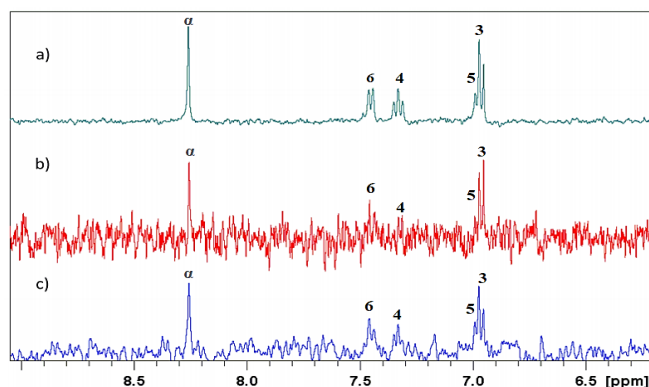


Slika 14. Kromatogram LC-UV(DAD): a) standardne reakcijske smjese i b) alikvota reakcijske smjese uzorkovanog nakon 5 min od početka reakcije. **I** - karbohidrazid; **II** - salicilaldehid; **III** - mono(saliciliden)karbohidrazid; **IV** - 1,5-bis(saliciliden)karbohidrazid. Zvjezdicom su označeni kromatografski pikovi nepoznatih komponenata reakcijske smjese.

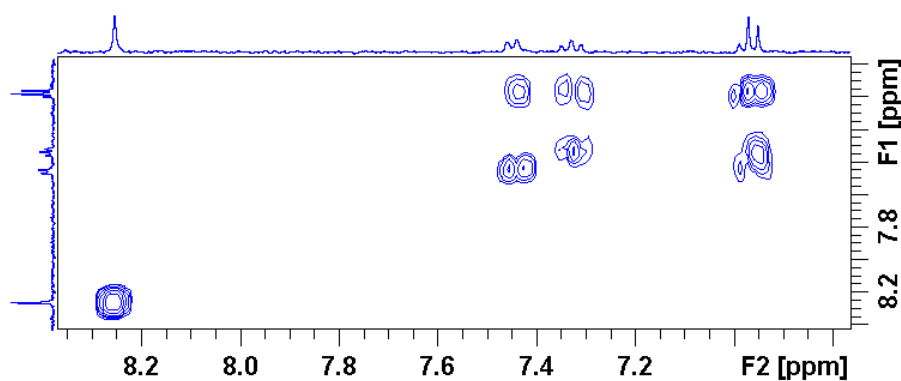
Kromatografska analiza svih alikvota reakcijske smjese pokazala je da reakcija završava između 5 min i 10 min od početka reakcije, budući da u kromatogramu alikvota reakcijske smjese uzorkovanog nakon 10 min nisu identificirani reaktanti **I** i **II**. Prema postotku površine kromatografskih pikova sastav smjese produkata na kraju reakcije bio je 48 % za produkt **III** i 52 % za produkt **IV**, što je u skladu s rezultatima prethodnog istraživanja.¹²⁵

S ciljem određivanja osjetljivosti sustava LC-SPE/krio NMR produkt **IV** izoliran je iz standardne smjese te iz alikvota reakcijske smjese uzorkovanog nakon 5 min jednostrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbens C18. Najmanja masa analita **IV** izoliranog iz standardne reakcijske smjese, za kojeg je uspješno snimljen spektar ¹H NMR, bila je 1,95 µg (slika 15a). Masa produkta **IV** izoliranog iz alikvota reakcijske smjese na SPE-sorbens bila je još manja, budući da je zadovoljavajući spektar LC-SPE/¹H snimljen za 12 min uz upotrebu dvostruko

više snimaka (slika 15b–c). Spektar COSY produkta **IV** izoliranog iz standardne reakcijske smjese (masa 24 μg) snimljen je uz zadovoljavajući omjer S/N koristeći samo 16 snimaka u trajanju od 1 h i 16 min te je prikazan na slici 16.



Slika 15. Uvećani prikaz spektra LC-SPE/ ^1H NMR za spoj **IV** izoliran iz: a) standardne reakcijske smjese (masa 1,95 μg , 64 snimka, 6 min); b) alikvota reakcijske smjese uzorkovanog nakon 5 min (64 snimka, 6 min) i c) alikvota reakcijske smjese uzorkovanog nakon 5 min (128 snimaka, 12 min)



Slika 16. Spektar LC-SPE/COSY za produkt **IV** izoliran iz standardne reakcijske smjese (masa 24 μg , 16 snimaka, 1 h i 16 min)

Rezultati su pokazali da se tehnikom LC-SPE/krio NMR može brzo i učinkovito pratiti reakcija kondenzacije karbohidrida i salicilaldehida. Ekstrakcijom odabranih komponenata reakcijske smjese na SPE-sorbense i snimanjem spektara NMR uspješno su identificirani produkti reakcije prisutni u niskim koncentracijama. Tehnika LC-SPE/krio NMR ima niske granice detekcije i veliki potencijal za identifikaciju nepoznatih komponenata zastupljenih u uzorcima u niskim koncentracijama.

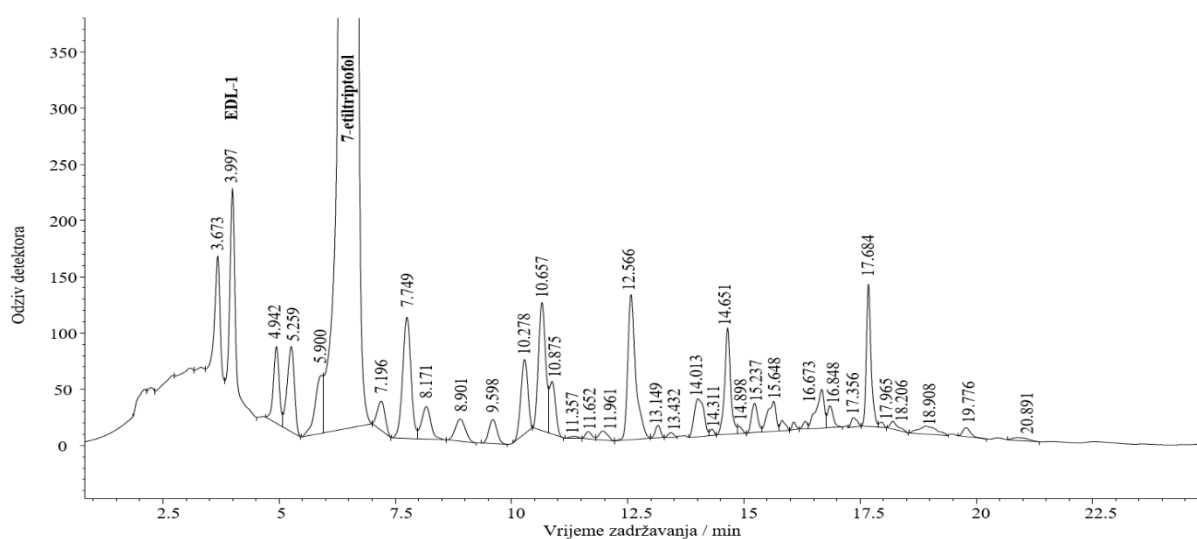
4.2. Analiza 7-etiltriptofola tehnikom LC-SPE/krio NMR

Zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje komponenata u uzorku 7-etiltriptofola postignuto je na kromatografskoj koloni Waters XBridge Phenyl, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica punila 3,5 μm , uz gradijentno eluiranje smjesom metanola (A) i fosfatnog pufera pH 7 (B) množinske koncentracije 50 mmol L⁻¹ prema gradijentnom programu prikazanom u tablici 4.

Tablica 4. Sastav pokretne faze za analizu 7-etiltriptofola.

<i>t</i> / min	φ (A) / %
0,0	10
1,9	10
2,0	55
8,0	55
18,0	80
24,0	72
24,5	95
30,0	95

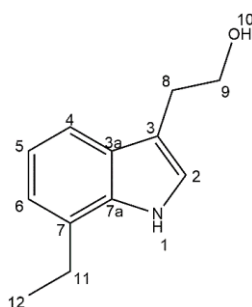
Reprezentativni kromatogram uzorka uz detekciju spojeva detektorom UV(DAD) prikazan je na slici 17. Udio glavne komponente, 7-etiltriptofola, u uzorku bio je 79 %.



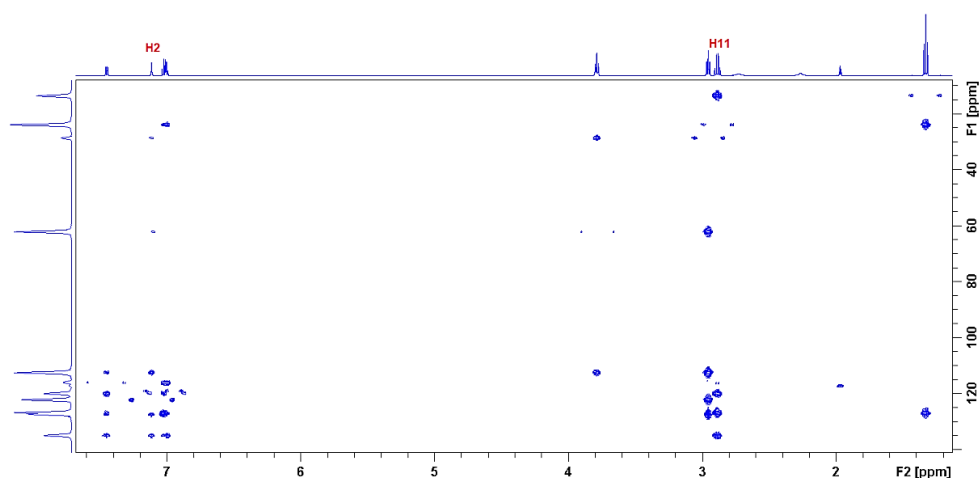
Slika 17. Kromatogram LC-UV(DAD) uzorka 7-etiltriptofola masene koncentracije 2 mg mL⁻¹

Iz uzorka masene koncentracije 2 mg mL^{-1} uspješno je ekstrahirana glavna komponenta, 7-etiltriptofol, na SPE-sorbens C18. Nakon eluiranja spoja sa SPE-sorbensa u cjevčicu NMR deuteriranim otapalom snimljeni su jedno- i dvodimenzijски spektri NMR te su analizirani.

U spektru ^1H 7-etiltriptofola (Dodatak, slika D1) karakterističan je singlet pri 9,13 ppm koji odgovara skupini $-\text{NH}$ iz pirolnog prstena vezanog na benzenski prsten u strukturi 7-etiltriptofola (slika 18). U spektru COSY (Dodatak, slika D2) skupina $-\text{NH}$ korelira s atomom H-2 čiji je signal dublet pri 7,11 ppm. U spektru HMBC 7-etiltriptofola vidljive su korelacije atoma H-2 s kvaternim ugljikovim atomima C-3 pri 112,7 ppm, C-3a pri 127,0 ppm i C-7a pri 135,2 ppm, te s atomom C-4 iz benzenskog prstena pri 116,3 ppm (slika 19). Također su vidljive korelacije atoma H-2 s ugljikovim atomima C-8 pri 28,8 ppm i C-9 pri 62,2 ppm koji pripadaju hidroksietilnoj skupini vezanoj na pirolni prsten preko atoma C-3. Nadalje, atom H-11, čiji je signal kvartet pri 2,89 ppm u spektru ^1H , u spektru HMBC pokazuje korelacije s kvaternim ugljikovim atomom C-7 pri 126,9 ppm što potvrđuje da je etilna skupina vezana na benzenski prsten upravo na tom položaju. Atom H-11 također ima korelaciju s kvaternim ugljikovim atomom C-7a, kao i s atomom C-6 iz benzenskog prstena pri 120,1 ppm. U tablici 5 prikazani su kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za 7-etiltriptofol u deuteriranom acetonitrilu.



Slika 18. Struktura 7-etiltriptofola s pobrojanim atomima ugljika



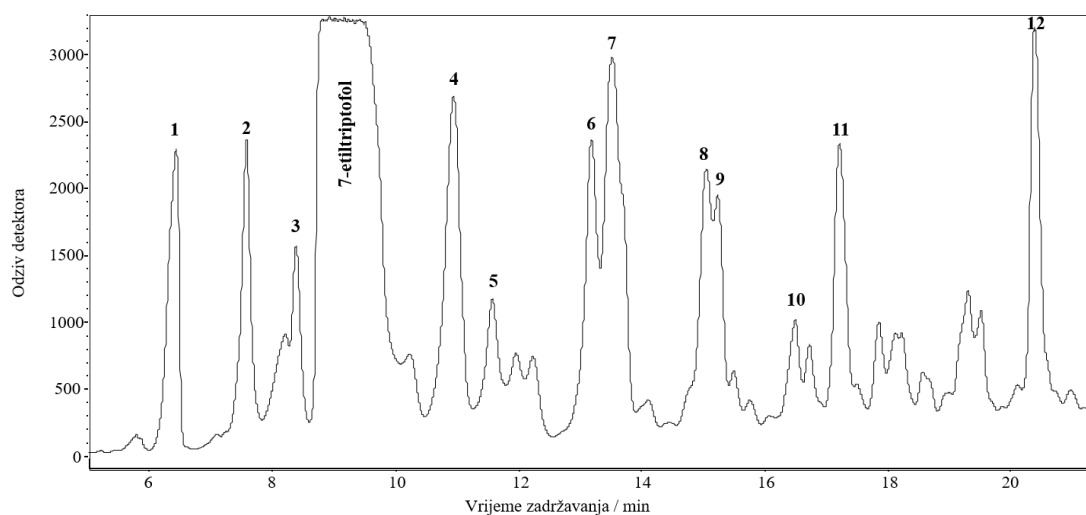
Slika 19. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC 7-etiltriptofola u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Tablica 5. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za 7-etiltriptofol u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	9,13	-	7	-	126,9
2	7,11	122,3	7a	-	135,2
3	-	112,7	8	2,95	28,8
3a	-	127,0	9	3,79	62,2
4	7,45	116,3	10	2,73	-
5	7,01	119,1	11	2,89	24,0
6	7,00	120,1	12	1,33	13,6

4.2.1. Analiza onečišćenja iz uzorka 7-etiltriptofola

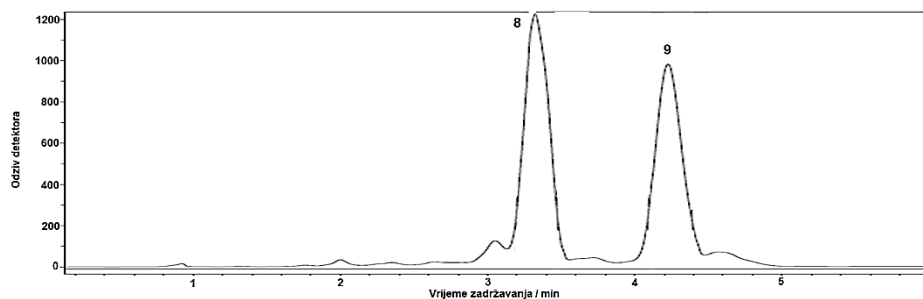
Nepoznata onečišćenja ekstrahirana su iz uzorka 7-etiltriptofola masene koncentracije 50 mg mL^{-1} te iz odabranih frakcija **C**, **I** i **J**. Frakcije su pripravljene pročišćavanjem uzorka 7-etiltriptofola semipreparativnom tekućinskom kromatografijom kako bi se određena onečišćenja dodatno ukoncentrirala prije analize tehnikom LC-SPE. Ukupno je izdvojeno 17 onečišćenja. Iz uzorka 7-etiltriptofola masene koncentracije 50 mg mL^{-1} (slika 20) uz višestruki broj uzastopnih injektiranja uzorka u kromatografsku kolonu uspješno su izdvojeni spojevi **1** – **7**, te spojevi **10** – **12**.



Slika 20. Kromatogram LC-UV(DAD) uzorka 7-etiltriptofola masene koncentracije 50 mg mL^{-1}

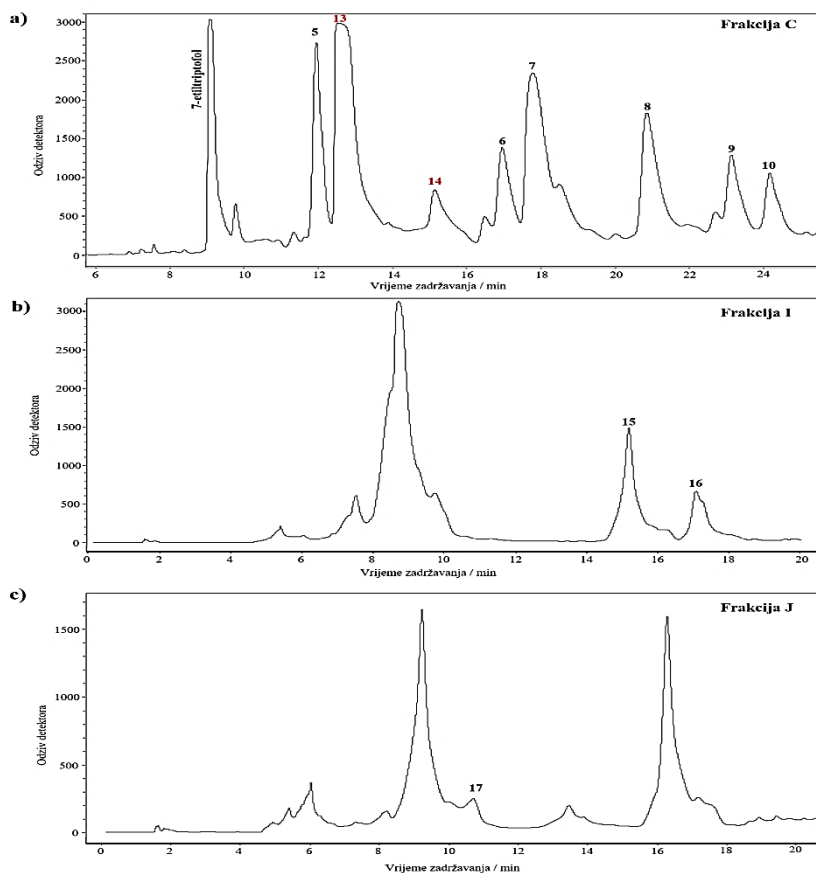
Spojevi **8** i **9** koeluirali su u jednoj frakciji na isti SPE-sorbens, te su stoga dodatno analizirani na drugoj kromatografskoj koloni uz eluiranje drugom pokretnom fazom. Spojevi su uspješno odijeljeni na kromatografskoj koloni C_{18} uz izokratno eluiranje smjesom acetonitrila i vode u

volumnom omjeru 60 : 40 i u trajanju od 10 min (slika 21), a potom izdvojeni pojedinačno na SPE-sorbense te analizirani spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa. Analiza spojeva **8** i **9** predstavlja primjer dvodimenzijske tekućinske kromatografije *off-line*.^{126,127}



Slika 21. Kromatogram LC-UV(DAD) spojeva **8** i **9** odijeljenih na koloni C₁₈ uz izokratno eluiranje acetonitrilom i vodom

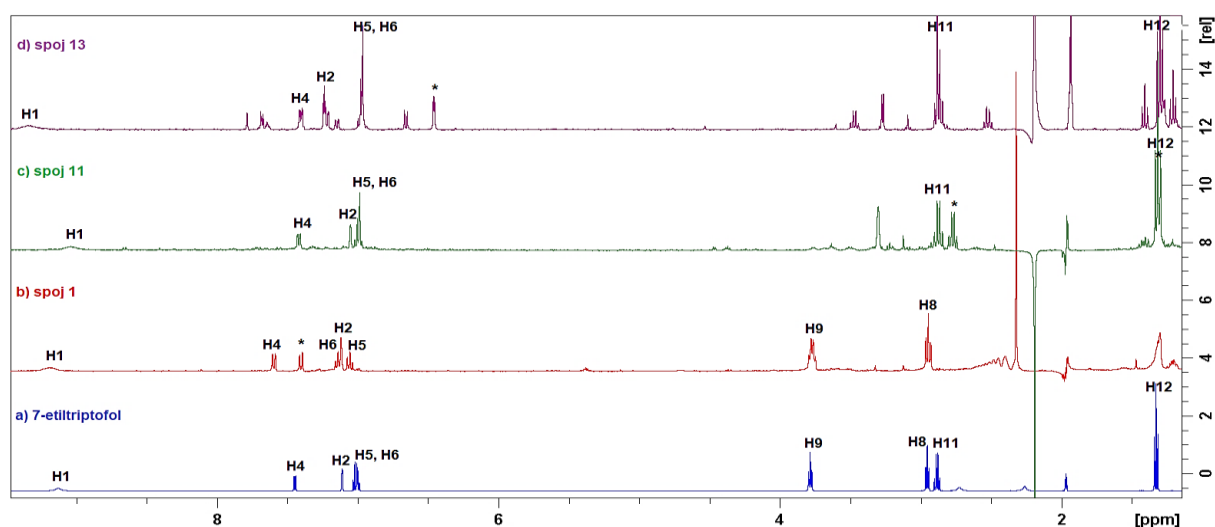
Iz frakcije C (slika 22a) izdvojena su dva nova spoja (**13** i **14**) te su ponovno identificirani spojevi **5** – **10**. Analizom frakcije I (slika 22b) izdvojena su onečišćenja **15** i **16**, dok je iz frakcije J (slika 22c) izdvojeno onečišćenje **17**.



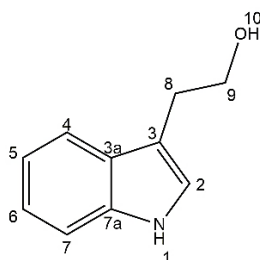
Slika 22. Kromatogram LC-UV(DAD): a) frakcije C, b) frakcije I i c) frakcije J

Analizom spektara ^1H NMR spojeva **1**, **8**, **9**, **11** i **13** uočena je sličnost sa spektrom ^1H NMR glavne komponente, te je zaključeno da se radi o derivatima indola, kao što je i 7-etiltriptofol. Na slici 23 prikazani su spektri ^1H NMR spojeva **1**, **11** i **13** u usporedbi sa spektrom ^1H NMR glavne komponente.

U spektru ^1H NMR spoja **1** (slika 23b) nedostaju signali atoma H-11 i H-12 koji pripadaju etilnoj skupini vezanoj na atom C-7 benzenskog prstena u strukturi 7-etiltriptofola (slika 18), a pri 7,40 ppm nalazi se novi dublet (označen zvjezdicom na slici 23b) koji u spektru HSQC (Dodatak, slika D4) korelira s ugljikovim atomom pri 111,8 ppm. U spektru COSY (Dodatak, slika D5) navedeni novi dublet pri 7,40 ppm korelira s atomom H-6 iz benzenskog prstena pri 7,14 ppm, dok je u spektru HMBC (Dodatak, slika D6) vidljiva korelacija s atomom C-5 pri 119,2 ppm, što znači da se radi o novoj metinskoj skupini H-7. Spektar masa spoja **1** sadrži signal molekulskog iona pri vrijednosti m/z 162 (Dodatak, slika D7). Na temelju svega navedenoga zaključeno je da je spoj **1** triptofol čija je struktura prikazana na slici 24. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **1** prikazani su u tablici 6.



Slika 23. Usporedba spektara ^1H NMR: a) 7-etiltriptofola, b) spoja **1**, c) spoja **11** i d) spoja **13** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K. Zvjezdicom su označeni novi signali u spektrima izoliranih onečišćenja, a koji nisu zabilježeni u spektru 7-etiltriptofola



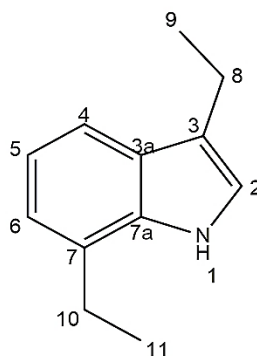
Slika 24. Predložena struktura spoja **1**

Tablica 6. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **1** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	9,18	-	6	7,14	121,9
2	7,12	123,3	7	7,40	111,8
3	-	113,4	7a	-	137,7
3a	-	128,9	8	2,95	29,1
4	7,59	119,0	9	3,77	62,7
5	7,06	119,2	10	*	-

*nije opaženo

Za razliku od spoja **1** u spektru ^1H NMR spoja **11** (slika 23c) zabilježeni su signali atoma H-11 i H-12, odnosno etilne skupine vezane na atom C-7 benzenskog prstena, ali izostaju signali hidroksietilne skupine, H-8 i H-9. U spektru ^1H NMR spoja 7-etiltriptofol signal pri 1,28 ppm, koji pripada metilnoj skupini H-12, ima integral ≈ 3 , dok je u spektru ^1H NMR spoja **11** integral tog signala ≈ 6 , što znači da spoj **11** sadrži dodatnu metilnu skupinu koja ima isti kemijski pomak kao metilna skupina H-12. Spektar COSY spoja **11** (Dodatak, slika D8) jasno pokazuje korelaciju nove metilne skupine s novim signalom pri 2,74 ppm koji je kvartet (označen zvjezdicom na slici 23c) i koji bi mogao odgovarati novoj metilenskoj skupini. U spektru HSQC (Dodatak, slika D9) nova metilenska skupina korelira s ugljikovim atomom pri 18,9 ppm. Iz svega navedenoga može se zaključiti da spoj **11** sadrži dvije etilne skupine od kojih je jedna vezana na atom C-7 benzenskog prstena, a druga na položaj C-3 pirolnog prstena. Položaj druge etilne skupine određen je iz spektra HMBC (Dodatak, slika D10) u kojem je vidljiva korelacija nove metilenske skupine (2,74 ppm) i nove metilne skupine (1,28 ppm) s kvaternim ugljikovim atomom C-3 pri 117,4 ppm. Predložena struktura spoja **11** prikazana je na slici 25, dok su kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **11** prikazani u tablici 7.

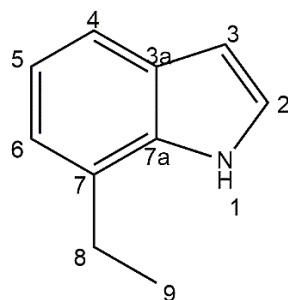
**Slika 25.** Predložena struktura spoja **11**

Tablica 7. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **11** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	9,02	-	7	-	127,0
2	7,02	121,6	7a	-	135,2
3	-	117,4	8	2,74	18,9
3a	-	130,1	9	1,28	14,7
4	7,39	118,0	10	2,84	24,9
5	6,96	119,9	11	1,28	14,7
6	6,95	121,1			

Usporedbom spektara ^1H NMR spoja **13** i 7-etiltriptofola može se uočiti da spektar spoja **13** ne sadrži signale H-8 i H-9 koji pripadaju hidroksietilnoj skupini, ali su vidljivi signali etilne skupine vezane na položaj C-7 benzenskog prstena. Nadalje, u spektru spoja **13** prisutan je dublet dubleta (označen zvjezdicom na slici 23d) pri 6,46 ppm s integralom ≈ 1 koji u spektru COSY (Dodatak, slika D11) korelira s tripletom pri 7,24 ppm. U spektru HSQC spoja **13** (Dodatak, slika D12) dublet dubleta pri 6,46 ppm korelira s ugljikovim atomom pri 102,6 ppm što bi značilo da se radi o novoj metinskoj skupini na položaju C-3 pirolnog prstena, budući da u strukturi spoja **13** nema hidroksietilne skupine na tom položaju. Triplet pri 7,24 ppm ima korelaciju s ugljikovim atomom pri 125,4 ppm što odgovara atomu C-2 u strukturi 7-etiltriptofola. Na temelju svega navedenoga predložena je struktura spoja **13** prikazana na slici 26, a kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **13** prikazani su u tablici 8.

Spektar ^1H NMR spoja **13** sadrži dodatne signale koji prema integralima i korelacijama u spektrima NMR ne pripadaju spoju **13**, već se radi o nepoznatom onečišćenju koje nije bilo moguće strukturno okarakterizirati zbog vrlo niske koncentracije u uzorku.

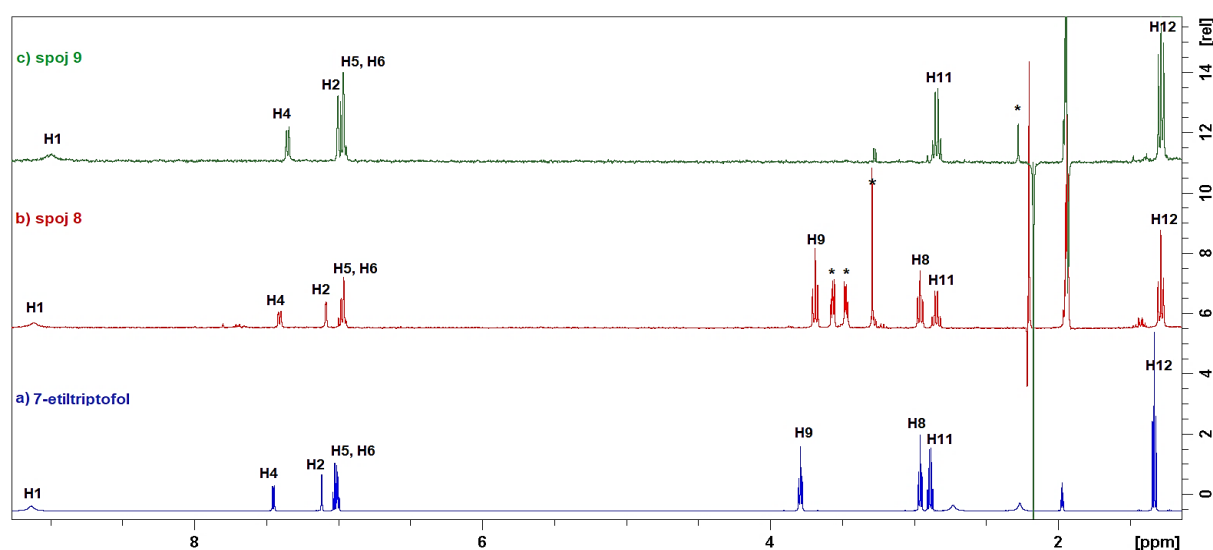
**Slika 26.** Predložena struktura spoja **13**

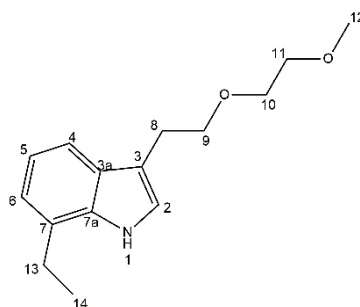
Tablica 8. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **13** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	9,35	-	6	6,98	120,4
2	7,24	125,4	7	-	128,0
3	6,46	102,6	7a	-	*
3a	-	*	8	2,87	25,1
4	7,41	118,9	9	1,30	14,5
5	6,97	120,8			

*nije opaženo

Na slici 27 uspoređeni su spektri ^1H NMR izoliranih spojeva **8** i **9** sa spektrom ^1H NMR 7-etiltriptofola. Spektar ^1H NMR spoja **8** sadrži signale etilne skupine vezane na atom C-7 benzenskog prstena te dodatna dva tripleta pri 3,56 ppm i 3,47 ppm (označena zvjezdicama na slici 27b) s integralima ≈ 2 koji su u međusobnoj korelaciji u spektru COSY (Dodatak, slika D13). Spektar HSQC pokazuje da se radi o metilenskim skupinama čiji ugljikovi atomi imaju kemijske pomake pri 70,7 ppm, odnosno 72,7 ppm (Dodatak, slika D14). Novi signal je također singlet pri 3,29 ppm s integralom ≈ 3 koji u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 58,9 ppm, te bi mogao odgovarati metoksi-skupini. Spektar masa spoja **8** (Dodatak, slika D15) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 248,2, zatim adukt s natrijem pri m/z 270,0 te ion-fragment pri m/z 172,2 koji odgovara gubitku mase od 76 Da, a to je 2-metoksietanol. Na temelju navedenih podataka predložena je struktura spoja **8** prikazana na slici 28.

Slika 27. Usporedba spektara ^1H NMR: a) 7-etiltriptofola, b) spoja **8** i c) spoja **9** u acetonitrilu-d₃ pri 298 K



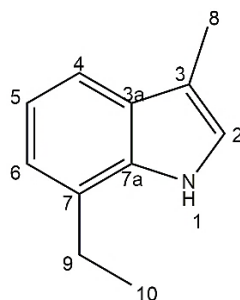
Slika 28. Predložena struktura spoja **8**

Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **8** prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **8** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1	9,12	-	7a	-	136,1
2	7,08	123,0	8	2,96	26,5
3	-	113,6	9	3,69	72,2
3a	-	128,3	10	3,56	70,7
4	7,41	117,2	11	3,47	72,7
5	6,96	120,1	12	3,29	58,9
6	6,97	121,0	13	2,85	24,9
7	-	128,0	14	1,28	14,6

U spektru ^1H NMR spoja **9** (slika 27c) vidljivi su signali etilne skupine vezane na atom C-7 benzenskog prstena, ali nedostaju signali hidroksietilne skupine H-8 i H-9. Nadalje, pri 2,28 ppm nalazi se singlet koji u spektru HSQC odgovara metilnoj skupini s ugljikovim atomom pri 8,8 ppm. Spektar masa spoja **9** sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 159,9 (Dodatak, slika D16). Predložena struktura spoja **9** prikazana je na slici 29. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **9** prikazani su u tablici 10.

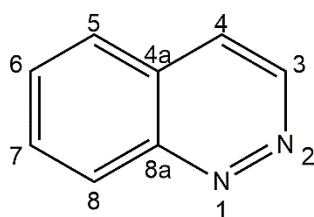
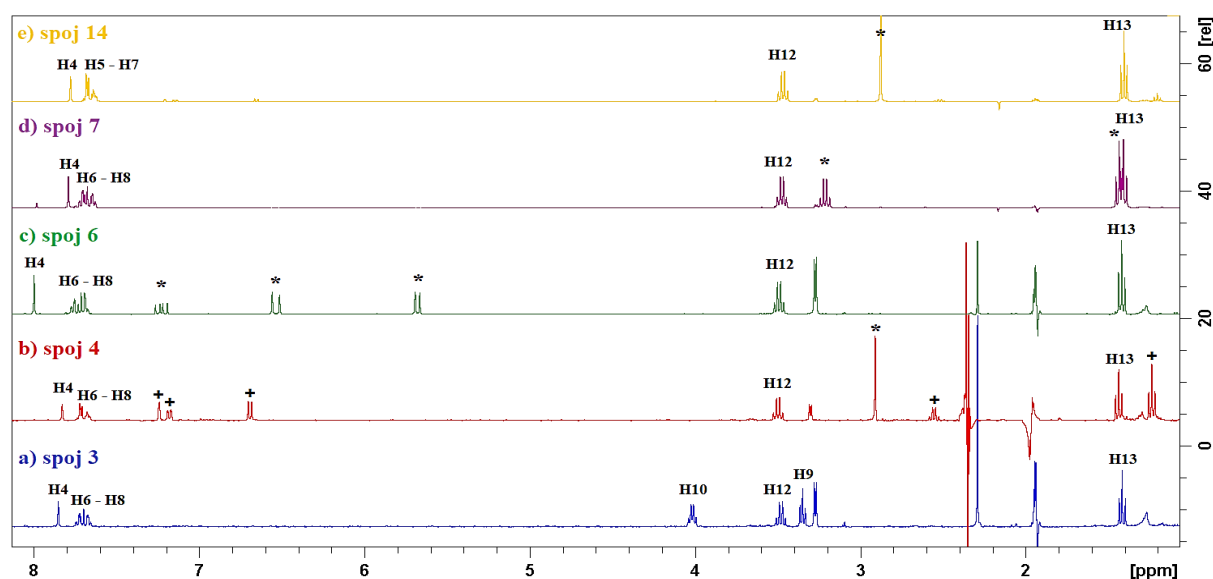


Slika 29. Predložena struktura spoja **9**

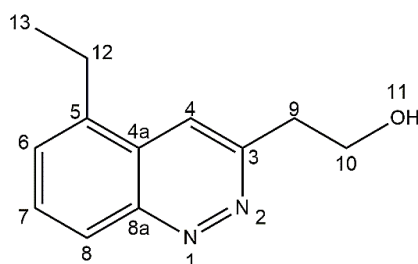
Tablica 10. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **9** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1	8,99	-	6	7,00	121,0
2	6,98	123,0	7	-	128,0
3	-	113,6	7a	-	136,1
3a	-	128,3	8	2,28	8,8
4	7,35	117,2	9	2,84	24,9
5	6,96	120,1	10	1,28	14,6

Analizom spektara NMR izdvojenih spojeva **3**, **4**, **6**, **7** i **14** uočene su sličnosti u njihovoj strukturi, te je zaključeno da se radi o derivatima cinolina čija je opća strukturna formula prikazana na slici 30. Spektri ^1H NMR navedenih spojeva prikazani su na slici 31. Budući da je prvi izolirani spoj iz ove skupine bio spoj **3** (slika 32), signali u spektrima ^1H NMR ostalih spojeva označeni su u odnosu na njega.

**Slika 30.** Opća strukturna formula cinolina**Slika 31.** Usporedba spektara ^1H NMR: a) spoja **3**, b) spoja **4**, c) spoja **6**, d) spoja **7** i e) spoja **14** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

U spektru ^1H NMR izoliranog spoja **3** vidljiva su četiri signala aromatskih protona od kojih tri pripadaju benzenskom prstenu (H-6 do H-8; 7,75 ppm do 7,65 ppm), a singlet H-4 pri 7,85 ppm pripada piridazinskom prstenu. Nadalje, u spektru COSY spoja **3** (Dodatak, slika D17) vidljiva su tri spinska sustava. Jedan spinski sustav pokazuje korelacije atoma H-6 do H-8. Drugi spinski sustav povezuje triplet s integralom ≈ 3 pri 1,42 ppm s kvartetom pri 3,48 ppm čiji je integral ≈ 2 što bi moglo odgovarati etilnoj skupini vezanoj na benzenski prsten kao u slučaju prethodno opisanih derivata indola. Treći spinski sustav pripada korelaciji tripleta pri 3,35 ppm s kvartetom pri 4,02 ppm. Integrali obaju signala su ≈ 2 pa je pretpostavljeno da se radi o hidroksietilnoj skupini vezanoj na piridazinski prsten. Hidroksilna skupina nije opažena u spektru ^1H NMR vjerojatno zbog brze izotopne izmjene vodikovih atoma s deuterijem iz otapala korištenog za snimanje spektara NMR. Spektar masa spoja **3** (Dodatak, slika D18) sadrži signal molekulskog iona pri vrijednosti m/z 203, te signal iona-fragmenta pri m/z 159 koji odgovara gubitku mase od 46 Da, a to je etanol. Predložena struktura spoja **3** prikazana je na slici 32. Kemijski pomaci ^1H NMR za spoj **3** prikazani su u tablici 11.



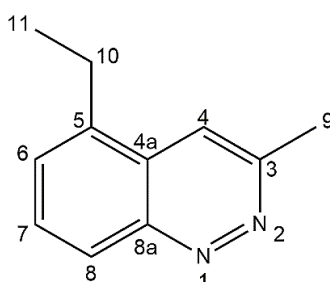
Slika 32. Predložena struktura spoja **3**

Tablica 11. Kemijski pomaci ^1H za spoj **3** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	-	8a	-
2	-	9	3,35
3	-	10	4,02
4	7,85	11	*
4a	-	12	3,48
5	-	13	1,42
6 – 8	7,75 – 7,65		

*nije opaženo

Spoj **4** je koeluirao sa spojem **5** u istoj frakciji, stoga su u spektru NMR zabilježeni signali obaju spojeva (slika 31b, signali spoja **5** označeni su križićem). Budući da su se udjeli izdvojenih spojeva **4** i **5** u frakcijama razlikovali, bilo je moguće strukturno okarakterizirati svaki pojedini spoj bez dodatnog kromatografskog odjeljivanja. Spektar ^1H NMR spoja **4** (slika 31b) sadrži signale etilne skupine (H-12 i H-13) vezane na kvaterni ugljikov atom C-5 pri 144,2 ppm čiji je kemijski pomak određen iz spektra HMBC spoja **4** (Dodatak, slika D19). Nadalje, u spektru ^1H NMR spoja **4** nedostaju signali hidroksietilne skupine H-9 i H-10. Singlet pri 2,88 ppm (označen zvjezdicom na slici 31b) odgovara novoj metilnoj skupini koja u spektru HSQC (Dodatak, slika D20) korelira s ugljikovim atomom pri 21,0 ppm. U spektru HMBC nova metilna skupina korelira s ugljikovim atomom C-4 pri 121,6 ppm i kvaternim ugljikovim atomom C-3 pri 154,7 ppm, što znači da je metilna skupina vezana na piridazinski prsten upravo preko atoma C-3. U spektru masa spoja **4** vidljiv je signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 173,1 (Dodatak, slika D21) što odgovara masi spoja **4** koja je 172,1 Da. Struktura spoja **4** prikazana je na slici 33, dok su kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **4** prikazani u tablici 12.

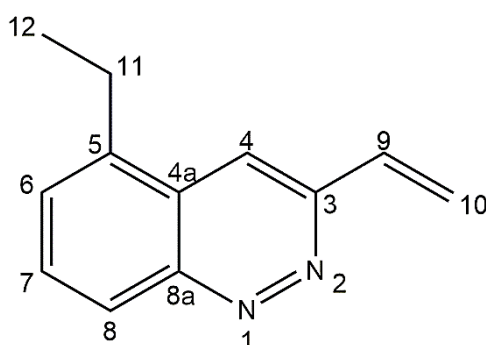


Slika 33. Predložena struktura spoja **4**

Tablica 12. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **4** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	-	7	7,71	131,3
2	-	-	8	7,72	124,5
3	-	154,7	8a	-	148,5
4	7,78	121,6	9	2,88	21,0
4a	-	127,3	10	3,47	23,9
5	-	144,2	11	1,41	14,6
6	7,67	128,1			

U spektru ^1H NMR spoja **6** (slika 31c) također su zabilježeni signali etilne skupine koja je vezana na atom C-5 benzenskog prstena. Novi signali (označeni zvjezdicom na slici 31c) su dva dubleta pri 5,68 ppm i 6,55 ppm, te dublet dubleta pri 7,23 ppm, svi s integralima ≈ 1 . Spektar COSY (Dodatak, slika D22) pokazuje korelaciju signala pri 7,23 ppm sa signalima pri 5,68 ppm i 6,55 ppm. Na temelju ovih podataka pretpostavljeno je da se radi o etenskoj skupini, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, vezanoj na piridazinski prsten. U tom slučaju dva dubleta pri 5,68 ppm i 6,55 ppm bi mogla odgovarati protonima metilenske skupine, $=\text{CH}_2$, koji su magnetski neekvivalentni zbog zakočene rotacije oko dvostruke veze, dok bi dublet dubleta pripadao metinskoj skupini, $-\text{CH}=\text{}$. U spektru HSQC magnetski neekvivalentni protoni metilenske skupine koreliraju s istim ugljikovim atomom pri 119,6 ppm što potvrđuje navedenu pretpostavku. Pretpostavljena struktura spoja **6** molekulske mase 184 Da prikazana je na slici 34. Spektar masa spoja **6** (Dodatak, slika D23) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 185, čime je potvrđena struktura spoja **6**. Kemijski pomaci ^1H NMR za spoj **6** prikazani su u tablici 13.

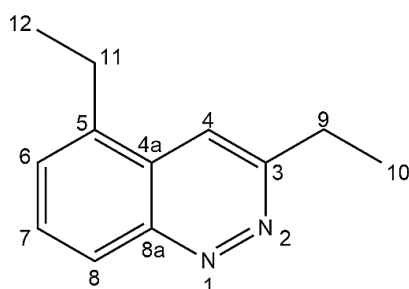


Slika 34. Predložena struktura spoja **6**

Tablica 13. Kemijski pomaci ^1H za spoj **6** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	-	6 - 8	7,79 – 7,66
2	-	8a	-
3	-	9	7,23
4	7,99	10	6,55; 5,68
4a	-	11	3,50
5	-	12	1,42

U spektru ^1H NMR spoja **7** (slika 31d), osim signala etilne skupine vezane na benzenski prsten preko atoma C-5, nalazi se dodatni kvartet pri 3,22 ppm s integralom ≈ 2 , te triplet pri 1,44 ppm s integralom ≈ 3 (označeni zvjezdicom na slici 31d). Navedeni signali u međusobnoj su korelaciji u spektru COSY (Dodatak, slika D24). Kvartet pri 3,22 ppm dodatno korelira s metinskim protonom H-4 (7,79 ppm) iz piridazinskog prstena, dok kvartet pri 3,48 ppm korelira s metinskim protonom H-6 iz benzenskog prstena pri 7,65 ppm. Spektar HSQC (Dodatak, slika D25) pokazuje da kvartet odgovara novoj metilenskoj skupini koja korelira s ugljikovim atomom pri 29,8 ppm, dok triplet odgovara novoj metilnoj skupini s ugljikovim atomom pri 14,5 ppm. U spektru HMBC (Dodatak, slika D26) oba signala koreliraju s kvaternim ugljikovim atomom C-3 pri 158,9 ppm iz čega se može zaključiti da je nova etilna skupina vezana na piridazinski prsten upravo na položaju C-3. Nadalje, nova metilenska skupina korelira u spektru HMBC s atomom C-4 pri 121,3 ppm što dodatno potvrđuje položaj nove etilne skupine. U spektru masa spoja **7** (Dodatak, slika D27) vidljiv je signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 187, što odgovara molekulkovoj masi spoja koja je 186 Da. Struktura spoja **7** prikazana je na slici 35, a kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **7** navedeni su u tablici 14.

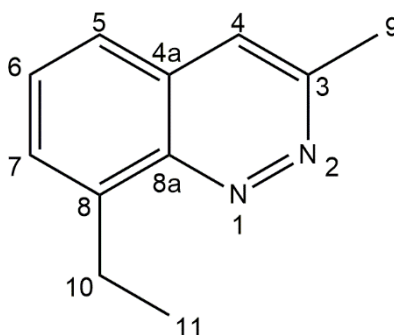


Slika 35. Predložena struktura spoja **7**

Tablica 14. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **7** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	-	7	7,68	132,2
2	-	-	8	7,71	125,6
3	-	158,9	8a	-	147,7
4	7,79	121,3	9	3,22	29,8
4a	-	124,6	10	1,44	14,5
5	-	143,5	11	3,48	25,0
6	7,65	129,1	12	1,41	15,7

Spektar ^1H NMR spoja **14** (slika 31e) sadrži iste signale kao spektar spoja **4** (slika 31b), ali su kemijski pomaci svih protona u spektru spoja **14** zasjenjeniji u odnosu na kemijske pomake spoja **4**. Budući da spektar masa spoja **14** (Dodatak, slika D28) sadrži isti signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 173, kao u slučaju spoja **4**, pretpostavljeno je da se radi o konstitucijskim izomerima. Predložena struktura spoja **14** prikazana je na slici 36, dok su kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR navedeni u tablici 15.

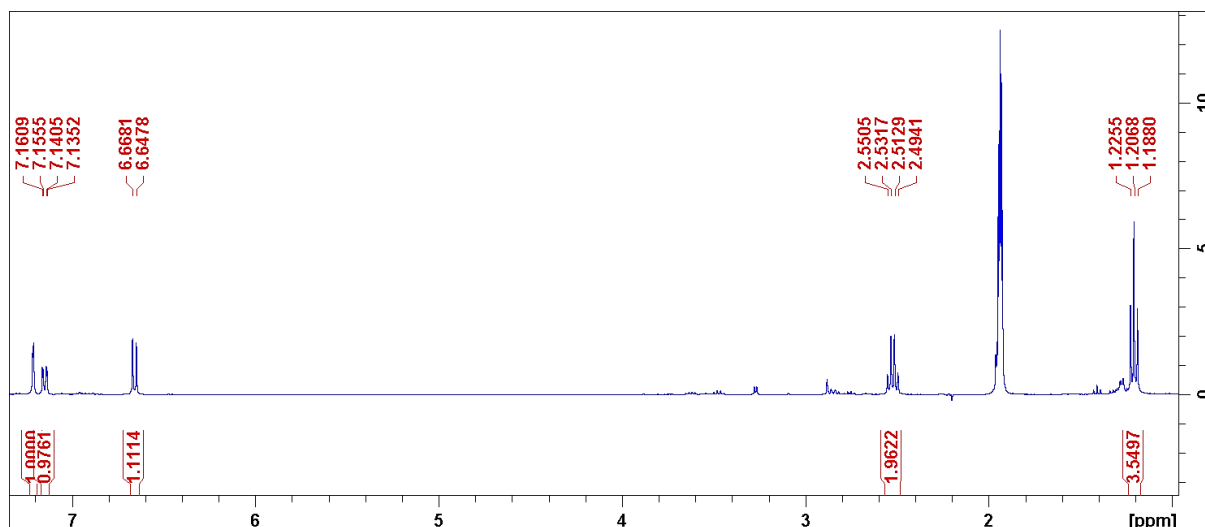


Slika 36. Predložena struktura spoja **14**

Tablica 15. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **14** u deuteriranom acetonitrilu.

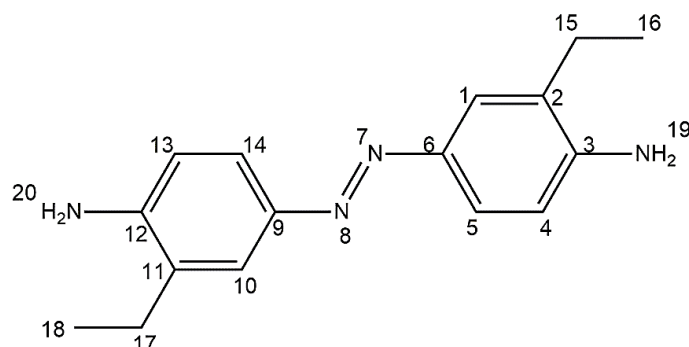
Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1	-	-	7	7,69	128,1
2	-	-	8	-	143,4
3	-	153,8	8a	-	147,6
4	7,78	121,4	9	2,88	21,1
4a	-	128,0	10	1,41	14,6
5	7,64	126,6	11	3,47	23,9
6	7,67	131,2			

U spektru ^1H NMR spoja **5** (slika 37) vidljivi su signali triju protona benzenskog prstena, a to su: dublet pri 7,21 ppm s vrlo malom konstantom sprege od 2 Hz, zatim dublet dubleta pri 7,15 ppm i dublet pri 6,66 ppm, oba s konstantom sprege 8 Hz, koji su u međusobnoj korelaciji u spektru COSY (Dodatak, slika D29). Nadalje, dublet pri 7,21 ppm korelira s kvartetom pri 2,52 ppm koji odgovara metilenskoj skupini i koji je u korelaciji s tripletom pri 1,21 ppm. Navedeni podaci ukazuju na to da se radi o 1,2,4-trisupstituiranom benzenskom prstenu te da je jedan od supstituenata etilna skupina.



Slika 37. Spektar ^1H NMR spoja **5** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

U spektru HMBC spoja **5** (Dodatak, slika D30) metilenska skupina pri 2,52 ppm, dublet pri 7,21 ppm i dublet dubleta pri 7,15 ppm koreliraju s istim kvaternim ugljikovim atomom pri 144,1 ppm. S obzirom na navedenu vrijednost kemijskog pomaka kvaternog ugljikovog atoma pretpostavljeno je da je drugi supstituent amino-skupina koja nije opažena u spektru ^1H NMR zbog brze izotopne izmjene vodik/deuterij s molekulama otapala korištenog za snimanje spektara NMR. Spektar masa spoja **5** (Dodatak, slika D31) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 269 što bi odgovaralo strukturi spoja kakva je prikazana na slici 38. Na temelju svega navedenoga zaključeno je da je spoj **5** derivat azobenzena. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **5** prikazani su u tablici 16.



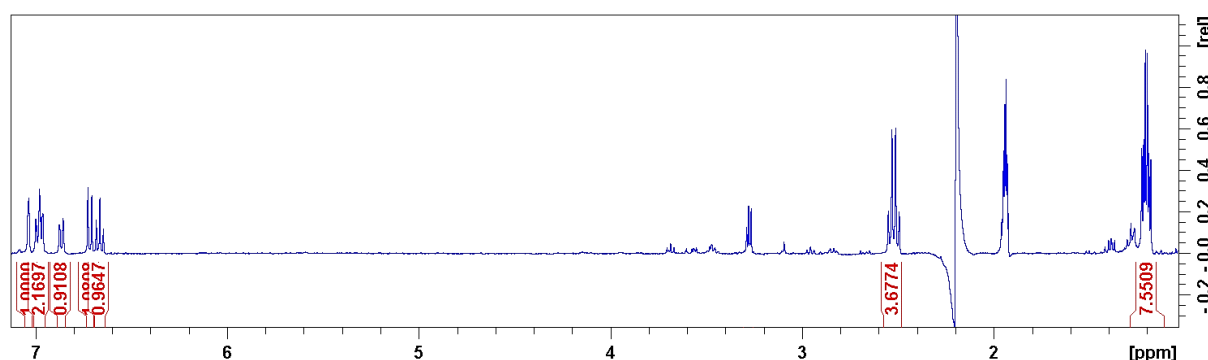
Slika 38. Predložena struktura spoja **5**

Tablica 16. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **5** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1, 10	7,21	126,3	6, 9	-	131,3
2, 11	-	128,3	7, 8	-	-
3, 12	-	144,1	15, 17	2,52	24,0
4, 13	6,66	115,3	16, 18	1,21	12,8
5, 14	7,15	124,4	19, 20	*	-

*nije opaženo

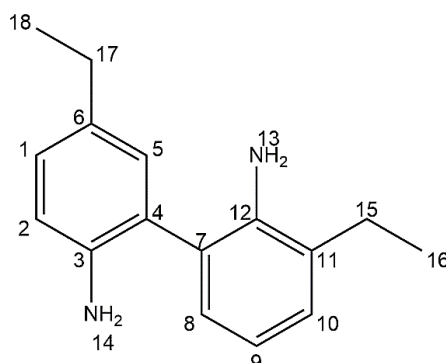
Spektar ^1H NMR spoja **10** (slika 39) sadrži šest aromatskih protona u području od 7,03 ppm do 6,66 ppm, dvije metilenske skupine čiji je signal kvartet pri 2,52 ppm i dvije metilne skupine čiji je signal triplet pri 1,20 ppm.

Slika 39. Spektar ^1H NMR spoja **10** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Na temelju korelacija aromatskih protona u spektru COSY (Dodatak, slika D32) može se zaključiti da spoj **10** u svojoj strukturi sadrži dva različito supstituirana benzenska prstena, od kojih jedan ima supstituente na položaju 1,2,4-, a drugi na položaju 1,2,3-. Također se može vidjeti da je jedan od supstituenata etilna skupina. Nadalje, u spektru HMBC spoja **10** (Dodatak, slika D33) metilenska skupina korelira s ugljikovim atomom metilne skupine pri 13,6 ppm, zatim s kvaternim ugljikovim atomima pri 128,0 ppm i 143,3 ppm. S obzirom na navedenu vrijednost kemijskog pomaka od 143,3 ppm pretpostavljeno je, kao i u slučaju spoja **5**, da je drugi supstituent amino-skupina koja nije opažena u spektru ^1H NMR.

Spektar masa spoja **10** (Dodatak, slika D34) sadrži signal protoniranog molekularnog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 241 što bi odgovaralo strukturi spoja kakva je prikazana na slici

40. Na temelju svega navedenoga zaključeno je da je spoj **10** derivat bifenila. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **10** prikazani su u tablici 17.



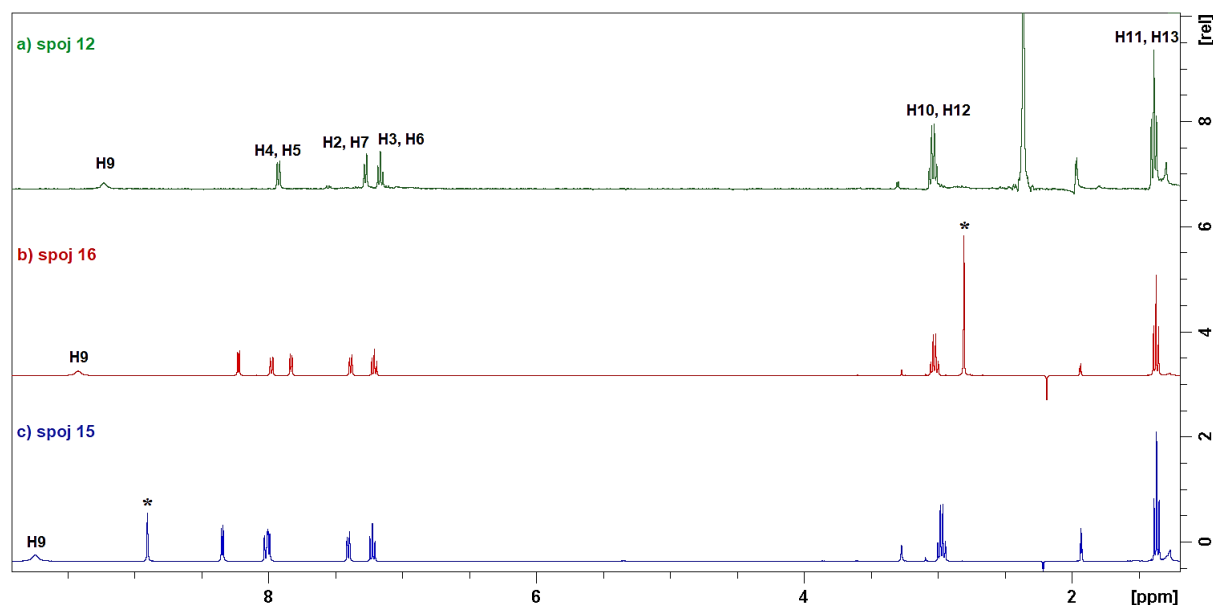
Slika 40. Predložena struktura spoja **10**

Tablica 17. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **10** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	6,99	128,0	9	6,66	118,5
2	6,72	116,1	10	6,87	128,9
3	-	144,5	11	-	128,0
4	-	117,4	12	-	143,3
5	7,03	129,9	13, 14	*	-
6	-	128,0	15, 17	2,52	25,0
7	-	117,4	16, 18	1,20	13,6
8	6,97	128,0			

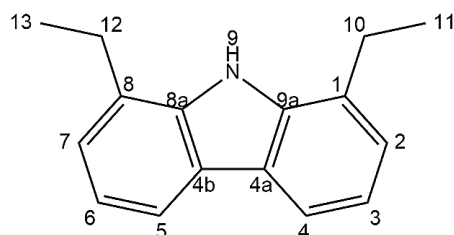
*nije opaženo

Spojevi **12**, **15** i **16** imaju slične spektre ^1H koji su prikazani na slici 41. U spektru ^1H NMR spoja **12** (slika 41a) nalazi se široki singlet pri 9,24 ppm koji bi mogao odgovarati skupini $-\text{NH}$. Također je primjećeno da je, u ovom slučaju, kemijski pomak skupine $-\text{NH}$ odsjenjeniji u usporedbi s kemijskim pomakom iste skupine kod izdvojenih derivata indola (slike 23 i 27). Nadalje, spektar ^1H NMR spoja **12** pokazuje signale triju aromatskih protona od kojih su dva dubleti pri 7,93 ppm, odnosno 7,28 ppm, a treći je triplet pri 7,17 ppm. Na temelju korelacija navedenih signala u spektru COSY (Dodatak, slika D35) može se zaključiti da spoj **12** u svojoj strukturi sadrži 1,2,3-trisupstituirani benzenski prsten.



Slika 41. Usporedba spektara ^1H NMR: a) spoja **12**, b) spoja **16** i c) spoja **15** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Budući da su u spektru ^1H NMR spoja **12** prisutni kvartet pri 3,04 ppm i triplet pri 1,39 ppm, koji su također u međusobnoj korelaciji u spektru COSY, jedan od supstituenata na benzenskom prstenu je zasigurno etilna skupina. Spektar HSQC (Dodatak, slika D36) potvrđuje da kvartet pri 3,04 ppm odgovara metilenskoj skupini s ugljikovim atomom pri 24,1 ppm, dok je triplet pri 1,39 ppm metilna skupina s odgovarajućim ugljikovim atomom pri 13,7 ppm. U spektru HMBC (Dodatak, slika D37) metilenska skupina korelira s ugljikovim atomom metilne skupine pri 13,7 ppm, zatim s ugljikovim atomom jedne metinske skupine pri 124,4 ppm te s dva kvaterna ugljikova atoma pri 127,0 ppm i 138,4 ppm. Na temelju kemijskog pomaka drugog kvaternog ugljikovog atoma (138,4 ppm) može se zaključiti da se u njegovoj neposrednoj blizini nalazi skupina $-\text{NH}$. Spektar masa spoja **12** (Dodatak, slika D38) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 224. Stoga je predložena struktura spoja **12** kako je prikazano na slici 42, a radi se o derivatu karbazola. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **12** navedeni su u tablici 18.



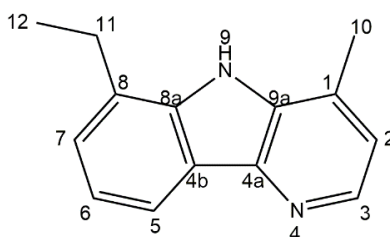
Slika 42. Predložena struktura spoja **12**

Tablica 18. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **12** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1, 8	-	127,0	8a, 9a	-	138,4
2, 7	7,28	124,4	9	9,24	-
3, 6	7,17	119,3	10, 12	3,04	24,1
4, 5	7,93	117,5	11, 13	1,39	13,7
4a, 4b	-	123,1			

U spektru ^1H NMR spoja **16** (slika 41b) također je vidljiv signal skupine $-\text{NH}$ pri 9,42 ppm. Spoj **16** ima 5 neekvivalentnih aromatskih protona. U spektru COSY (Dodatak, slika D39) mogu se vidjeti dva spinska sustava u aromatskom području. Jedan spinski sustav čine dva dubleta pri 7,39 ppm, odnosno 7,98 ppm i triplet pri 7,21 ppm, što je vrlo slično kao u slučaju prethodno opisanog spoja **12**. Drugi spinski sustav čine dva dubleta pri 7,83 ppm i 8,23 ppm. Budući da je dublet pri 8,23 ppm značajno odsjenjen u usporedbi s ostalim protonima, pretpostavljeno je da se u njegovoj neposrednoj blizini nalazi atom dušika koji je najvjerojatnije ugrađen u aromatski prsten. Nadalje, u spektru ^1H NMR spoja **16** također su prisutni signali etilne skupine, ali i novi singlet pri 2,81 ppm (označen zvjezdicom na slici 41b) koji u spektru HSQC (Dodatak, slika D40) korelira s ugljikovim atomom pri 21,4 ppm te je vidljivo da se radi o metilnoj skupini. Nova metilna skupina u spektru HMBC (Dodatak, slika D41) korelira s ugljikovim atomom pri 113,4 ppm koji odgovara metinskoj skupini drugog spinskog sustava pri 7,83 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom pri 135,2 ppm. Etilna skupina korelira s kvaternim ugljikovim atomima prvog spinskog sustava (128,6 ppm i 139,8 ppm).

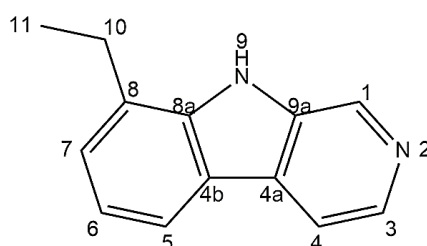
Spektar masa spoja **16** (Dodatak, slika D42) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 211, što odgovara predloženoj strukturi spoja **16** koja je prikazana na slici 43. Na temelju svih navedenih podataka vidljivo je da je spoj **16** derivat piridoindola. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **16** navedeni su u tablici 19.

**Slika 43.** Predložena struktura spoja **16**

Tablica 19. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **16** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	135,2	7	7,39	127,6
2	7,83	113,4	8	-	128,6
3	8,23	138,8	8a	-	139,8
4	-	-	9	9,42	-
4a	-	127,1	9a	-	143,2
4b	-	122,0	10	2,81	21,4
5	7,98	120,0	11	3,03	25,0
6	7,21	121,2	12	1,37	14,5

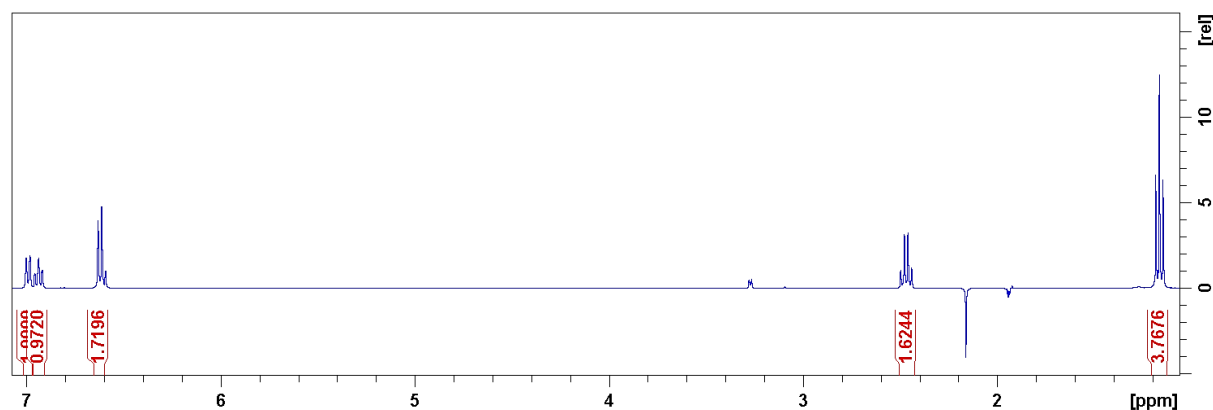
Za razliku od spoja **16** u spektru ^1H NMR spoja **15** (slika 41c) nije zabilježen signal metilne skupine H-10 pri 2,81 ppm, ali su vidljivi signali etilne skupine. U aromatskom području nalazi se jedan dodatni singlet pri 8,91 ppm koji u spektru HSQC (Dodatak, slika D43) korelira s ugljikovim atomom pri 135,0 ppm. Na temelju navedenih kemijskih pomaka može se pretpostaviti da se u neposrednoj blizini tog protona nalazi dušikov atom. Spektar COSY (Dodatak, slika D44) potvrđuje prisutnost dvaju spinskih sustava koji odgovaraju benzenskom i piridinskom prstenu kao u slučaju spoja **16**. U spektru HMBC (Dodatak, slika D45) vidljive su korelacije dodatnog singleta pri 8,91 ppm s ugljikovim atomom metinske skupine pri 139,5 ppm te s kvaternim ugljikovim atomima C-9a pri 129,8 ppm, odnosno C-4a pri 137,5 ppm. Na temelju navedenih podataka predložena je struktura spoja **15** kako je prikazano na slici 44. Spoj **15** također je derivat piridoindola, a molekulska masa mu je 196 Da. Spektar masa spoja **15** (Dodatak, slika D46) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 197, što odgovara predloženoj strukturi spoja **15**. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **15** navedeni su u tablici 20.

**Slika 44.** Predložena struktura spoja **15**

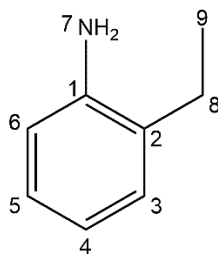
Tablica 20. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **15** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	8,91	135,0	7	7,40	127,8
2	-	-	8	-	128,8
3	8,35	139,5	8a	-	140,5
4	8,00	115,6	9	9,75	-
4a	-	137,5	9a	-	129,8
4b	-	122,0	10	2,98	25,0
5	8,02	120,2	11	1,37	14,3
6	7,23	121,1			

Spektar ^1H NMR spoja **2** (slika 45) sadrži signale četiriju aromatskih protona, a to su: dva dubleta pri 6,99 ppm i 6,62 ppm, dublet tripleta pri 6,94 ppm te dublet dubleta pri 6,61 ppm. Na temelju navedenih podataka i korelacija aromatskih protona u spektru COSY (Dodatak, slika D47) može se zaključiti da se radi o 1,2-disupstituiranom benzenskom prstenu. U spektru ^1H NMR spoja **2** također su vidljivi kvartet pri 2,47 ppm i triplet pri 1,16 ppm koji su u međusobnoj korelaciji u spektru COSY. Spektar HSQC (Dodatak, slika D48) pokazuje da se radi o metilenskoj skupini s ugljikovim atomom pri 25,1 ppm, odnosno o metilnoj skupini s ugljikovim atomom pri 14,0 ppm. Stoga je zaključeno da se radi o etilnoj skupini. U spektru HMBC (Dodatak, slika D49) metilenska skupina pri 2,47 ppm korelira s dva kvaterna ugljikova atoma čiji su kemijski pomaci pri 128,7 ppm i 146,3 ppm. Stoga je pretpostavljeno da se u neposrednoj blizini nalazi amino-skupina čiji signal nije opažen u spektrima NMR zbog brze izotopne izmjene vodikovih atoma amino skupine s deuterijem iz otapala korištenog za snimanje spektara NMR.

**Slika 45.** Spektar ^1H NMR spoja **2** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Spektar masa spoja **2** (Dodatak, slika D50) sadrži signal molekuskog iona pri vrijednosti m/z 121,9. Na temelju navedenih podataka predložena je struktura spoja **2**, a to je 2-etilanilin, prikazan na slici 46. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **2** prikazani su u tablici 21.



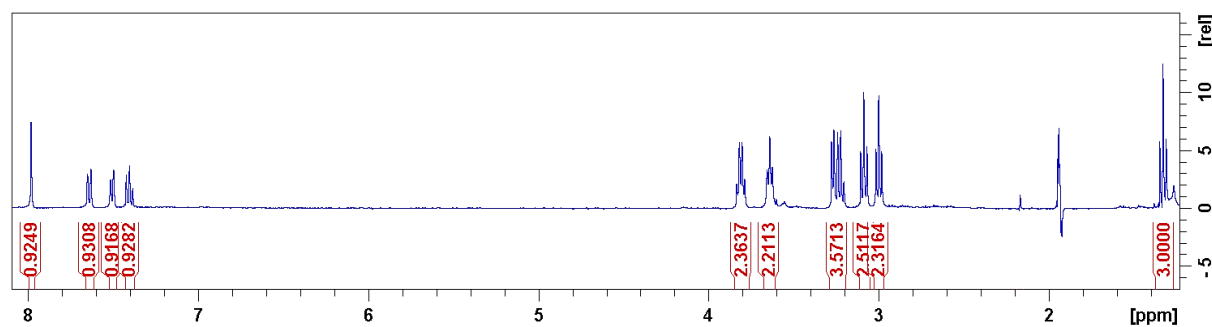
Slika 46. Predložena struktura spoja **2**

Tablica 21. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **2** u deuteriranom acetonitrilu.

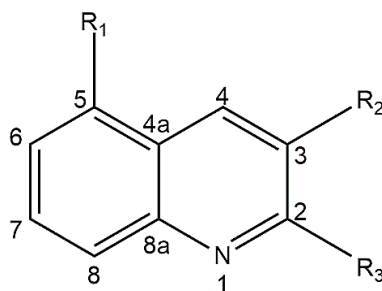
Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	146,3	6	6,62	116,2
2	-	128,7	7	*	-
3	6,99	129,6	8	2,47	25,1
4	6,61	119,0	9	1,16	14,0
5	6,94	128,0			

*nije opaženo

Spektar ^1H NMR spoja **17** (slika 47) sadrži signale četiriju aromatskih protona, a to su: singlet pri 7,98 ppm, dva dubleta pri 7,64 ppm, odnosno 7,50 ppm i triplet pri 7,40 ppm. Na temelju korelacija aromatskih protona u spektru COSY (Dodatak, slika D51) može se zaključiti da se radi o 1,2,3-trisupstituiranom benzenskom prstenu. Singlet pri 7,98 ppm u spektru HSQC (Dodatak, slika D52) korelira s ugljikovim atomom pri 137,2 ppm, pa stoga navedeni proton pripada drugom aromatskom sustavu koji najvjerojatnije sadrži atom dušika. Spoj **17** derivat je kinolina čija je opća strukturna formula prikazana na slici 48.



Slika 47. Spektar ^1H NMR spoja **17** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



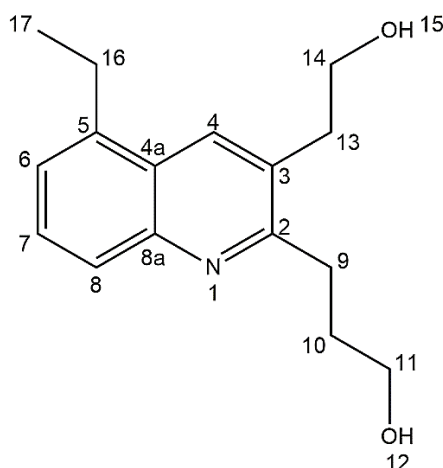
Slika 48. Opća strukturna formula derivata kinolina

Nadalje, u spektru COSY vidljiva su tri spinska sustava u alifatskom području. Jedan spinski sustav čine triplet pri 1,33 ppm i kvartet pri 3,24 ppm. U spektru HSQC može se vidjeti da je navedeni triplet metilna skupina s ugljikovim atomom pri 15,6 ppm, dok je kvartet metilenska skupina s ugljikovim atomom pri 25,3 ppm. Navedeni podaci odgovaraju etilnoj skupini, R₁, vezanoj na benzenski prsten. U spektru HMBC (Dodatak, slika D53) metilenska skupina korelira s tri kvaterna ugljikova atoma pri 142,0 ppm (C-5), zatim pri 127,3 ppm (C-4a) i 144,6 ppm (C-8a). Na temelju navedenih kemijskih pomaka kvaternih ugljikovih atoma može se zaključiti da je drugi aromatski sustav u strukturi spoja **17** piridinski prsten koji je vezan izravno na benzenski prsten preko atoma C-4a i C-8a.

Drugi spinski sustav u području alifatskih protona pripada dvjema metilenskim skupinama od kojih je jedna triplet pri 3,00 ppm, a druga kvartet pri 3,81 ppm koji u spektru HSQC ima korelaciju s ugljikovim atomom pri 62,7 ppm. Stoga je pretpostavljeno da se radi o hidroksietilnoj skupini, R₂, vezanoj na piridinski prsten preko kvaternog ugljikovog atoma C-3 pri 131,3 ppm. Hidroksilna skupina nije opažena u spektrima NMR zbog brze izotopne izmjene vodika s deuterijem iz otapala korištenog za snimanje spektara NMR. Budući da triplet pri 3,00 ppm u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomom pri 137,2 ppm (C-4), a koji odgovara protonu H-4 pri 7,98 ppm, može se zaključiti da su atom H-4 i supstituent R₂ u neposrednoj blizini na piridinskom prstenu.

Treći spinski sustav, R₃, sadrži tri metilenske skupine pri 3,09 ppm, 2,08 ppm i 3,64 ppm. Signal metilenske skupine pri 2,08 ppm suprimiran je u spektru ¹H NMR (slika 47) zbog korištenja pulsne sekvence sa supresijom signala otapala, pa je njezin kemijski pomak određen iz spektra HSQC. Metilenska skupina pri 3,64 ppm u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 62,4 ppm, što znači da je na nju vezana hidroksilna skupina, kao i u slučaju supstituenta R₂. Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da je supstituent R₃ hidroksipropilna skupina.

Predložena struktura spoja **17** prikazana je na slici 49. Spektar masa spoja **17** (Dodatak, slika D54) sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[M + H]^+$ pri vrijednosti m/z 260,2 što odgovara predloženoj strukturi spoja **17**. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **17** navedeni su u tablici 22.



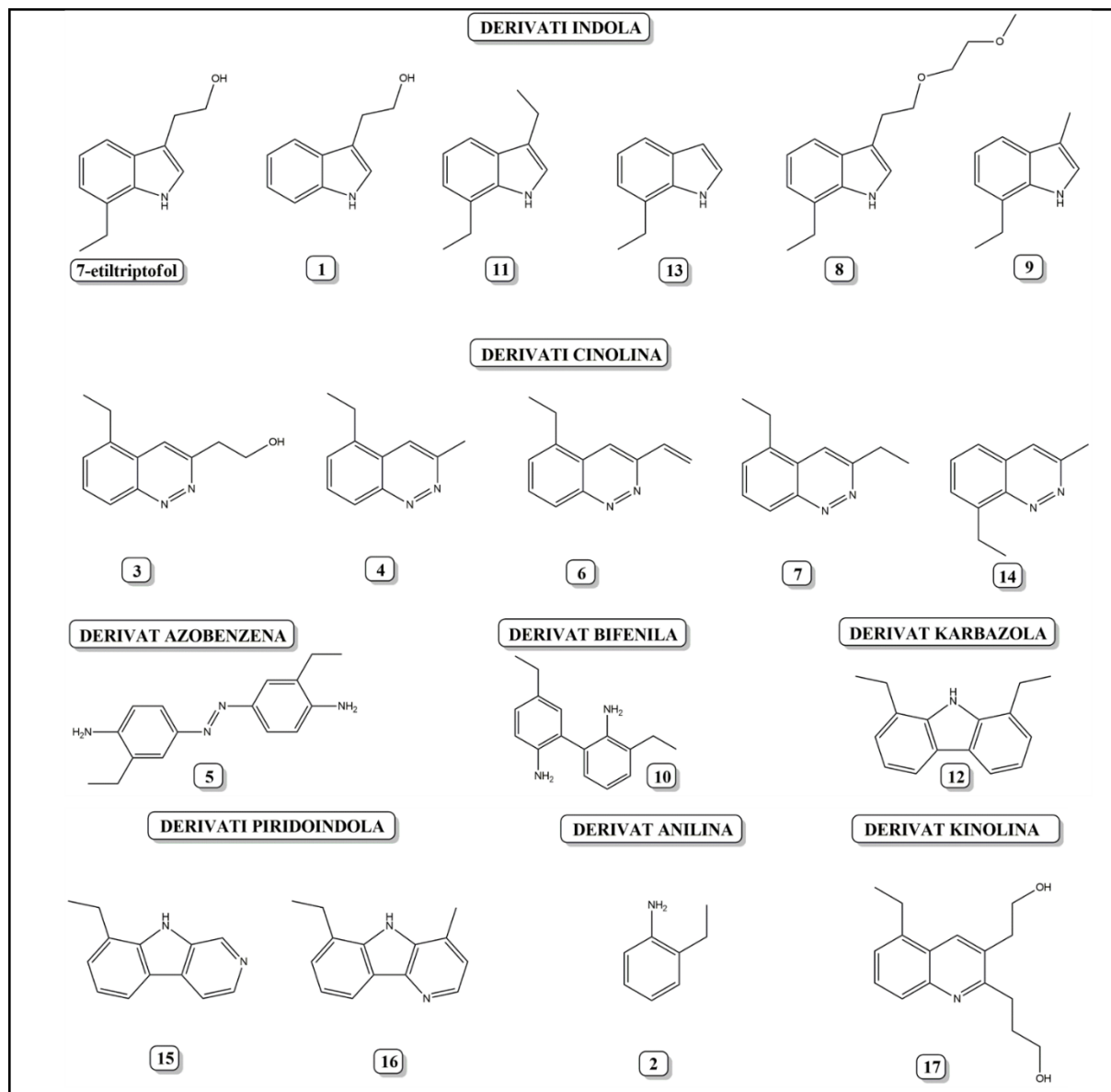
Slika 49. Predložena struktura spoja **17**

Tablica 22. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za spoj **17** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1	-	-	8a	-	144,6
2	-	160,1	9	3,09	32,5
3	-	131,3	10	2,08	31,7
4	7,98	137,2	11	3,64	62,4
4a	-	127,3	12, 15	*	-
5	-	142,0	13	3,00	36,1
6	7,50	128,2	14	3,81	62,7
7	7,40	126,7	16	3,24	25,3
8	7,64	126,1	17	1,33	15,6

*nije opaženo

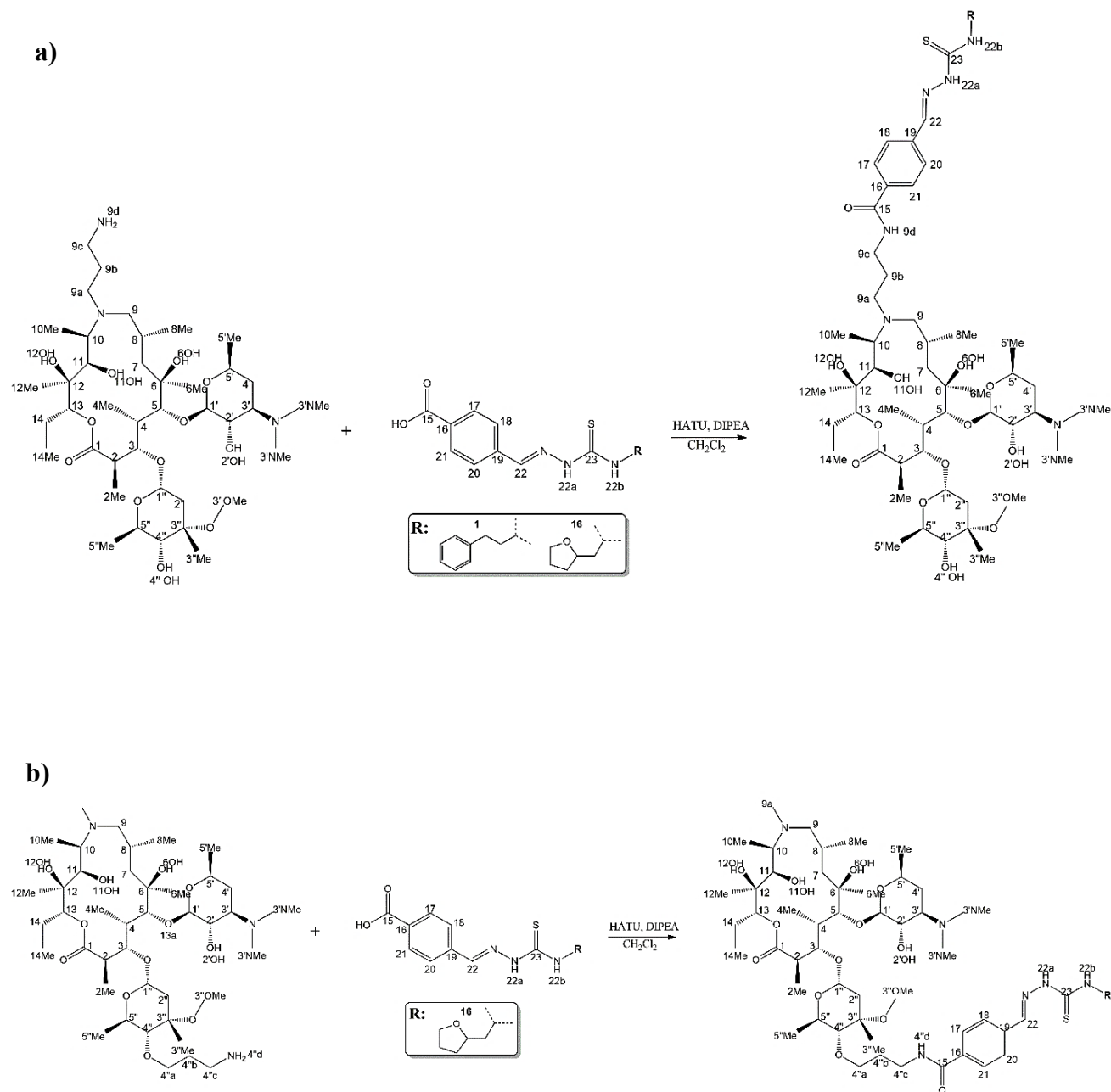
Na slici 50 prikazane su predložene strukture svih 17 izdvojenih onečišćenja razvrstanih u 8 različitih skupina, a to su derivati: indola, cinolina, azobenzena, bifenila, karbazola, piridoindola, anilina i kinolina.

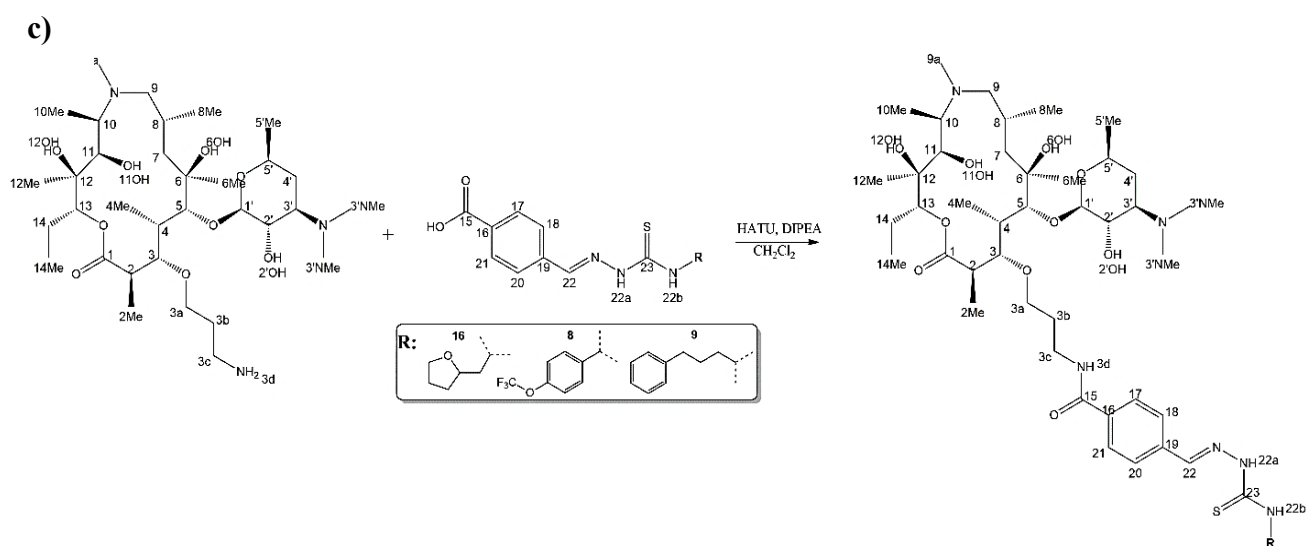


Slika 50. Predložene strukture onečišćenja izdvojenih iz uzorka 7-etiltryptofola

4.3. Analiza makrozona tehnikom LC-SPE/krio NMR

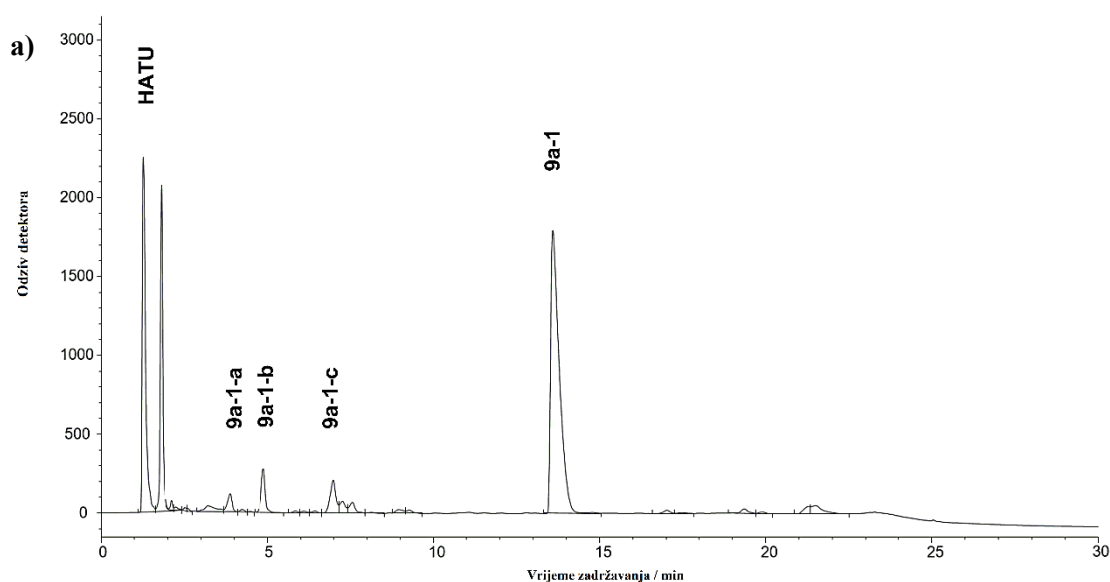
Makrozoni **9a-1**, **9a-16**, **4''-16**, **3-16**, **3-8** i **3-9** sintetizirani su prema reakcijskim shemama prikazanima na slikama 51a – c.

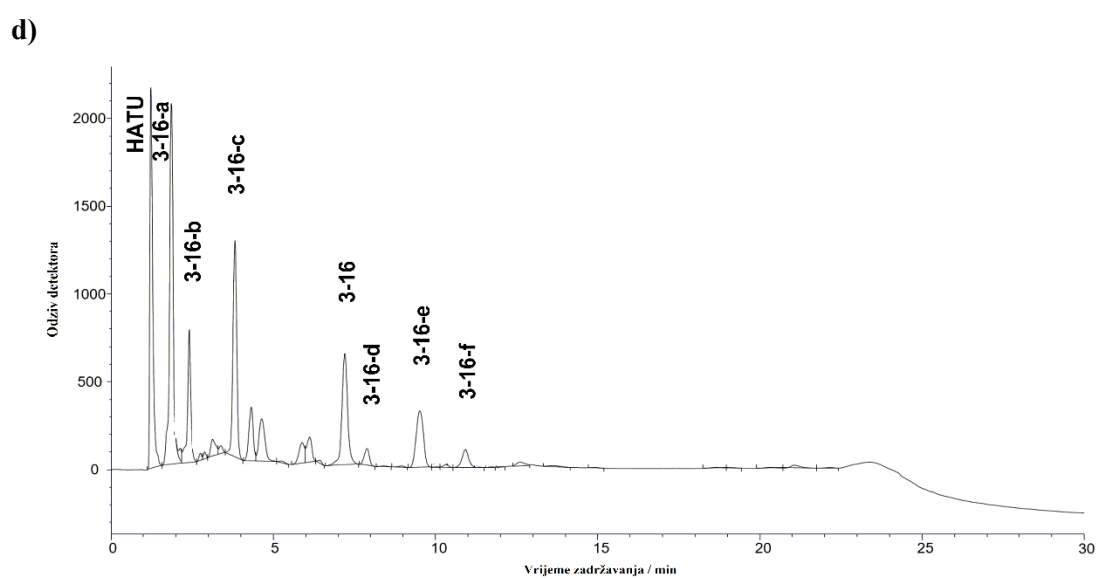
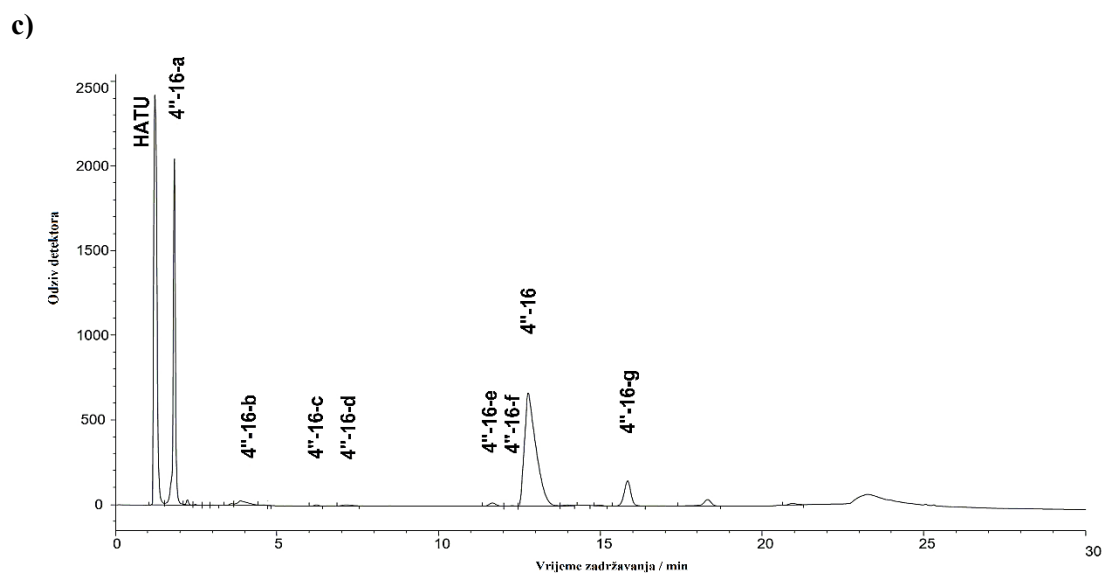
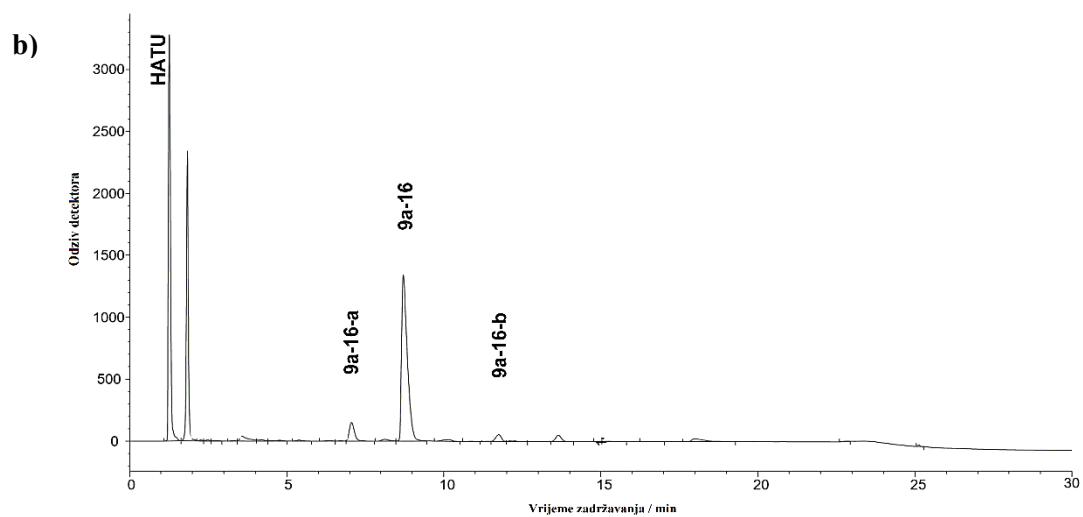


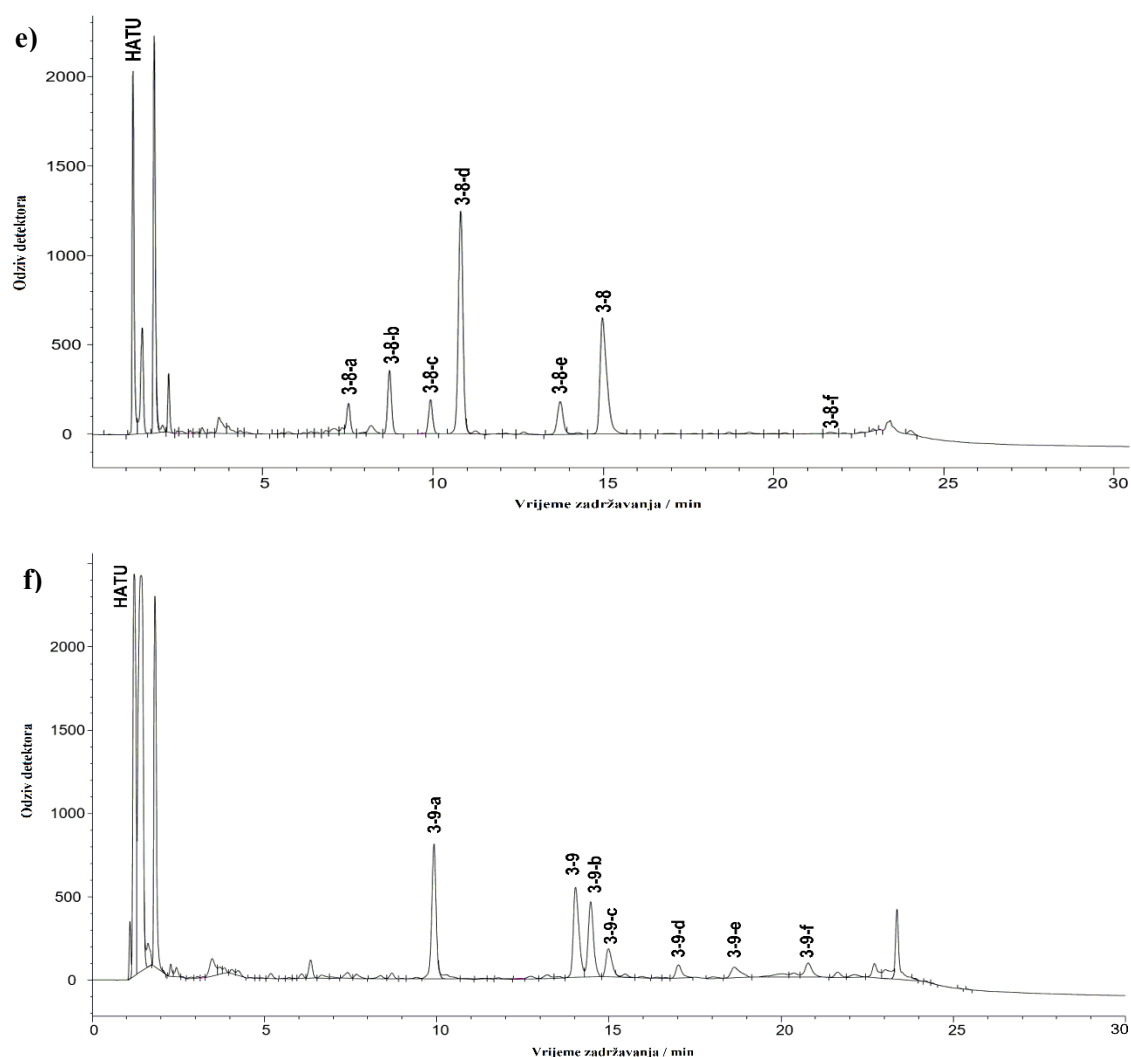


Slika 51. Shematski prikaz sinteze makrozona iz klase: a) 9a-; b) 4"- i c) 3-

Zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje sastojaka reakcijskih smjesa svih makrozona postignuto je na kromatografskoj koloni Waters XBridge Phenyl, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica punila 3,5 μm , uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila i amonijačnog pufera pH 10 množinske koncentracije 10 mmol L^{-1} prema gradijentnom programu prikazanom u tablici 1 (poglavlje 3.5.2.). Reprezentativni kromatogrami reakcijskih smjesa prikazani su na slikama 52a – 52f.







Slika 52. Kromatogram LC-UV(DAD) reakcijske smjese makrozona: a) **9a-1**; b) **9a-16**; c) **4''-16**; d) **3-16**; e) **3-8** i f) **3-9**

Udio komponenata u uzorcima izračunat je kao postotak površine kromatografskog pika pojedine komponente u odnosu na ukupnu površinu svih detektiranih kromatografskih pikova. Udio novosintetiziranih makrozona u reakcijskim smjesama bio je od 6,39 % za spoj **3-9** do 46,7 % za spoj **9a-1**, dok je udio onečišćenja bio od 0,01 % do 35,1 %.

4.3.1. Istraživanje djelotvornosti ekstrakcije spojeva na SPE-sorbense

Djelotvornost ekstrakcije istražena je na uzorku prvog novosintetiziranog makrozona **9a-1**. Za ekstrakciju su odabrane sljedeće komponente iz reakcijske smjese: makrozon **9a-1** čiji je udio u reakcijskoj smjesi bio 46,7 %, zatim nepoznati spoj RRT 0,141, nazvan prema relativnom vremenu zadržavanja u odnosu na glavnu komponentu (engl. *Relative Retention Time*, RRT), s

udjelom 15,8 % te spoj **9a-1-b** s udjelom 2,95 % u reakcijskoj smjesi. Rezultati su prikazani u tablici 23. Uspoređujući omjere *S/N* izračunane iz spektara ¹H NMR ekstrahiranih komponenata na različite SPE-sorbense vidljivo je da se makrozon **9a-1** najbolje zadržava na SPE-sorbensu C18 (označeno crvenom bojom u tablici), dok se spoj **9a-1-b**, koji je polarniji od makrozona **9a-1**, bolje zadržava na modificiranoj stiren-divinilbenzenskoj (Resin SH) i divinilbenzenskoj (Resin GP) polimernoj nepokretnoj fazi. Spoj RRT 0,141 se nije zadržao niti na jednom SPE-sorbensu što se može objasniti visokom polarnošću ove komponente, pa je stoga izuzet iz daljnjeg istraživanja. Ovi su rezultati u skladu s prethodnim istraživanjem ključnih parametara za zadržavanje spojeva na SPE-sorbensima kojeg su proveli Clarkson i suradnici.⁵⁸ Analizom zadržavanja 25 modelnih uzoraka prirodnih produkata iz različitih skupina i različitih fizikalno-kemijskih svojstava na većem broju SPE-sorbensa (CN, C2, C8, C8(EC), C18, C18(HD), Resin GP i Resin SH) pokazano je da se polarniji spojevi zadržavaju od 10 do 40 puta bolje na polimernim SPE-sorbensima kao što su Resin GP i Resin SH, nego na sorbensima koji sadrže alkilne skupine vezane na silikagel.

Tablica 23. Djelotvornost ekstrakcije komponenata iz uzorka **9a-1** peterostrukim ukoncentriravanjem na različite SPE-sorbense uz dodatni protok od 3 mL min⁻¹.

Vrijednosti <i>S/N</i> *								
SPE-sorbens								
Spoj	CN	C2	C8	C18	Resin GP	Resin SH	MM kation	MM anion
9a-1	1,9	2,1	22,2	170,8	17,0	4,0	1,8	38,8
RRT 0,141	2,1	1,7	2,2	1,7	1,8	2,5	1,9	1,9
9a-1-b	3,0	1,8	2,0	2,4	12,6	18,0	4,4	7,6

*omjer signala i šuma u spektru ¹H NMR uz 128 snimaka

Utjecaj dodatnog protoka vodene faze na zadržavanje spojeva na SPE-sorbensu Resin SH istražen je višestrukim ukoncentriravanjem (60 puta) komponente **9a-1-a** udjela 1,21 %, zatim komponente **9a-1-b** čiji je udio 2,95 % i komponente **9a-1-c** s udjelom 1,80 % u reakcijskoj smjesi. Rezultati su prikazani u tablici 24. Pokazano je da se optimalna vrijednost dodatnog protoka razlikuje od komponente do komponente, tj. da ovisi o svojstvima analiziranog spoja.

Polarnijim komponentama pogoduje veći dodatni protok, dok se manje polarni spojevi bolje zadržavaju na SPE-sorbensu uz smanjenje elucijske jakosti organske pokretne faze.

Poznato je da dvostruko povećanje dodatnog protoka vodene faze ima značajniji utjecaj na zadržavanje komponenta koje eluiraju s kromatografske kolone uz udio organske pokretne faze (npr. acetonitrila) veći od 60 %. Općenito, za smanjenje udjela organskog dijela pokretne faze od 10 %, faktor zadržavanja spoja na SPE-sorbensu povećava se oko 3 puta. U slučaju jako polarnih komponenti veći dodatak vode može djelovati kontraproduktivno jer preveliko razrjeđenje može prevladati nad učinkom smanjenja elucijske jakosti.¹³ Navedena činjenica može objasniti rezultate za komponentu **9a-1-a** (tablica 24, označeno crvenom bojom) koja je polarnija od komponenta **9a-1-b** i **9a-1-c** te eluira s kromatografske kolone uz udio acetonitrila od 53,6 %. Iz rezultata prikazanih u tablici 24 jasno se vidi da povećanje dodatnog protoka vodene faze s 1,0 mL min⁻¹ na 3,0 mL min⁻¹ ne pridonosi boljem zadržavanju spoja **9a-1-a** na SPE-sorbensu.

Tablica 24. Djelotvornost ekstrakcije komponenta iz uzorka **9a-1** višestrukim ukoncentriravanjem (60 puta) na SPE-sorbense Resin SH uz različit dodatni protok vodene faze.

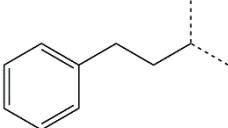
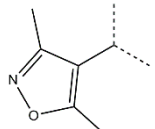
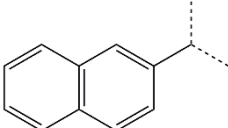
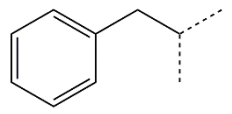
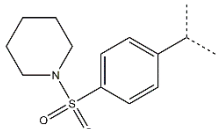
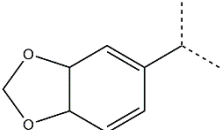
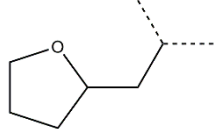
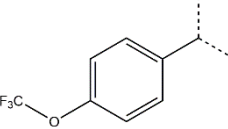
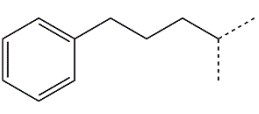
Vrijednosti S/N *			
Dodatni protok / mL min ⁻¹			
Spoj	3,0	1,0	0,5
9a-1-a	22,1	27,4	6,0
9a-1-b	35,1	14,4	7,75
9a-1-c	55,6	67,7	75,1

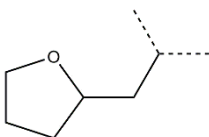
*omjer signala i šuma u spektru ¹H NMR uz 128 snimaka

Nadalje, istražena je djelotvornost ekstrakcije novosintetiziranih makrozona iz triju različitih klasa na SPE-sorbense C18 uz dodatni protok vodene faze koji je bio 1,5 mL min⁻¹. Rezultati su prikazani u tablici 25. Djelotvornost ekstrakcije bila je u rasponu od 60,5 % za makrozon **3-8** do 100 % za makrozon **9a-6**. Na temelju tih podataka može se zaključiti da na djelotvornost ekstrakcije odabranih makrozona najviše utječu fizikalno-kemijska svojstva supstituenta R. Uspoređujući djelotvornost ekstrakcije makrozona **4''-16** i **3-16** koji pripadaju dvjema različitim klasama, ali imaju isti supstituent R, može se vidjeti da se makrozon **4''-16** bolje

zadržava na SPE-sorbensu C18, a to se može objasniti manjom polarnošću makrozona 4''-16 u odnosu na makrozon 3-16 koji u strukturi ne sadrži šećernu jedinicu kladinozu.

Tablica 25. Djelotvornost ekstrakcije novosintetiziranih makrozona iz triju različitih klasa na SPE-sorbense C18 uz dodatni protok od 1,5 mL min⁻¹.

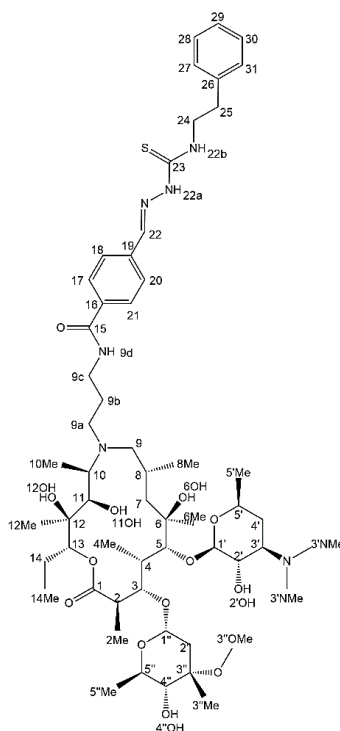
Spoj	Supstituent R	$m_{\text{teor.}} / \text{mg}^*$	$m_{\text{eksp.}} / \text{mg}$	Djelotvornost / %
9a-1		4,70	3,66	77,9
9a-3		8,40	7,78	92,6
9a-5		11,13	6,79	61,0
9a-6		7,78	7,78	100
9a-10		7,72	6,84	88,6
4''-12		8,24	7,80	94,7
4''-16		5,27	4,31	81,8
3-8		1,19	0,72	60,5
3-9		0,62	0,54	87,1

Spoj	Supstituent R	$m_{\text{teor.}} / \text{mg}^*$	$m_{\text{eksp.}} / \text{mg}$	Djelotvornost / %
3-16		0,75	0,57	76,0

*teorijska masa izračunana je na temelju početne mase uzorka, udjela makrozona u reakcijskoj smjesi te volumena i broja injektiranja uzorka na kromatografsku kolonu.

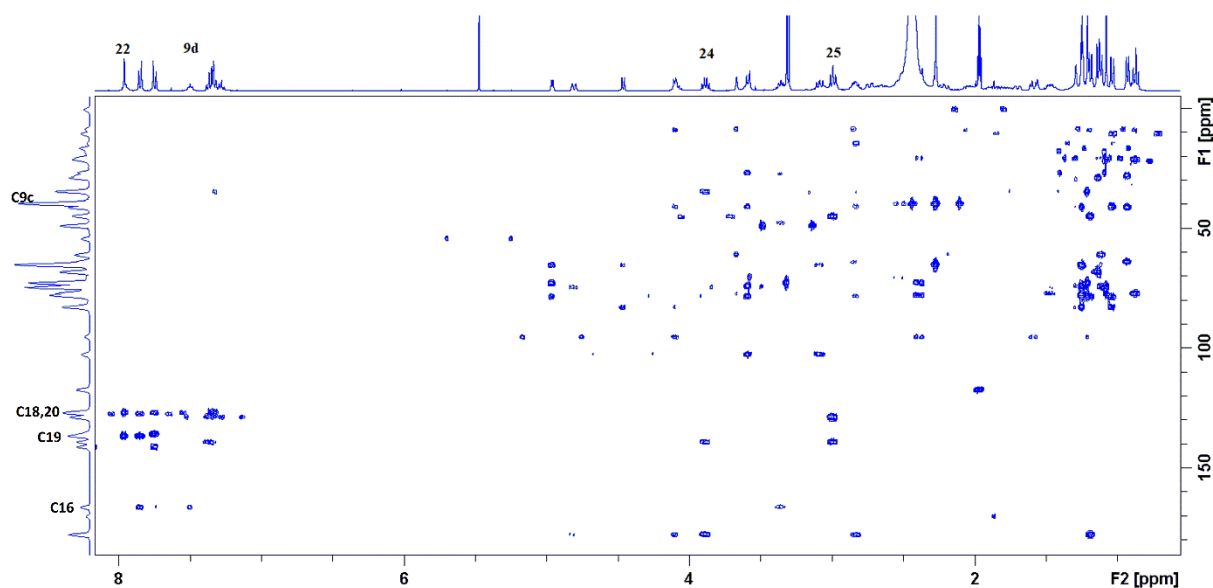
4.3.2. Analiza reakcijske smjese makrozona **9a-1**

Makrozon **9a-1** (slika 53) uspješno je ekstrahiran iz reakcijske smjese višestrukim ukoncentriranjem na SPE-sorbens C18. Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika analit je eluiran u cjevčicu NMR, snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR, te spektar masa. Za usporedbu snimljeni su spektri ^1H NMR polaznih tvari u sintezi makrozona **9a-1**, a to su 9a-(γ -aminopropil) derivat azitromicina, etilfenil tiosemikarbazid, HATU i DIPEA (Dodatak, slike D55–D58). U spektru ^1H NMR spoja **9a-1** (Dodatak, slika D59) karakterističan signal je triplet pri 7,47 ppm koji odgovara protonu –NH iz amidne veze (H-9d, slika 53) nastale reakcijom amidacije (slika 51a).



Slika 53. Struktura makrozona **9a-1** s pobrojanim atomima ugljika

U spektru HMBC spoja **9a-1** (slika 54) proton H-9d korelira s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 166,6 ppm te s metilenskom skupinom H-9c (3,36 ppm; 38,1 ppm), što dodatno potvrđuje da u spoju postoji amidna veza. U strukturi makrozona **9a-1** također je karakterističan singlet pri 7,96 ppm koji odgovara protonu H-22 iz imino veze tiosemikarbazidnog dijela molekule. Proton H-22 u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomima C-18 i C-20 iz benzenskog prstena pri 126,9 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom C-19 pri 136,8 ppm. U spektru COSY (Dodatak, slika D60) jasno se vide dva spinska sustava koja odgovaraju dvama različitim aromatskim prstenovima spoja **9a-1**. Nadalje, proton H-22b pri 7,95 ppm u spektru COSY korelira s metilenskom skupinom H-24 pri 3,89 ppm. U području od 0,87 ppm do 4,95 ppm nalaze se signali makrolaktonskog prstena, kladinoze i desozamina. Spektar masa spoja **9a-1** snimljen uz pozitivnu ionizaciju (Dodatak, slika D62) sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[M+H]^+$ pri vrijednosti m/z 1101, što odgovara molekulskoj masi spoja **9a-1** koja je 1100 Da. Na temelju svega navedenoga može se potvrditi da je makrozon **9a-1** uspješno sintetiziran te izoliran iz reakcijske smjese. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **9a-1** u deuteriranom acetonitrilu prikazani su u tablici 26.



Slika 54. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC makrozona **9a-1** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

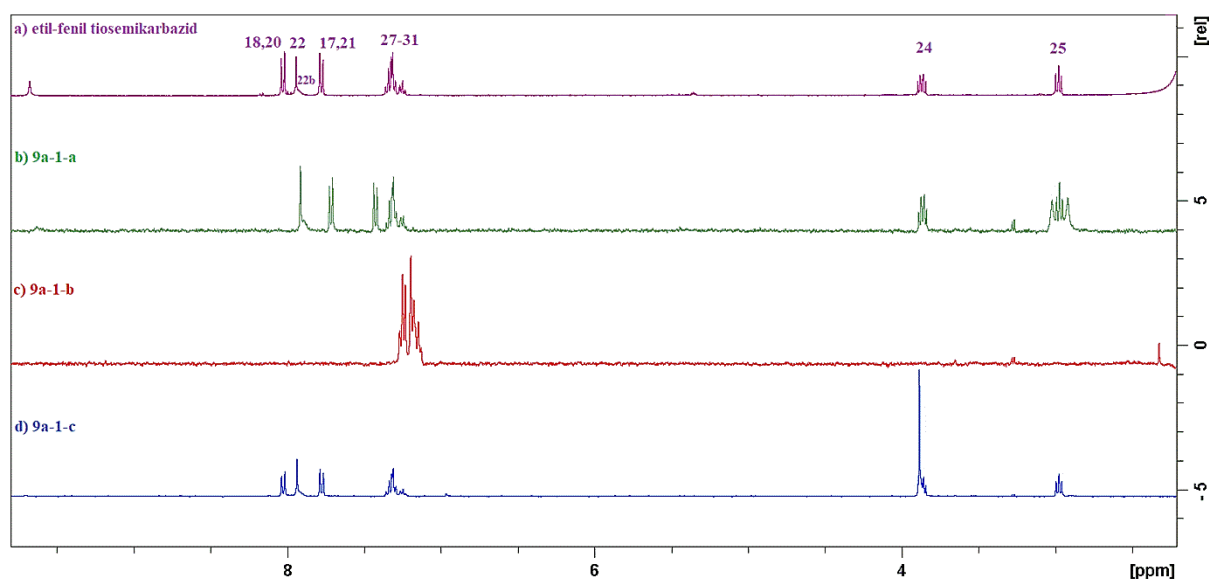
Tablica 26. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **9a-1** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm	Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm
1	–	178,2	17; 21	7,85	127,4
2	2,84	45,1	18; 20	7,74	126,9
2Me	1,19	14,6	19		136,8
3	4,10	78,5	22	7,96	141,3
4	2,05	41,0	22a	*	–
4Me	1,03	8,9	22b	*	–
5	3,59	83,2	23	–	177,8
6	–	74,2	24	3,89	45,2
6Me	1,25	26,9	25	2,99	34,9
6OH	*	–	26	–	139,4
7eq; 7ax	1,58; 1,47	41,2	27; 31	7,36	128,9
8	1,99	28,1	28; 30	7,35	126,4
8Me	0,92	22,0	29	7,38	126,4
9eq; 9ax	2,73; 2,22	63,9	1'	4,46	102,4
9a	3,05; 2,65	47,6	2'	3,07	70,9
9b	1,90; 1,77	27,2	2'OH	*	–
9c	3,36	38,1	3'	2,52	65,4
9d	7,50	–	3'NMe ₂	2,27	39,7
10	2,85	61,0	4'eq; 4'ax	1,70; 1,11	28,9
10Me	1,11	8,4	5'	3,59	68,2
11	3,67	74,6	5'Me	1,14	20,9
11OH	*	–	1''	4,95	95,4
12	–	74,8	2''eq; 2''ax	2,38; 1,59	34,8
12Me	1,07	16,6	3''	–	72,8
12OH	*	–	3''Me	1,21	20,6
13	4,80	77,2	3''OMe	3,31	49,0
14eq; 14ax	1,84; 1,47	21,2	4''	2,98	77,9
14Me	0,87	10,3	4''OH	*	–
15	–	166,6	5''	4,09	65,4
16	–	136,1	5''Me	1,25	18,2

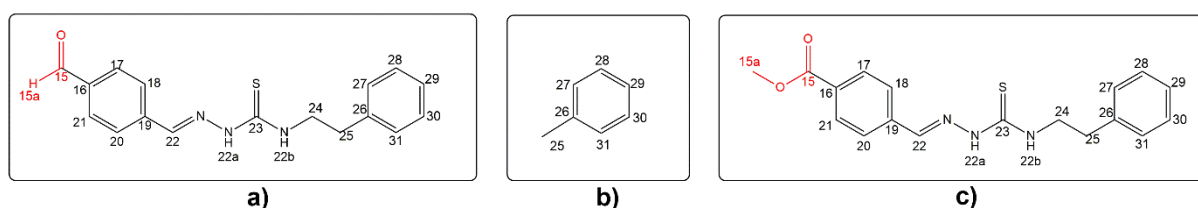
* nije opaženo

Iz uzorka reakcijske smjese **9a-1** uspješno su izolirani spojevi **9a-1-a** s udjelom 1,21 % u reakcijskoj smjesi, **9a-1-b** s udjelom 2,95 % i **9a-1-c** čiji je udio u reakcijskoj smjesi bio 1,80 %. Usporedbom spektara ^1H NMR triju spojeva sa spektrom ^1H NMR etilfenil tiosemikarbazida (slika 55) uočeno je da su izolirani spojevi strukturno slični etilfenil tiosemikarbazidu, polaznoj tvari u sintezi makrozona **9a-1**. U spektru ^1H NMR spoja **9a-1-a** (slika 55b) uočena je razlika u kemijskim pomacima aromatskih protona H-17,21 i H-18,20 u odnosu na kemijske pomake istih protona u spektru ^1H NMR etilfenil tiosemikarbazida (slika 55a), dok su kemijski pomaci protona drugog aromatskog prstena, H-27 do H-31, ostali nepromijenjeni. Spektar COSY (Dodatak, slika D63) pokazuje tri spinska sustava u molekuli **9a-1-a** od kojih jedan odgovara protonima H-17 do H-21, drugi pripada protonima H-27 do H-31, a treći odgovara korelaciji H-22b s metilenskim protonima H-24. Budući da su signali

protona H-17,21 i H-18,20 u spoju **9a-1-a** zasjenjeni, pretpostavljeno je da spoj **9a-1-a** sadrži aldehidnu skupinu vezanu na aromatski prsten H17–21 umjesto karboksilne skupine. U spektru masa spoja **9a-1-a** (Dodatak, slika D64) detektiran je signal pri vrijednosti m/z 282 koji odgovara gubitku $[\text{HCO}]^+$ iz molekule, što je karakteristično za aldehide. Molekulska masa spoja **9a-1-a** je 311 Da. Predložena struktura spoja **9a-1-a** prikazana je na slici 56a.



Slika 55. Spektri ^1H NMR spojeva: a) etilfenil tiosemikarbazid; b) **9a-1-a**; c) **9a-1-b** i d) **9a-1-c**



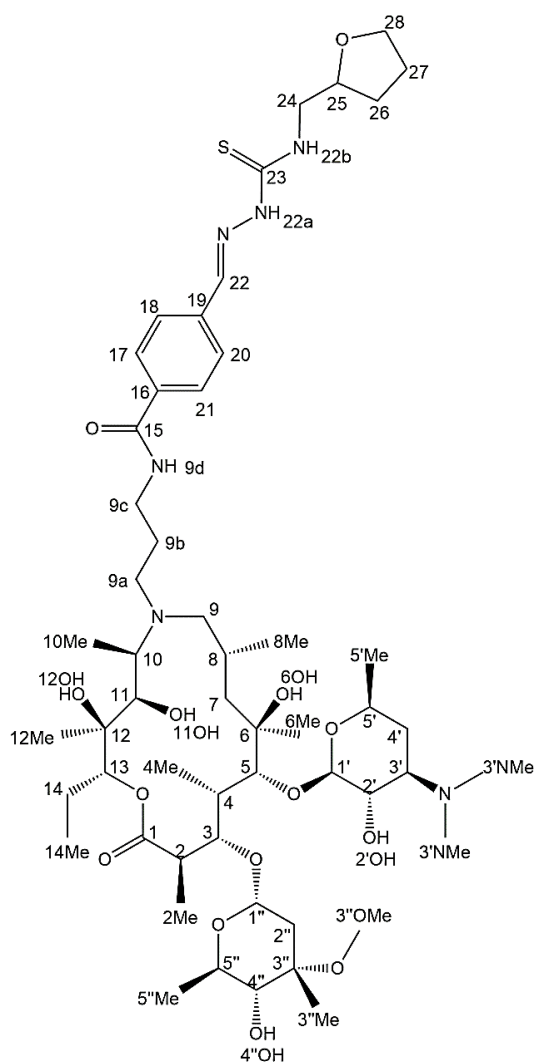
Slika 56. Predložene strukture izoliranih spojeva: a) **9a-1-a**; b) **9a-1-b** i c) **9a-1-c**

Spektar ^1H NMR spoja **9a-1-b** (slika 55c) sadrži signale aromatskog prstena H-27 do H-31 u području od 7,00 ppm do 7,40 ppm, dok ostali signali u aromatskom dijelu izostaju. U alifatskom dijelu spektra ^1H NMR za spoj **9a-1-b** vidljiv je singlet pri 2,32 ppm koji u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 20,5 ppm. Na temelju navedenih podataka predložena struktura spoja **9a-1-b** je metilbenzen (toluen) prikazan na slici 56b. Signali spoja **9a-1-c** (slika 55d) u spektru ^1H NMR preklapaju se sa signalima etilfenil tiosemikarbazida, ali se u spektru ^1H NMR spoja **9a-1-c** nalazi dodatni singlet pri 3,89 ppm. U spektru HSQC (Dodatak, slika

D65) navedeni singlet korelira s ugljikovim atomom pri 51,9 ppm pa se može zaključiti da je nova metoksi-skupina vezana na karbonilni ugljikov atom C-15. Spektar masa spoja **9a-1-c** (Dodatak, slika D66) pokazuje protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ pri vrijednosti m/z 342, što odgovara molekulkovoj masi spoja **9a-1-c** koja je 341 Da. Predložena struktura spoja **9a-1-c** prikazana je na slici 56c.

4.3.3. Analiza reakcijske smjese makrozona **9a-16**

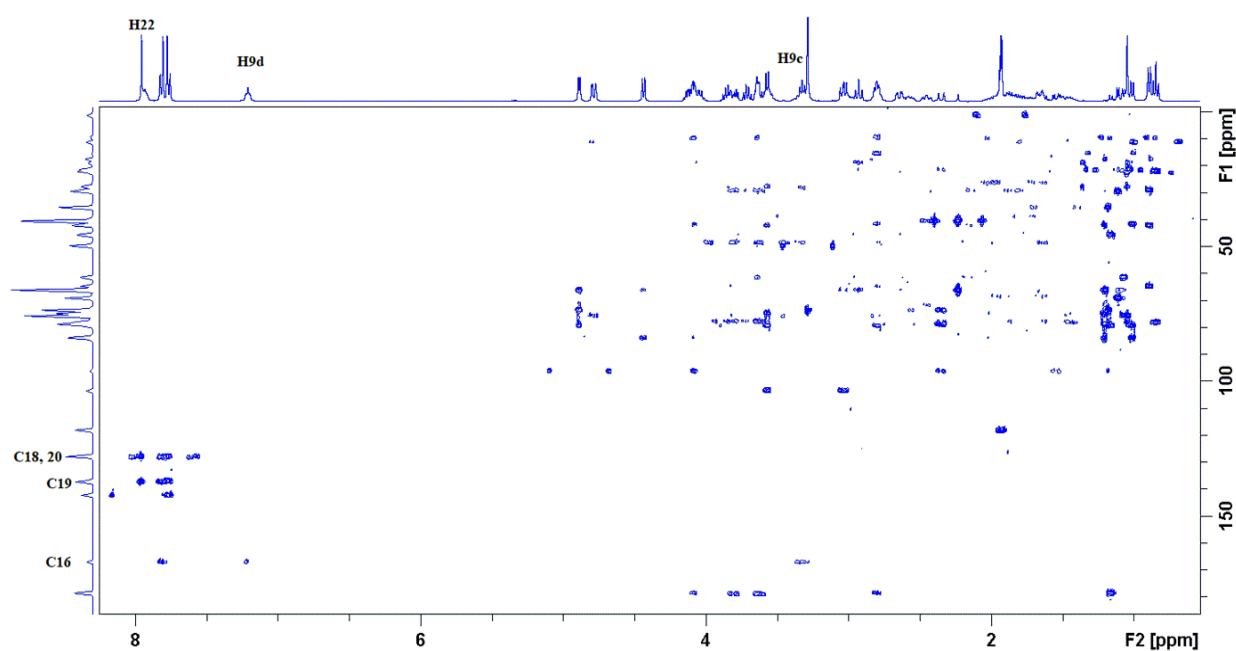
Makrozon **9a-16** (slika 57) uspješno je ekstrahiran iz reakcijske smjese višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbens C18. Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika analit je eluiran u cjevčicu NMR, snimljeni su jedno- i dvodimenzijски spektri NMR, te spektar masa. Za usporedbu snimljeni su spektri NMR tetrahidrofurfuril tiosemikarbazida koji je, uz **9a-(γ -aminopropil)** derivat azitromicina, te reagense HATU i DIPEA, polazna tvar za sintezu makrozona **9a-16** (Dodatak, slike D67 – D70).



Slika 57. Struktura makrozona **9a-16** s pobrojanim atomima ugljika

U spektru ^1H NMR spoja **9a-16** (Dodatak, slika D71) karakterističan signal je triplet pri 7,22 ppm koji odgovara protonu $-\text{NH}$ iz amidne veze (H-9d, slika 57) nastale reakcijom amidacije (slika 51a). U usporedbi sa spektrima NMR makrozona **9a-1** opisanima u poglavlju 4.3.2., spektri NMR makrozona **9a-16** razlikuju se samo u signalima odgovarajućeg supstituenta R vezanog na tiosemikarbazidni dio molekule makrozona, a to je u ovom slučaju 2-tetrahidrofurfuril (H-24 do H-28, slika 57).

U spektru HMBC spoja **9a-16** (slika 58) protoni H-9d i H-9c pri 3,33 ppm koreliraju s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 167,1 ppm što dodatno potvrđuje da u spoju postoji amidna veza. U strukturi makrozona **9a-16** također je karakterističan singlet pri 7,96 ppm koji odgovara protonu H-22 iz imino veze tiosemikarbazidnog dijela molekule. Proton H-22 u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomima C-18 i C-20 iz benzenskog prstena pri 127,9 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom C-19 pri 137,5 ppm. U spektru COSY (Dodatak, slika D72) vidljive su korelacije protona H-22b pri 7,93 ppm s protonima metilenske skupine H-24 (3,81; 3,63 ppm). U području od 0,85 ppm do 4,89 ppm zabilježeni su svi signali makrolaktonskog prstena te kladinoze i desozamina. Spektar masa makrozona **9a-16** snimljen uz pozitivnu ionizaciju (Dodatak, slika D74) pokazuje protonirani molekulski ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 1081, što odgovara molekularnoj masi makrozona **9a-16** koja je 1080 Da. Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da je makrozon **9a-16** uspješno sintetiziran te izoliran iz reakcijske smjese.



Slika 58. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC makrozona **9a-16** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **9a-16** u deuteriranom acetonitrilu prikazani su u tablici 27.

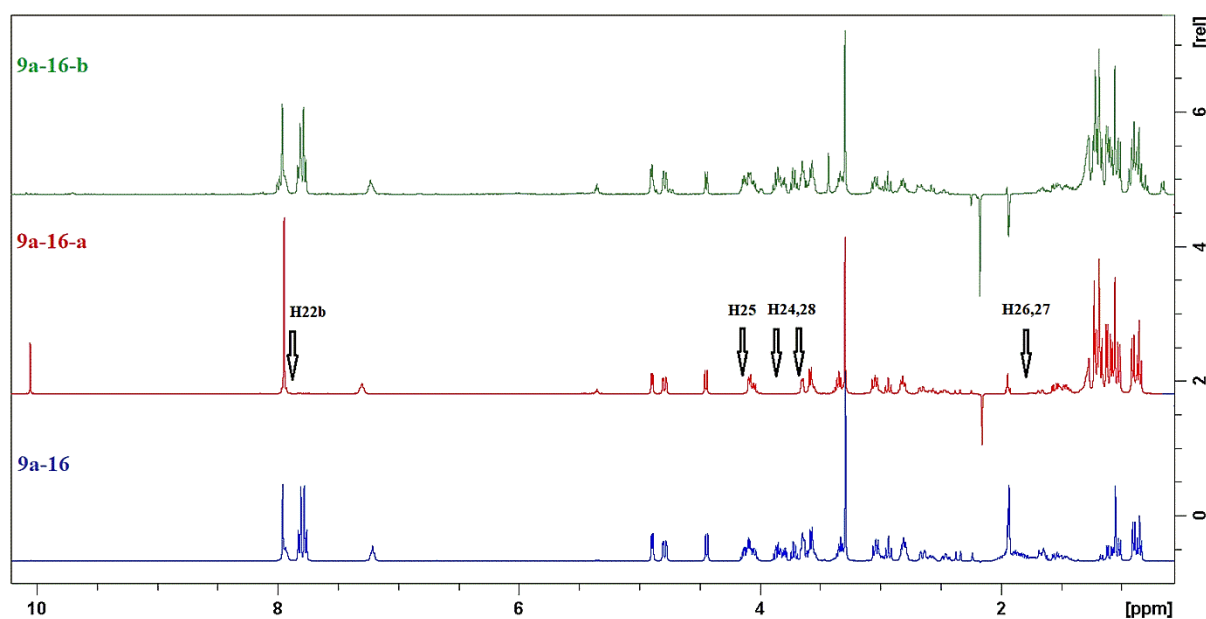
Tablica 27. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **9a-16** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm	Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm
1	-	178,5	17; 21	7,82	128,4
2	2,81	45,6	18; 20	7,77	127,9
2Me	1,16	15,2	19	-	137,5
3	4,09	79,3	22	7,96	142,4
4	2,02	41,6	22a	*	-
4Me	1,02	10,0	22b	7,93	-
5	3,57	84,0	23	-	178,9
6	-	74,9	24	3,81; 3,63	48,7
6Me	1,21	27,7	25	4,13	77,7
6OH	*	-	26	1,85; 1,73	28,1
7eq; 7ax	1,65; 1,45	42,1	27	1,89	25,4
8	1,99	28,9	28	3,67; 3,60	68,4
8Me	0,90	23,0	1'	4,44	103,6
9eq; 9ax	2,64; 2,18	64,8	2'	3,04	71,8
9a	3,03; 2,61	48,7	2'OH	*	-
9b	1,65	29,5	3'	2,46	66,3
9c	3,33	38,8	3'NMe₂	2,24	40,4
9d	7,22	-	4'eq; 4'ax	1,69; 1,07	29,6
10	2,80	61,4	5'	3,57	69,0
10Me	1,07	9,5	5'Me	1,12	21,6
11	3,67	75,7	1''	4,89	96,4
11OH	*	-	2''eq; 2''ax	2,36; 1,55	35,5
12	-	75,6	3''	-	73,5
12Me	1,05	17,5	3''Me	1,19	21,7
12OH	*	-	3''OMe	3,29	49,7
13	4,79	78,1	4''	2,93	78,9
14eq; 14ax	1,81; 1,45	22,2	4''OH	*	-
14Me	0,85	11,2	5''	4,05	66,1
15	-	167,1	5''Me	1,21	18,7
16	-	136,9			

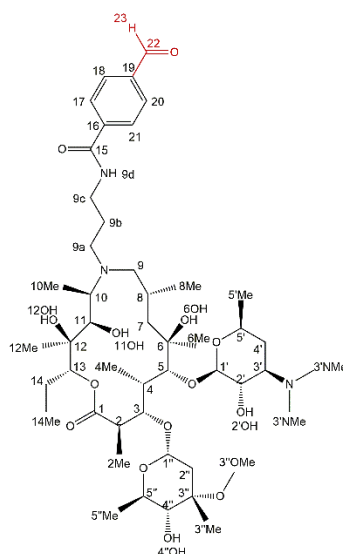
* nije opaženo

Iz uzorka reakcijske smjese **9a-16** uspješno su izolirane komponente **9a-16-a** i **9a-16-b** čiji su udjeli u uzorku bili 1,5 %, odnosno 0,25 %. Usporedbom spektara ^1H NMR izoliranog spoja **9a-16-a** i makrozona **9a-16** (slika 59) uočeno je da u spektru onečišćenja nedostaju signali tiosemikarbazonskog dijela makrozona, H-22 do H-28 (slika 57). U spektru ^1H NMR vidljiv je novi singlet pri 10,05 ppm koji bi mogao odgovarati protonu aldehidne skupine, budući da u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 192,6 ppm (Dodatak, slika D75), a u spektru HMBC s ugljikovim atomima C-18,20 pri 129,2 ppm i s kvaternim ugljikovim atomom C-19 pri 138,1 ppm (Dodatak, slika D76). Nadalje, signal pri 7,94 ppm odgovara metinskim

protonima H-17,21 i H-18,20 u benzenskom prstenu koji su u spektru ^1H NMR preklapljeni, ali se razlikuju u spektru HSQC jer koreliraju s odgovarajućim ugljikovim atomima pri 127,8 ppm i 129,2 ppm. U spektru HMBC zabilježena je korelacija metinskih protona H-17,21 i H-18,20 s kvaternim ugljikovim atomom C-15 pri 166,0 ppm, te s aldehidnim ugljikovim atomom pri 192,6 ppm. Spektar masa spoja **9a-16-a** sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 924,57 što odgovara molekularnoj masi spoja koja je 923,57 Da (Dodatak, slika D77). Predložena struktura spoja **9a-16-a** prikazana je na slici 60.



Slika 59. Usporedba spektara ^1H NMR izoliranog makrozona **9a-16** (plavo), spoja **9a-16-a** (crveno) i **9a-16-b** (zeleno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

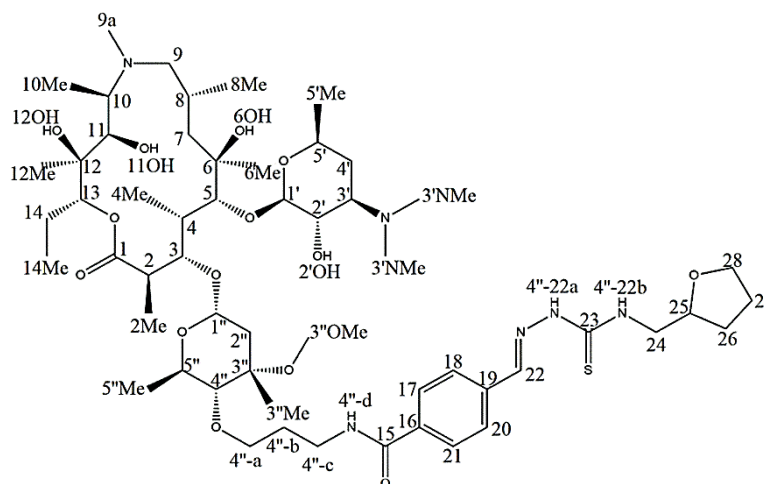


Slika 60. Predložena struktura izoliranog spoja **9a-16-a** s pobrojanim atomima ugljika

Usporedbom spektara ^1H NMR izoliranog spoja **9a-16-b** i makrozona **9a-16** (slika 59) vidljivo je da se svi signali gotovo preklapaju, kao i u spektrima COSY, HSQC i HMBC (Dodatak, slike D78 – D80). Spektar masa pokazuje signal protoniranog molekuskog iona pri vrijednosti m/z 1081, jednako kao i za makrozon **9a-16** (Dodatak, slika D81). Iz svega navedenoga može se zaključiti da je onečišćenje **9a-16-b** diastereomer makrozona **9a-16**. Zbog vrlo male količine izoliranog spoja **9a-16-b** (0,13 mg) nije bilo moguće snimiti spektar NOESY kako bi se odredilo o kojem se diastereomeru radi.

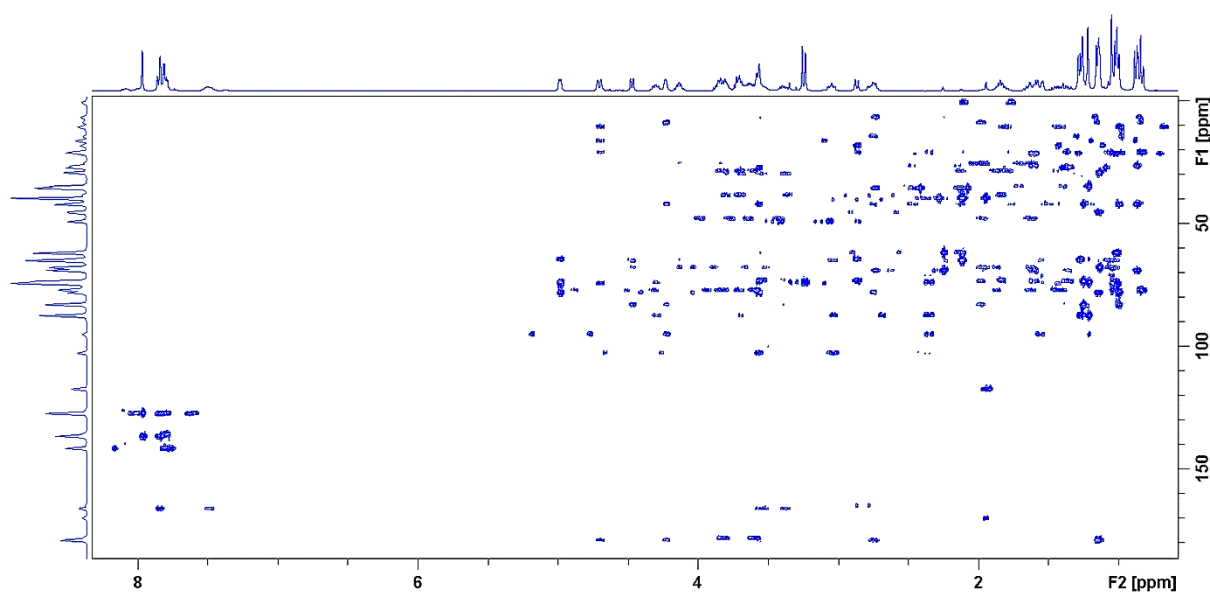
4.3.4. Analiza reakcijske smjese makrozona **4''-16**

Makrozon **4''-16** (slika 61) uspješno je ekstrahiran iz reakcijske smjese višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbens C18. Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika analit je eluiran u cjevčicu NMR, snimljeni su jedno- i dvodimenzijски spektri NMR, te spektar masa. Polazne tvari za sintezu makrozona **4''-16** su tetrahidrofurfuril tiosemikarbazid, $4''$ -(γ -aminopropil) derivat azitromicina, HATU i DIPEA. U spektru ^1H NMR spoja **4''-16** (Dodatak, slika D82) karakterističan signal je triplet pri 7,50 ppm koji odgovara protonu –NH iz amidne veze (H- $4''$ -d, slika 61) nastale reakcijom amidacije (slika 51b).

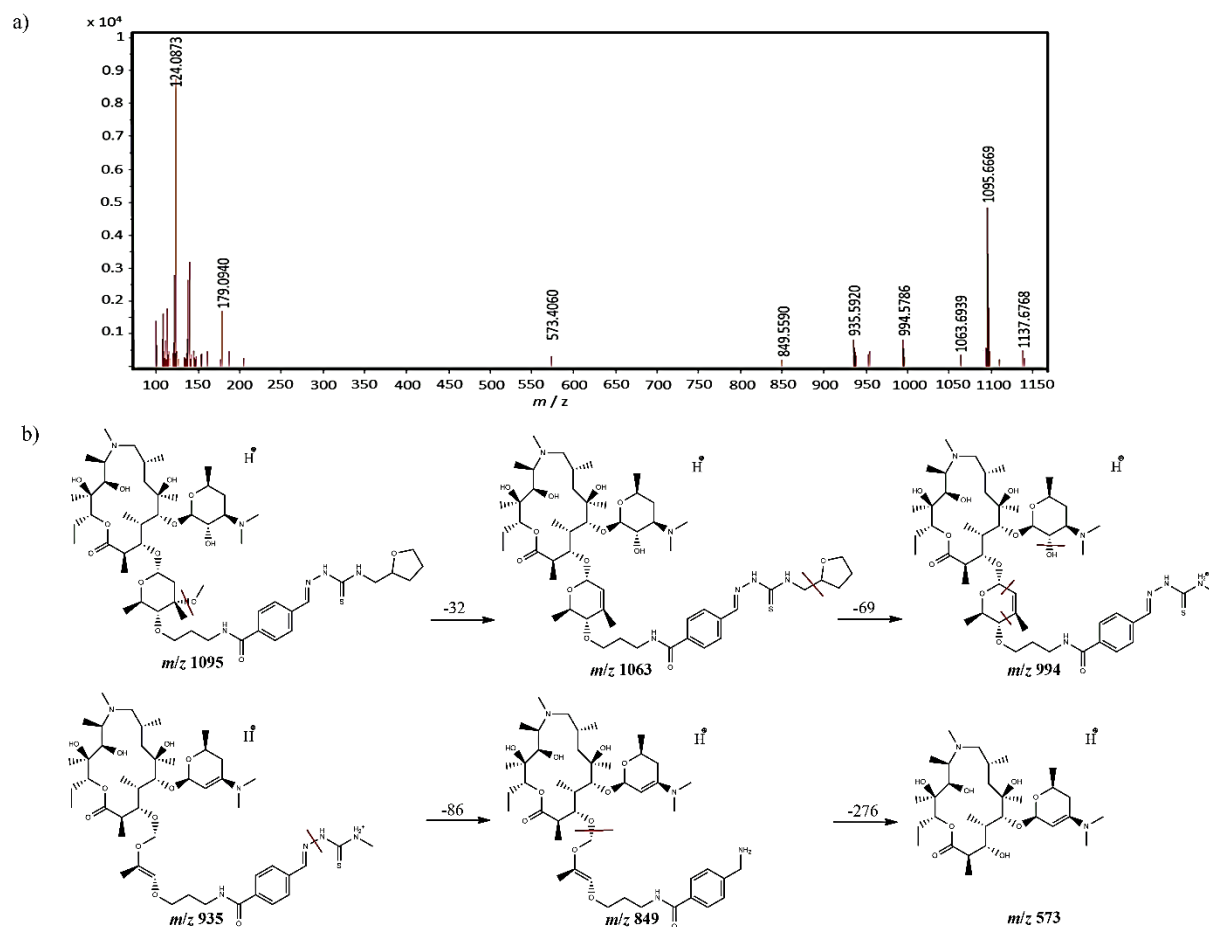


Slika 61. Struktura makrozona **4''-16** s pobrojanim atomima ugljika

U spektru HMBC spoja **4''-16** (slika 62) protoni H4''-d i H4''-c (3,55; 3,41 ppm) koreliraju s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 166,0 ppm što dodatno potvrđuje da u spoju postoji amidna veza. U strukturi makrozona **4''-16** također je karakterističan singlet pri 7,97 ppm koji odgovara protonu H-22 iz imino veze tiosemikarbazidnog dijela molekule. Proton H-22 u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomima C-18 i C-20 iz benzenskog prstena pri 127,2 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom C-19 pri 136,7 ppm. U spektru COSY (Dodatak, Slika D83) zabilježene su korelacije protona H4''-22b pri 8,00 ppm s protonima metilenske skupine H-24 (3,83; 3,60 ppm). U području od 0,87 ppm do 4,70 ppm vidljivi su svi signali makrolaktonskog prstena te kladinoze i desozamina. Spektar masa makrozona **4''-16** snimljen uz pozitivnu ionizaciju (Dodatak, slika D84) pokazuje protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ pri vrijednosti m/z 1095, što odgovara molekularnoj masi makrozona **4''-16** koja je 1094 Da. Na slici 63a prikazan je spektar MS/MS makrozona **4''-16** na temelju kojeg je predložen fragmentacijski put (slika 63b). Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da je makrozon **4''-16** uspješno sintetiziran te izoliran iz reakcijske smjese.



Slika 62. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC makrozona **4''-16** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



Tablica 28. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon 4''-16 u deuteriranom acetonitrilu.

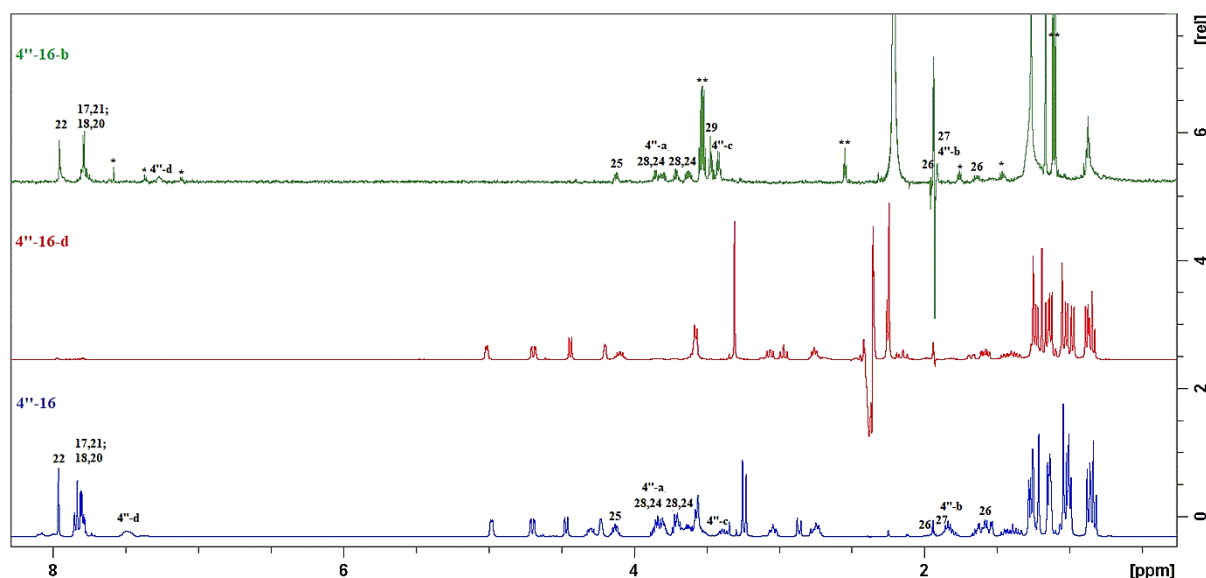
Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm	Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm
1	-	179,0	22	7,97	141,6
2	2,76	45,3	4''- 22a	*	-
2Me	1,15	14,7	4''- 22b	8,00	-
3	4,23	78,1	23	-	178,0
4	1,99	42,1	24	3,83; 3,60	47,8
4Me	1,00	9,0	25	4,14	77,1
5	3,57	83,1	26	1,97; 1,63	28,4
6	-	74,0	27	1,91	25,3
6Me	1,26	27,3	28	3,86; 3,72	67,6
6OH	*	-	1'	4,47	102,6
7eq; 7ax	1,61; 1,37	42,1	2'	3,05	71,1
8	1,98	26,4	2'OH	*	-
8Me	0,87	21,5	3'	2,40	65,1
9eq; 9ax	2,48; 2,14	69,1	3'NMe ₂	2,12	39,7
9a-N	2,25	35,6	4'eq; 4'ax	1,55; 1,07	29,1
10	2,76	62,1	5'	3,66	67,9
10Me	1,02	6,5	5'Me	1,14	21,2
11	3,66	67,9	1''	4,98	95,1
11OH	*	-	2''eq; 2''ax	2,34; 1,56	34,9
12	-	74,4	3''	-	73,3
12Me	1,05	16,1	3''Me	1,21	20,9
12OH	*	-	3''OMe	3,26	49,2
13	4,70	77,2	4''	2,87	87,5
14eq; 14ax	1,82; 1,44	21,0	4''- a	3,85; 3,73	73,5
14Me	0,84	10,6	4''- b	1,84	29,6
15	-	166,0	4''- c	3,55; 3,41	38,2
16	-	135,7	4''- d	7,50	-
17; 21	7,85	127,5	5''	4,30	64,4
18; 20	7,81	127,2	5''Me	1,28	18,2
19	-	136,7			

* nije opaženo

Iz uzorka reakcijske smjese 4''-16 uspješno je izolirano sedam komponenata, a to su: 4''-16-a (udio 20,8 %), 4''-16-b (udio 1,40 %), 4''-16-c (udio 0,12 %), 4''-16-d (udio 0,30 %), 4''-16-e (udio 0,59 %), 4''-16-f (udio 2,50 %) i 4''-16-g (udio 4,40 %).

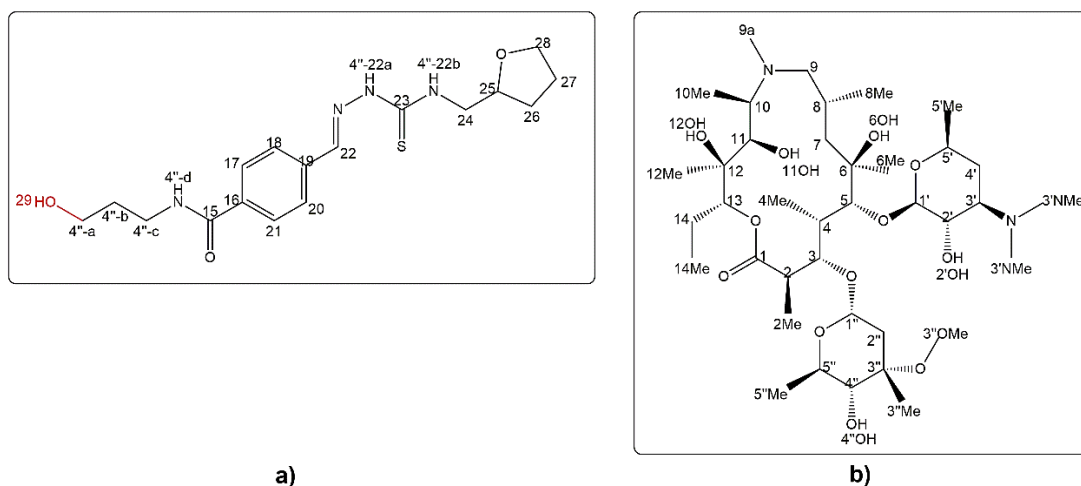
Spoj 4''-16-a identificiran je kao tetrahidrofurfuril tiosemikarbazid, polazna tvar u sintezi makrozona 4''-16. Spektri NMR spoja 4''-16-a prikazani su u Dodatku, slike D67 – D70. Usporedbom spektara ^1H NMR makrozona 4''-16 te spojeva 4''-16-b i 4''-16-d (slika 64) uočeno je da spektar spoja 4''-16-b sadrži signale tiosemikarbazonkog dijela molekule, H-15 do H-28, te signale aminopropilnog lanca, H4''-a do H4''-d (slika 61), ali ne sadrži signale makrolaktonskog prstena niti šećernih jedinica, kladinoze i desozamina. Pri kemijskom pomaku 3,48 ppm u spektru ^1H NMR spoja 4''-16-b zabilježen je novi triplet koji bi mogao odgovarati skupini –OH vezanoj na metilensku skupinu H4''-a aminopropilnog lanca.

Spektar masa izoliranog spoja sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[M + H]^+$ pri vrijednosti m/z 364,3 te adukt s amonijevim ionom $[M + NH_4]^+$ pri vrijednosti m/z 381,3 (Dodatak, slika D85). Predložena struktura spoja **4''-16-b** prikazana je na slici 65a.



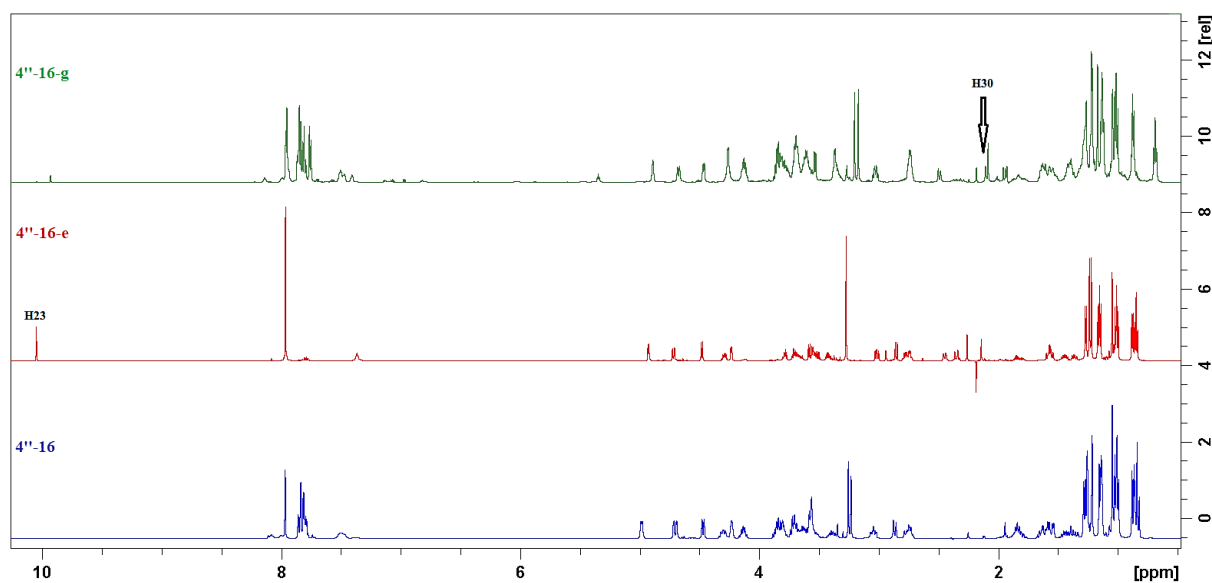
Slika 64. Usporedba spektara ^1H NMR izoliranog makrozona **4''-16** (plavo), spoja **4''-16-b** (zeleno) i spoja **4''-16-d** (crveno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K. Zvezdicom su označeni signali onečišćenja iz otapala, a dvostrukom zvezdicom signali etanola

Spektar ^1H NMR spoja **4''-16-d** (slika 64) sadrži signale makrolaktonskog prstena i šećernih jedinica, kladinoze i desozamina, ali ne sadrži signale tiosemikarbazonskog dijela molekule, H-15 do H-28, te signale aminopropilnog lanca, H $4''$ -a do H $4''$ -d. Spektri COSY, HSQC i HMBC za spoj **4''-16-d** prikazani su u Dodatku, slike D86 – D88. U spektru masa izoliranog spoja **4''-16-d** vidljiv je signal protoniranog molekulskog iona $[M + H]^+$ pri vrijednosti m/z 749,5 što odgovara azitromicinu čija je molekulska masa 748,5 Da. Predložena struktura spoja **4''-16-d** prikazana je na slici 65b.



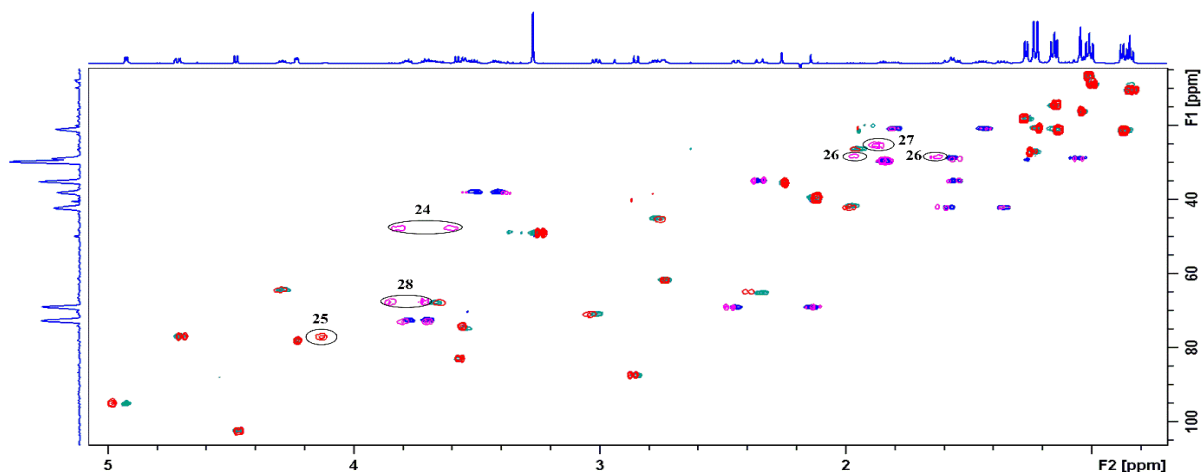
Slika 65. Predložene strukture izoliranih spojeva: a) 4''-16-b i b) 4''-16-d

Usporedbom spektara ^1H NMR makrozona 4''-16 te spojeva 4''-16-e i 4''-16-g (slika 66) vidljiv je u spektru spoja 4''-16-e novi singlet pri 10,05 ppm koji u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 192,4 ppm, što upućuje na proton aldehidne skupine.



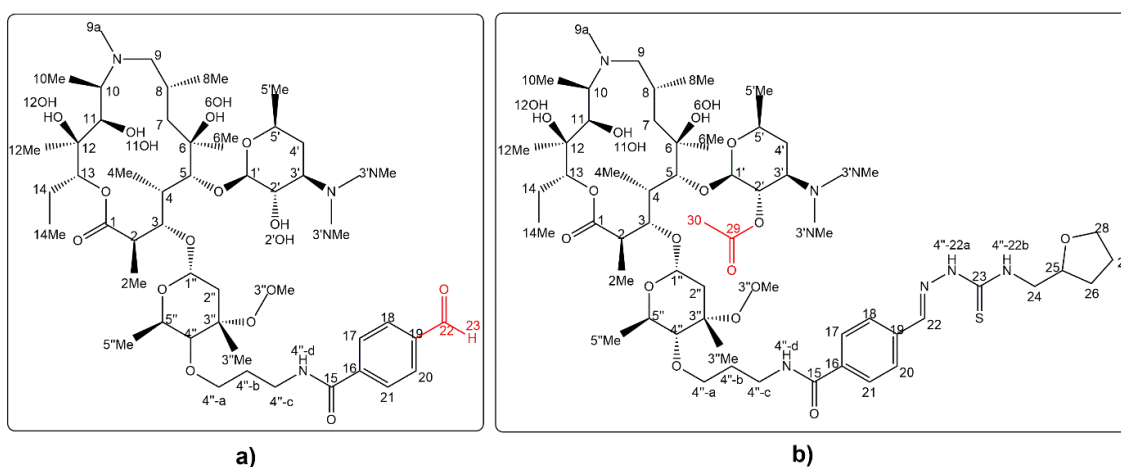
Slika 66. Usporedba spektara ^1H NMR izoliranog makrozona 4''-16 (plavo), spoja 4''-16-e (crveno) i spoja 4''-16-g (zeleno) u acetonitrilu-d₃ pri 298 K

Signal pri 7,96 ppm u spektru HSQC upućuje na korelaciju s ugljikovim atomima pri 127,8 ppm, odnosno 129,6 ppm, što bi odgovaralo metinskim protonima H-17,21 i H-18,20 iz benzenskog prstena. Također je uočeno da u spektru HSQC spoja **4''-16-e** nedostaju signali tiosemikarbazonskog dijela molekule, H-24 do H-28 (slika 67).



Slika 67. Preklapljeni spektri HSQC makrozona **4''-16** (crveni i rozi signali) i spoja **4''-16-e** (zeleni i plavi signali) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

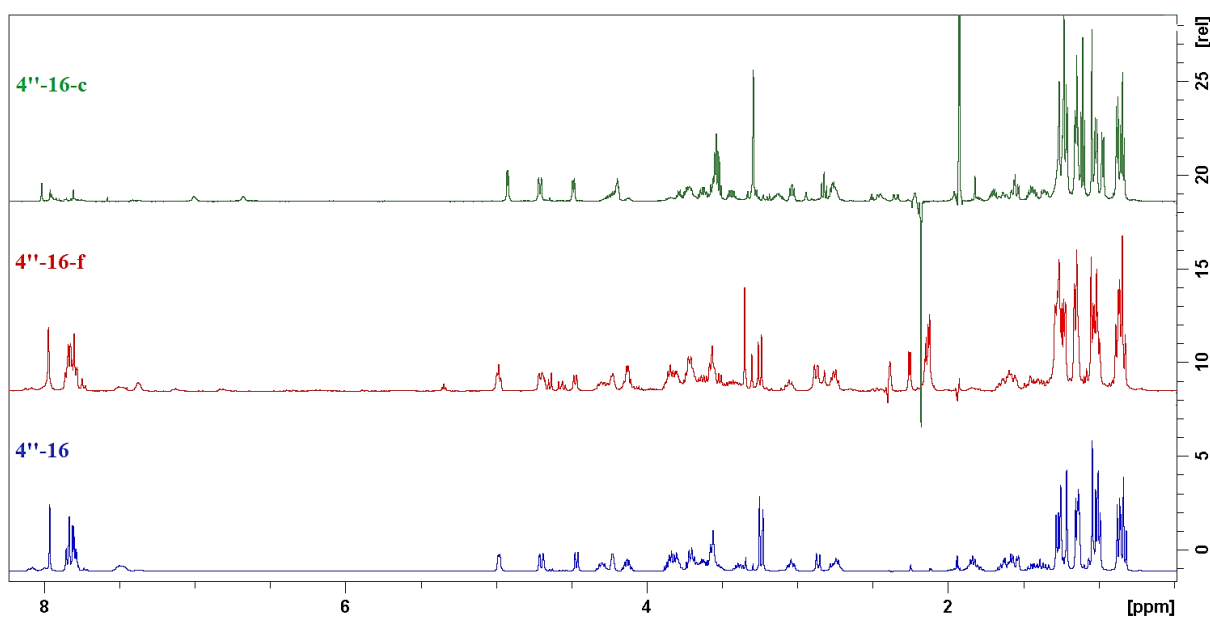
U spektru HMBC vidljiva je korelacija metinskih protona H-17,21 i H-18,20 s kvaternim ugljikovim atomom C-15 pri 166,0 ppm, te s aldehidnim ugljikovim atomom pri 192,4 ppm (Dodatak, slika D89). Spektri NMR spoja **4''-16-e** analogni su spektrima NMR spoja **9a-16-a** opisanom u poglavlju 4.3.3. Spektar masa spoja **4''-16-e** sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[M + H]^+$ pri vrijednosti m/z 938,7 što odgovara molekulskoj masi spoja koja je 937,7 Da (Dodatak, slika D90). Predložena struktura spoja **4''-16-e** prikazana je na slici 68a.



Slika 68. Predložene strukture izoliranih spojeva: a) **4''-16-e** i b) **4''-16-g**

Spektar ^1H NMR spoja **4''-16-g** (slika 66) sadrži sve signale kao i spektar makrozona **4''-16** uz dodatni singlet pri 2,11 ppm koji u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 39,6 ppm (Dodatak, slika D91). Stoga se može zaključiti da se radi o metilnoj skupini vezanoj na karbonilni ugljikov atom. U spektru HMBC nova metilna skupina korelira s karbonilnim ugljikovim atomom C-29 pri 175,1 ppm (Dodatak, slika D92). Budući da se tijekom sinteze makrozona položaj 2'OH na desozaminu zaštićuje acetatnom skupinom, zaključeno je da opisani signali pripadaju acetatnoj skupini vezanoj na položaj 2'OH te da je spoj **4''-16-g** acetilirani makrozon. Predložena struktura spoja **4''-16-g** prikazana je na slici 68b.

Spektri ^1H NMR spojeva **4''-16-c** i **4''-16-f** preklapaju se sa spektrom ^1H NMR makrozona **4''-16** (slika 69). Spektri masa izoliranih spojeva sadrže signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 1095 (Dodatak, slike D93 – D94) što odgovara molekulkovoj masi makrozona **4''-16** pa se može zaključiti da se radi o diastereomerima. Zbog vrlo male mase izoliranih spojeva **4''-16-c** (0,18 mg) i **4''-16-f** (0,40 mg) nije bilo moguće snimiti spektre NOESY kako bi se odredilo o kojim se diastereomerima radi. Spektri COSY, HSQC i HMBC spoja **4''-16-f** nalaze se u Dodatku, slike D95 – D97.

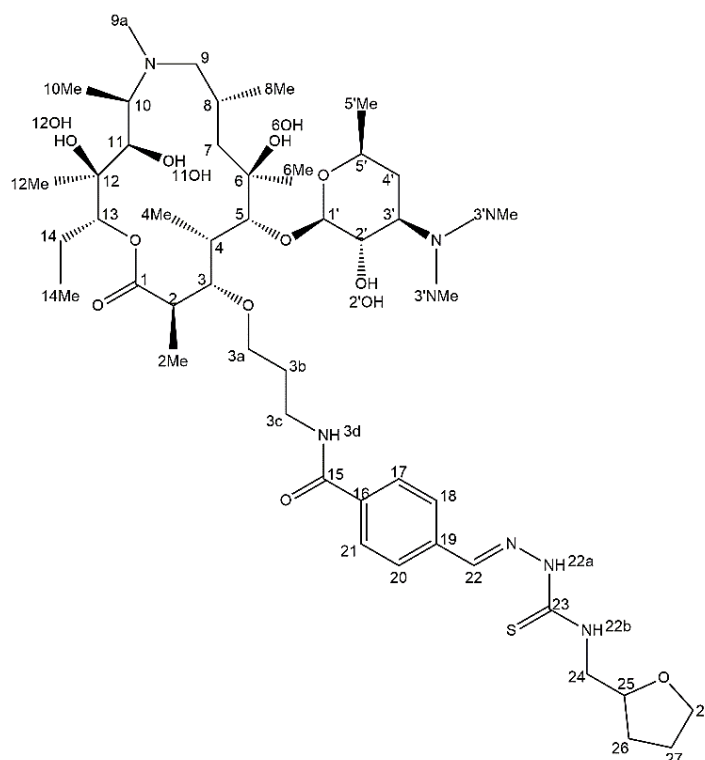


Slika 69. Usporedba spektara ^1H NMR izoliranog makrozona **4''-16** (plavo), spoja **4''-16-c** (zeleno) i spoja **4''-16-f** (crveno)

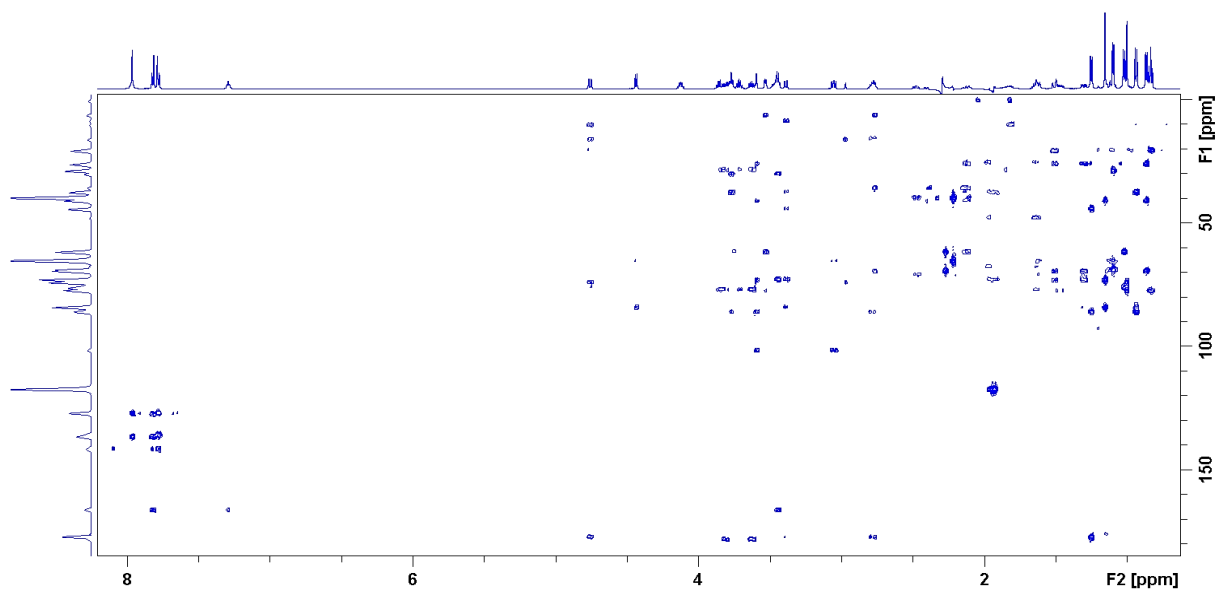
4.3.5. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-16

Makrozon **3-16** (slika 70) uspješno je ekstrahiran iz reakcijske smjese višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbens C18. Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika analit je eluiran u cjevčicu NMR, snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR, te spektar masa. Polazne tvari za sintezu makrozona **3-16** su tetrahidrofurfuril tiosemikarbazid, 3-(γ -aminopropil) derivat azitromicina, HATU i DIPEA. Spektri NMR prekursora 3-(γ -aminopropil) azitromicina prikazani su u Dodatku, slike D98 – D100. U spektru ^1H NMR spoja **3-16** (Dodatak, slika D101) karakterističan signal je triplet pri 7,29 ppm koji odgovara protonu –NH iz amidne veze (H-3d, slika 70) nastale reakcijom amidacije (slika 51c). U spektru ^1H NMR makrozona **3-16** izostaju signali H-1" do H-5"Me jer, za razliku od makrozona **9a-16** i **4"-16**, makrozon **3-16** ne sadrži šećernu jedinicu kladinozu.

U spektru HMBC spoja **3-16** (slika 71) protoni H-3d i H-3c (3,44 ppm) koreliraju s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 166,3 ppm što dodatno potvrđuje da u spoju postoji amidna veza. U spektru ^1H NMR makrozona **3-16** također je karakterističan singlet pri 7,96 ppm koji odgovara protonu H-22 iz imino veze tiosemikarbazidnog dijela molekule. Proton H-22 u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomima C-18 i C-20 iz benzenskog prstena pri 127,1 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom C-19 pri 136,7 ppm.

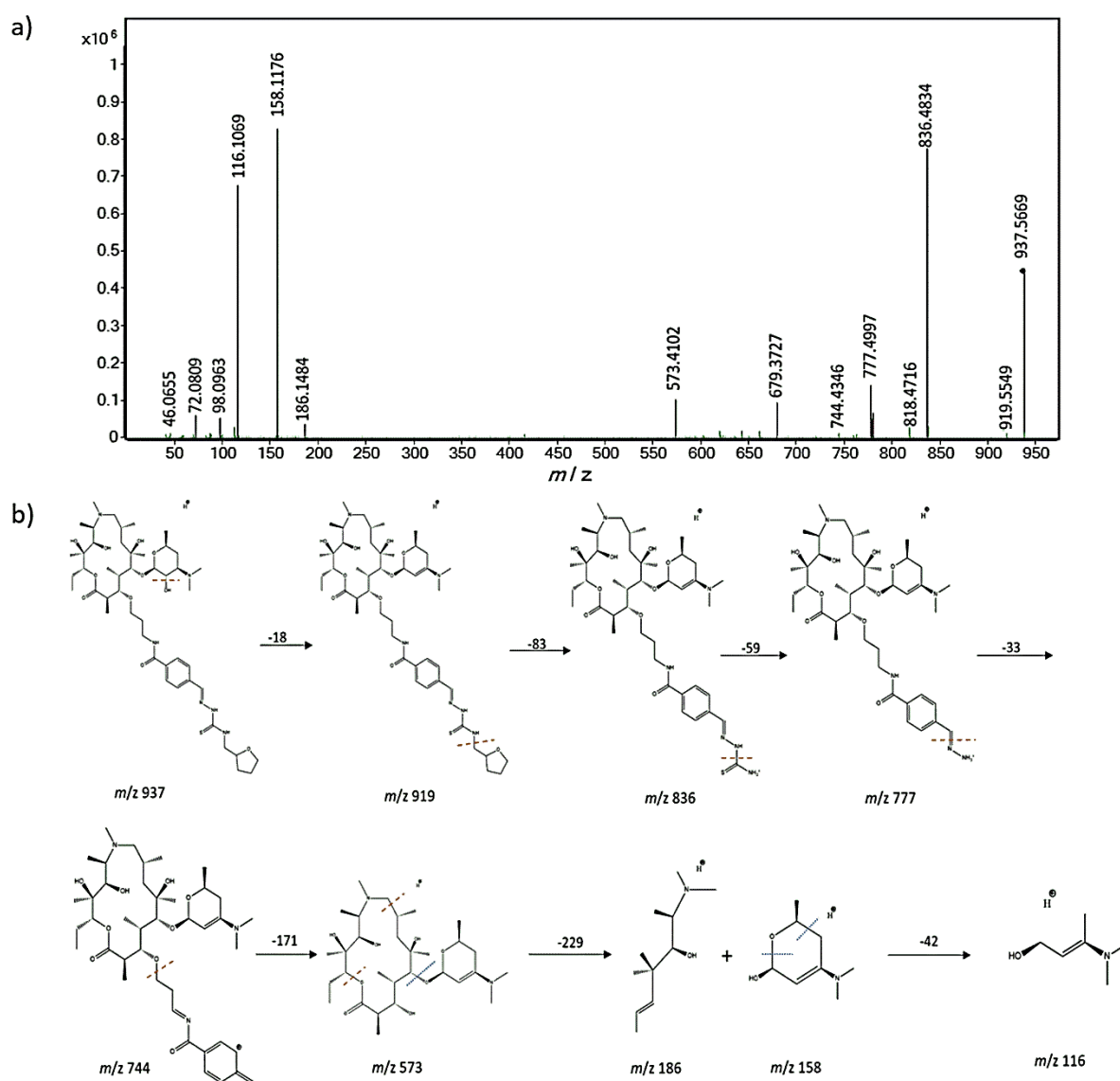


Slika 70. Struktura makrozona **3-16** s pobrojanim atomima ugljika



Slika 71. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC makrozona **3-16** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

U spektru COSY (Dodatak, slika D102) vidljive su korelacije protona H-22b pri 7,97 ppm s protonima metilenske skupine H-24 (3,81; 3,63 ppm). U području od 0,83 ppm do 4,75 ppm nalaze se svi signali makrolaktonskog prstena i desozamina. Spektar masa makrozona **3-16** snimljen uz pozitivnu ionizaciju (Dodatak, slika D103) pokazuje signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M}+\text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 937, što odgovara molekulknoj masi makrozona **3-16** koja je 936 Da. Na slici 72a prikazan je spektar MS/MS makrozona **3-16** na temelju kojeg je predložen fragmentacijski put makrozona **3-16** (slika 72b).¹²⁸



Slika 72. a) Spektar MS/MS i b) predloženi fragmentacijski put makrozona **3-16**

Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **3-16** u deuteriranom acetonitrilu prikazani su u tablici 29.

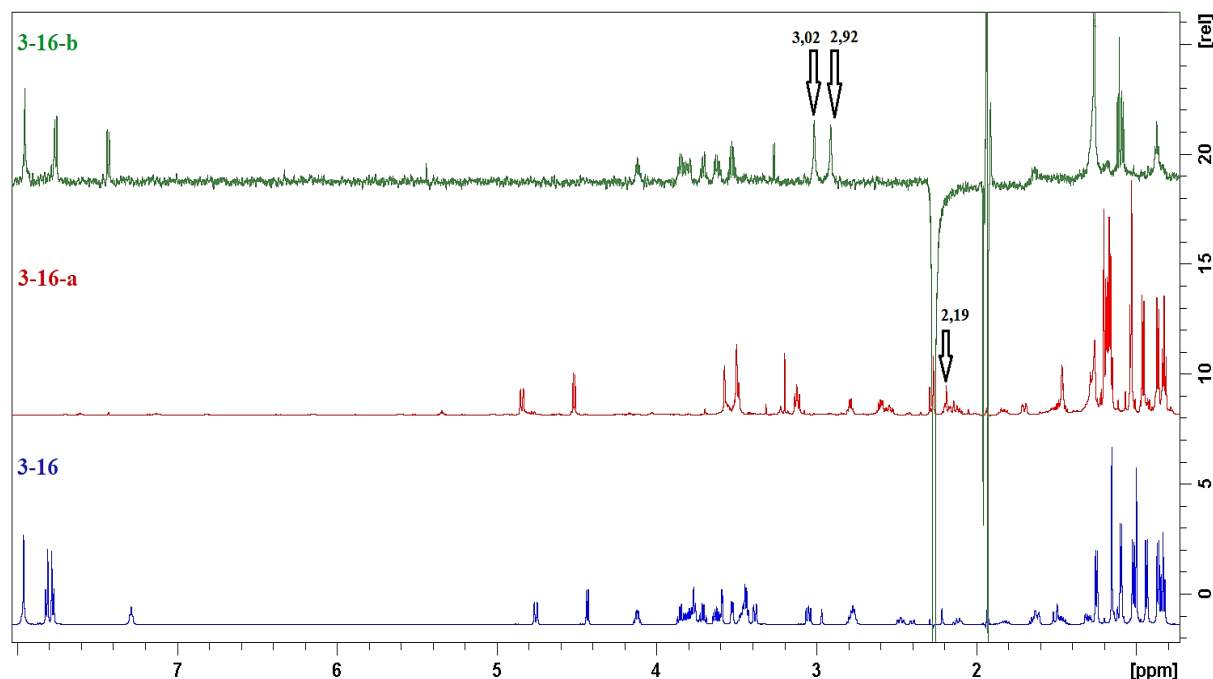
Tablica 29. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **3-16** u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm	Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm
1	-	177,3	17; 21	7,82	127,5
2	2,78	44,3	18; 20	7,78	127,1
2Me	1,25	15,6	19	-	136,7
3	3,39	86,0	22	7,96	141,5
4	2,10	37,5	22a	*	-
4Me	0,94	8,64	22b	7,97	-
5	3,59	84,2	23	-	178,2
6	-	73,0	24	3,81; 3,63	47,8
6Me	1,15	26,2	25	4,13	77,0
6OH	*	-	26	1,97; 1,63	28,4
7eq; 7ax	1,51; 1,30	41,1	27	1,88	25,4
8	1,84	26,1	28	3,85; 3,71	67,7
8Me	0,86	20,8	1'	4,43	101,6
9eq; 9ax	2,40; 2,12	69,5	2'	3,05	70,8
9a-N	2,28	35,8	2'OH	*	-
10	2,76	61,7	3'	2,48	65,3
10Me	1,02	6,4	3'NMe₂	2,22	39,7
11	3,53	76,0	4'eq; 4'ax	1,62; 1,11	29,0
11OH	2,16	-	5'	3,47	68,9
12	-	74,1	5'Me	1,09	20,6
12Me	1,00	16,2	3a	3,77	72,8
12OH	2,97	-	3b	1,94	30,1
13	4,75	77,4	3c	3,44	37,6
14eq; 14ax	1,81; 1,47	20,7	3d	7,29	-
14Me	0,83	10,4			
15	-	166,3			
16	-	135,9			

* nije opaženo

Iz uzorka reakcijske smjese **3-16** uspješno je izolirano šest komponenata, a to su: **3-16-a** (udio 22,3 %), **3-16-b** (udio 7,32 %), **3-16-c** (udio 13,6 %), **3-16-d** (udio 1,45 %), **3-16-e** (udio 6,78 %) i **3-16-f** (udio 2,04 %).

Usporedbom spektara ^1H NMR makrozona **3-16**, spojeva **3-16-a** i **3-16-b** (slika 73) može se uočiti da su u spektru spoja **3-16-a** vidljivi signali makrolaktonskog prstena, a signali tiosemikarbazonskog dijela molekule izostaju, dok je u spektru spoja **3-16-b** obrnuto.

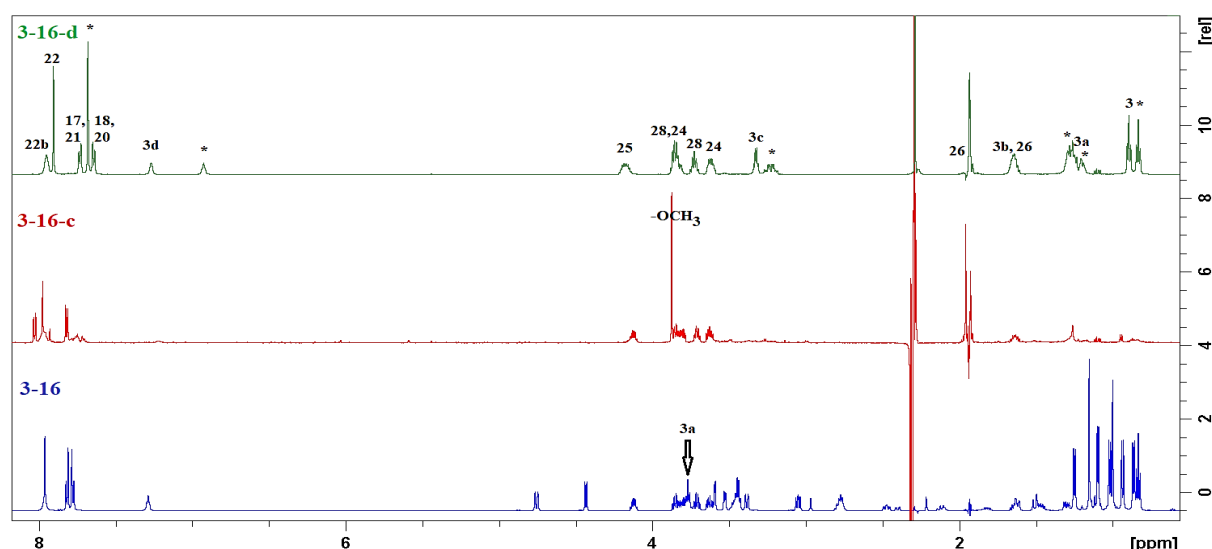


Slika 73. Usporedba spektara ^1H NMR makrozona **3-16** (plavo) te spoja **3-16-a** (crveno) i **3-16-b** (zeleno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Detaljnijom analizom spektra ^1H NMR spoja **3-16-a** te njegovom usporedbom sa spektrom ^1H NMR za 3-(γ -aminopropil) derivat azitromicina (slika 74) vidljivo je da u spektru onečišćenja nedostaju signali aminopropilnog lanca, H-3a do H-3c, te da se pri 2,19 ppm pojavljuje novi singlet koji bi mogao odgovarati metilnoj skupini vezanoj na karbonilni ugljikov atom. Spektar COSY prikazan je u Dodatku, slika D104. Budući da se tijekom sinteze prekursora položaj 2'OH na desozaminu zaštićuje acetatnom skupinom, zaključeno je da opisani signali pripadaju acetatnoj skupini vezanoj na položaj 2'OH. U spektru masa spoja **3-16-a** vidljiv je signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 633 (Dodatak, slika D105). Na temelju prikupljenih podataka predložena je struktura spoja **3-16-a** (slika 75a).

U spektru ^1H NMR spoja **3-16-b** (slika 73), osim signala tiosemikarbazonskog dijela molekule H-15 do H-28, vidljiva su dva singleta pri 3,02 ppm, odnosno 2,92 ppm. Prema kemijskim pomacima novih signala pretpostavljeno je da se radi o magnetski neekvivalentnim metilnim skupinama vezanima na dušikov atom. Spektar masa onečišćenja **3-16-b** snimljen uz pozitivnu, odnosno negativnu ionizaciju, sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 335, odnosno signal deprotoniranog molekulskog iona $[\text{M} - \text{H}]^-$ pri vrijednosti m/z 333 (Dodatak, slika D106). Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da se radi o sekundarnom amidu čija je molekulska masa 334 Da. Predložena struktura spoja **3-16-b** prikazana je na slici 75b.

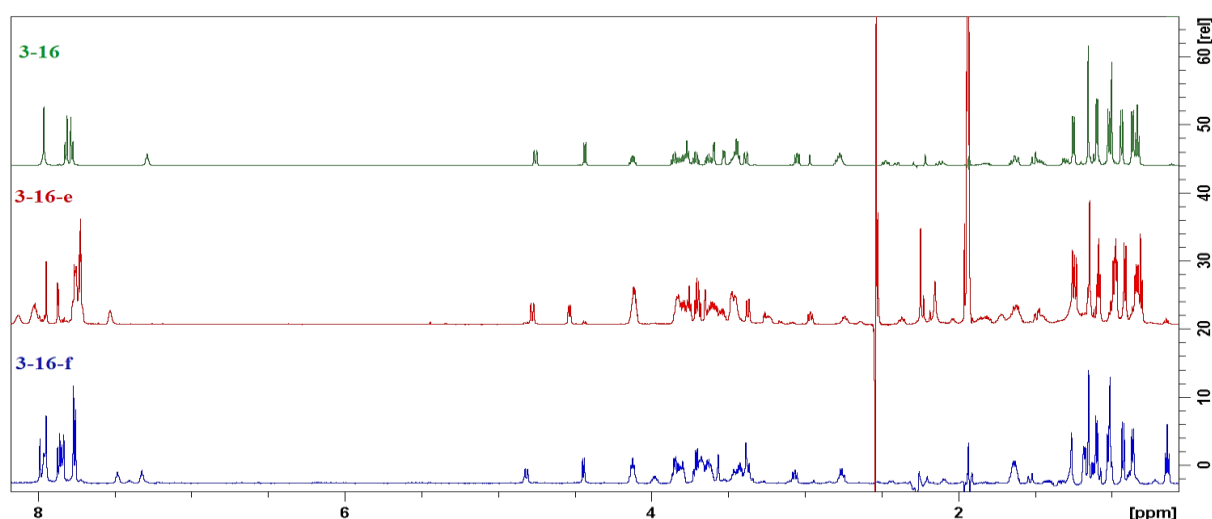
Spektri ^1H NMR spojeva **3-16-c** i **3-16-d** također su uspoređeni sa spektrom ^1H NMR makrozona **3-16** (slika 76). U spektru spoja **3-16-c** vidljivi su signali tiosemikarbazonskog dijela molekule, dok signali makrolaktonskog prstena i aminopropilnog lanca izostaju. Također je uočen novi singlet pri 3,88 ppm koji u spektru HSQC korelira kroz jednu vezu s ugljikovim atomom pri 51,8 ppm (Dodatak, slika D107), a u spektru HMBC s karbonilnim ugljikovim atomom pri 166,5 ppm (Dodatak, slika D108) što odgovara metoksi-skupini. Spektar masa spoja **3-16-c** sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 322 (Dodatak, slika D109). Na temelju prikupljenih podataka može se zaključiti da je spoj **3-16-c** metilni ester kiseline koja se koristi u sintezi makrozona **3-16**, a molekulska masa mu je 321 Da. Struktura spoja **3-16-c** prikazana je na slici 75c. Analogni podaci dobiveni su za spoj **9a-1-c** izoliran iz reakcijske smjese makrozona **9a-1** i opisan u poglavlju 4.3.2.



Slika 76. Usporedba spektara ^1H NMR makrozona **3-16** (plavo) te spojeva **3-16-c** (crveno) i **3-16-d** (zeleno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K. Zvezdicom su označeni signali nepoznate komponente

U spektru ^1H NMR spoja **3-16-d** zabilježena su dva seta signala označena brojevima, odnosno zvjezdicama, na slici 76 (spektar zelene boje). Detaljnijom analizom signala označenih brojevima te njihovom usporedbom sa spektrom ^1H NMR makrozona **3-16** (slika 76, spektar plave boje) uočeno je da se u spektru izoliranog spoja nalaze svi signali tiosemikarbazonkog dijela molekule, kao i aminopropilnog lanca H-3d do H-3b, međutim nedostaje signal metilenske skupine H-3a pri 3,77 ppm, koji je sada značajno odsjenjen i nalazi se pri 1,25 ppm. Spektar COSY spoja **3-16-d** (Dodatak, slika D110) jasno pokazuje da u molekuli postoji dodatna korelacija atoma H-3a s novom metilnom skupinom H-3 pri 0,90 ppm. Spektar masa spoja **3-16-d** sadrži signal pri vrijednosti m/z 363 (Dodatak, slika D111) što odgovara masi od 362 Da. Predložena struktura spoja **3-16-d** i prikazana je na slici 75d.

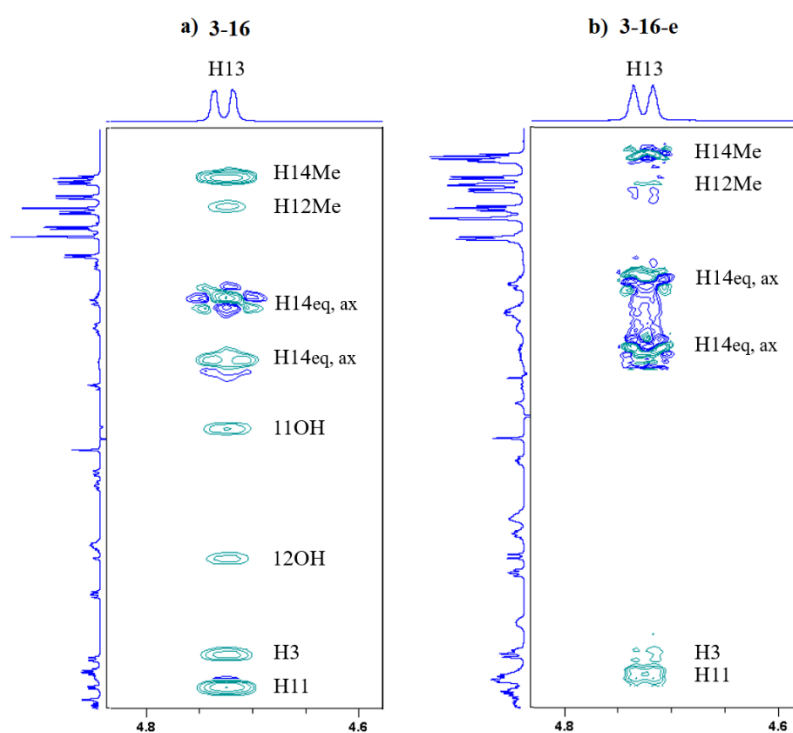
Na slici 77 prikazani su spektri ^1H NMR izoliranih spojeva **3-16-e** i **3-16-f** u usporedbi sa spektrom ^1H NMR makrozona **3-16**.



Slika 77. Usporedba spektara ^1H NMR makrozona **3-16** (zeleno) te spojeva **3-16-e** (crveno) i **3-16-f** (plavo) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Analiza jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR, kao i spektara masa onečišćenja **3-16-e** i **3-16-f**, upućuje na nastajanje dijastereomera makrozona **3-16**. Spektari COSY, HSQC, HMBC te spektar masa spoja **3-16-e** prikazani su u Dodatku (slike D112 – D115). Spektari COSY i HSQC te spektar masa spoja **3-16-f** prikazani su u Dodatku (slike D116 – D118). Mase izoliranih spojeva bile su 2,46 mg za **3-16-e**, odnosno 0,15 mg za **3-16-f**. Uspješno je snimljen spektar NOESY za spoj **3-16-e** (Dodatak, slika D119) te je uspoređen sa spektrom NOESY makrozona **3-16** (Dodatak, slika D120). Usporedbom spektara NOESY makrozona **3-16** i spoja

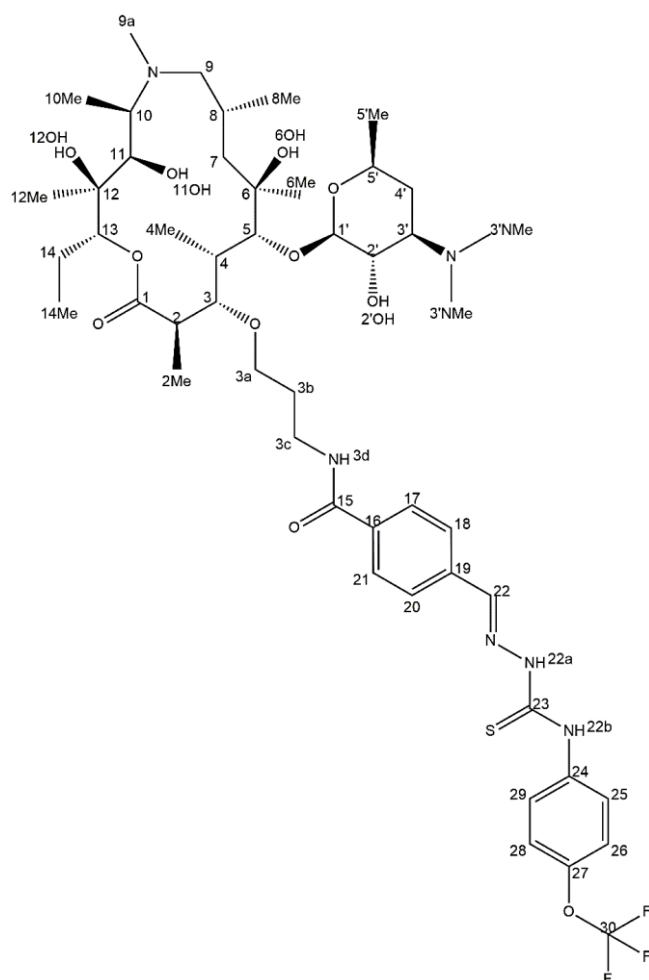
3-16-e uočena je razlika u korelacijama atoma H-13 (slika 78). U spektru NOESY spoja **3-16-e** izostaju korelacije atoma H-13 s atomima H-12OH i H-11OH, dok su navedene korelacije jasno izražene u spektru NOESY makrozona **3-16**. Nadalje, korelacije atoma H-13 s atomima H-3 i H-11 vidljive su u oba spektra. Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da je došlo do izomerije kiralnog centra C-12 u strukturi makrozona **3-16**. Predložena struktura spoja **3-16-e** prikazan je na slici 75e.



Slika 78. Uvećani prikaz spektra NOESY: a) makrozona **3-16** i b) spoja **3-16-e**

4.3.6. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-8

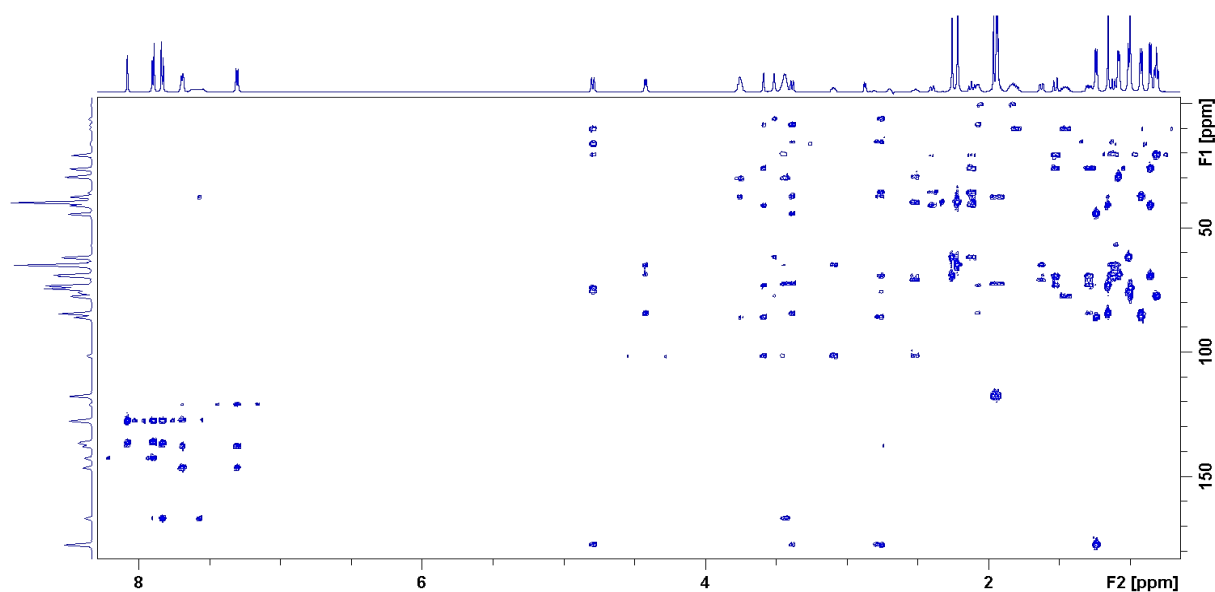
Makrozon **3-8** (slika 79) uspješno je ekstrahiran iz reakcijske smjese višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbens C18. Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika analit je eluiran u cjevčicu NMR, snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR, te spektar masa. Polazne tvari za sintezu makrozona **3-8** su 3-trifluormetoksifenil tiosemikarbazid, 3-(γ -aminopropil) derivat azitromicina, HATU i DIPEA. Spektri NMR spoja 3-trifluormetoksifenil tiosemikarbazida prikazani su u Dodatku, slike D121 – D124.



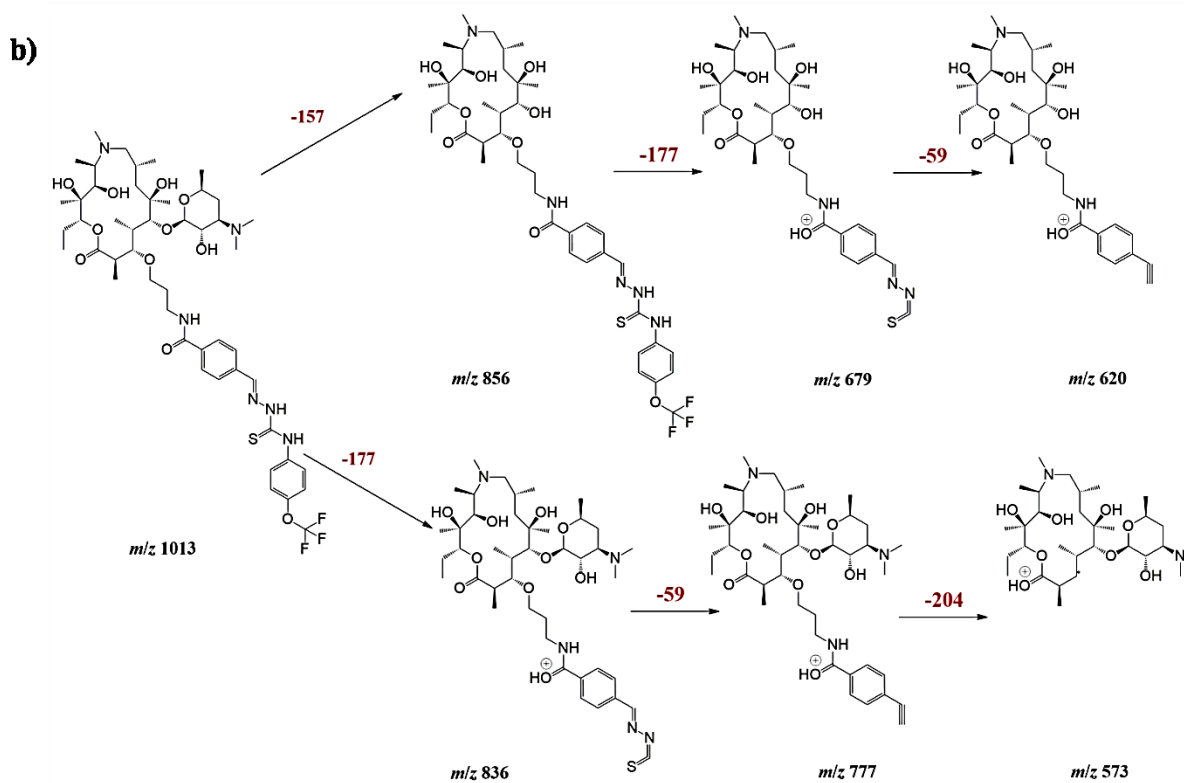
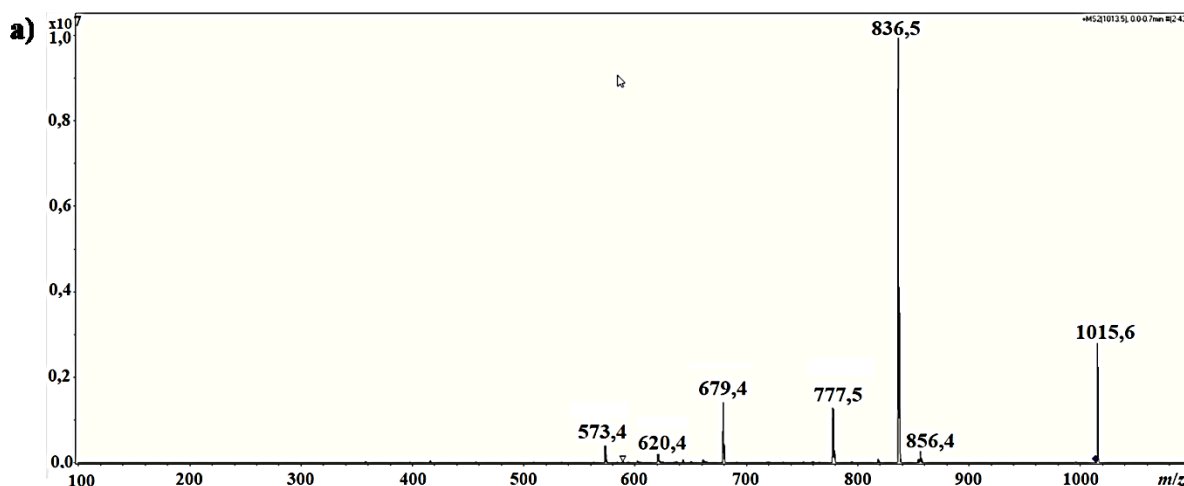
Slika 79. Struktura makrozona **3-8** s pobrojanim atomima ugljika

U spektru ^1H NMR spoja **3-8** (Dodatak, slika D125) karakterističan signal je triplet pri 7,59 ppm koji odgovara protonu $-\text{NH}$ iz amidne veze (H-3d, slika 79) nastale reakcijom amidacije (slika 51c).

U spektru ^1H NMR makrozona **3-8** izostaju signali H-1" do H-5"Me jer, za razliku od makrozona **9a-16** i **4''-16**, makrozon **3-8** ne sadrži šećernu jedinicu kladinozu. U spektru HMBC spoja **3-8** (slika 80) protoni H-3d i H-3c (3,44 ppm) koreliraju s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 166,9 ppm što dodatno potvrđuje da u spoju postoji amidna veza. U spektru ^1H NMR makrozona **3-8** također je karakterističan singlet pri 8,08 ppm koji odgovara protonu H-22 iz imino veze tiosemikarbazidnog dijela molekule. Proton H-22 u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomima C-18 i C-20 iz benzenskog prstena pri 127,6 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom C-19 pri 136,6 ppm. U području od 0,81 ppm do 4,79 ppm nalaze se svi signali makrolaktonskog prstena i desozamina. Spektar masa makrozona **3-8** snimljen uz pozitivnu ionizaciju (Dodatak, slika D126) sadrži signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M}+\text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 1013, što odgovara molekulkovoj masi makrozona **3-8** koja je 1012 Da. Na slici 81a prikazan je spektar MS/MS makrozona **3-8** na temelju kojeg je predložen fragmentacijski put makrozona **3-8** (slika 81b). Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **3-8** u deuteriranom acetonitrilu prikazani su u tablici 30.



Slika 80. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC makrozona **3-8** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.



Slika 81. a) Spektar MS/MS i b) predloženi fragmentacijski put makrozona 3-8

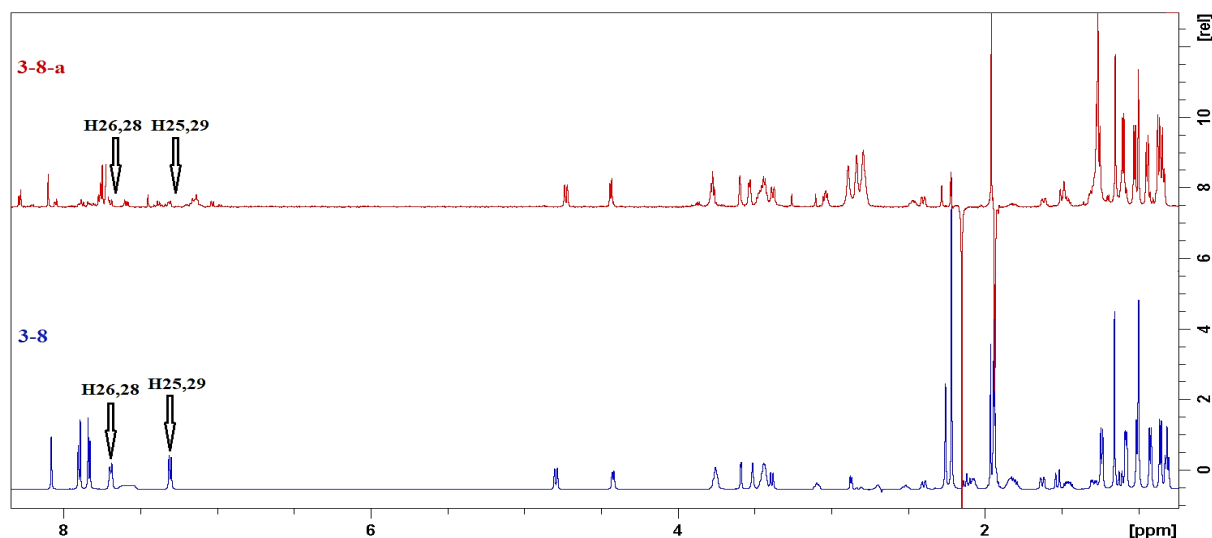
Tablica 30. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon 3-8 u deuteriranom acetonitrilu.

Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	177,3	17; 21	7,83	127,6
2	2,77	44,5	18; 20	7,90	127,6
2Me	1,24	15,5	19	-	136,6
3	3,39	85,9	22	8,08	142,7
4	2,07	37,4	22a	*	-
4Me	0,92	8,6	22b	*	-
5	3,59	84,3	23	-	*
6	-	73,2	24	-	137,8
6Me	1,16	26,0	25; 29	7,69	127,3
6OH	*	-	26; 28	7,30	121,0
7eq; 7ax	1,53; 1,29	41,0	27	-	146,5
8	1,84	26,2	30	-	121,1
8Me	0,85	20,7	1'	4,42	101,4
9eq; 9ax	2,40; 2,12	69,3	2'	3,09	71,0
9a-N	2,26	35,7	2'OH	*	-
10	2,76	61,8	3'	2,52	64,9
10Me	1,01	6,2	3'NMe ₂	2,22	39,7
11	3,51	75,7	4'eq; 4'ax	1,62; 1,12	29,5
11OH	*	-	5'	3,46	68,8
12	-	74,4	5'Me	1,08	20,5
12Me	0,99	16,3	3a	3,76	72,7
12OH	*	-	3b	1,94	30,1
13	4,79	77,5	3c	3,44	37,4
14eq; 14ax	1,82; 1,46	20,8	3d	7,57	-
14Me	0,81	10,1			
15	-	166,9			
16	-	136,0			

* nije opaženo

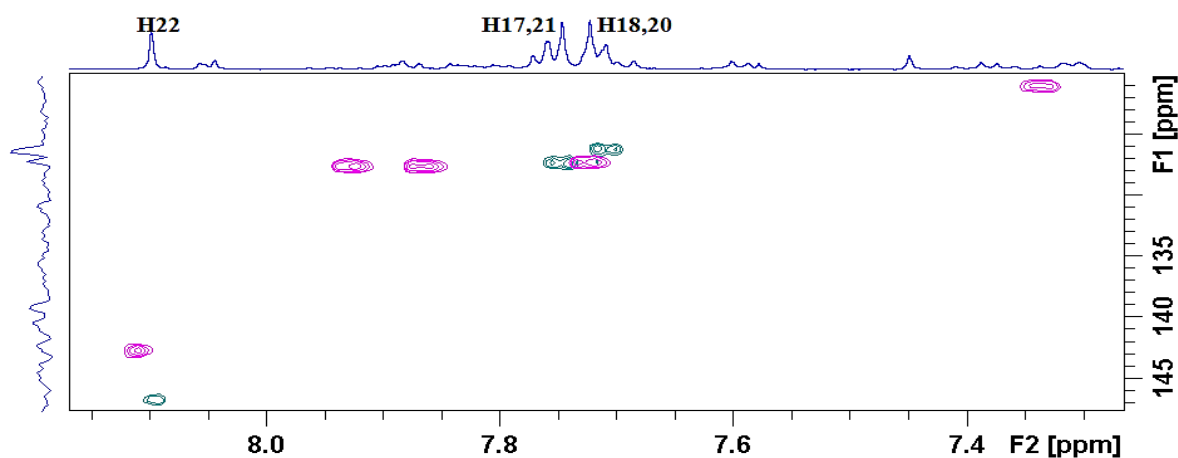
Iz uzorka reakcijske smjese **3-8** uspješno je izolirano šest komponenata, a to su: **3-8-a** (udio 2,31 %), **3-8-b** (udio 4,91 %), **3-8-c** (udio 2,76 %), **3-8-d** (udio 20,6 %), **3-8-e** (udio 3,77 %) i **3-8-f** (udio 0,24 %).

Usporedbom spektara ^1H NMR spoja **3-8-a** i makrozona **3-8** (slika 82) vidljivo je da u spektru spoja **3-8-a** nedostaju signali metinskih skupina H-25,29 i H-26,28 koje pripadaju jednom benzenskom prstenu (slika 79) te da su signali metinskih skupina H-17,21 i H-18,20 iz drugog benzenskog prstena zasjenjeniji, dok je signal iminskog protona, H-22, malo odsjenjen.



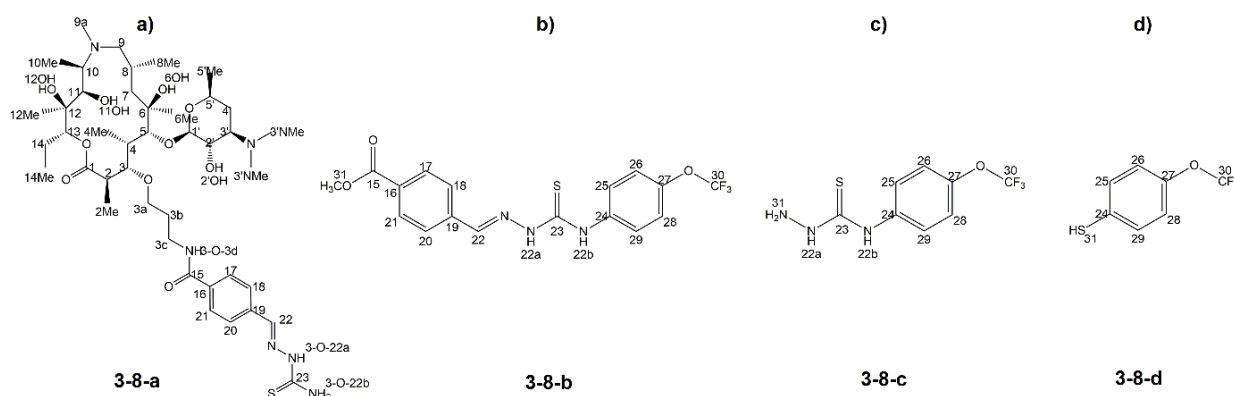
Slika 82. Usporedba spektara ^1H NMR spoja **3-8-a** (crveno) i makrozona **3-8** (plavo) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Nadalje, u spektru HSQC spoja **3-8-a** (slika 83) može se uočiti značajnije odsjenjenje atoma C-22, i to od 142,7 ppm u spektru makrozona **3-8** (signali roze boje) do 146,7 ppm u spektru izoliranog spoja (signali zelene boje). Kemijski pomak ugljikovog atoma C-17,21 nije se značajno promijenio u spektru spoja **3-8-a**, dok je signal atoma C-18,20 blago zasjenjen. U spektru HMBC spoja **3-8-a** (Dodatak, slika D127) nisu uočeni signali kvaternih ugljikovih atoma C-24 (137,8 ppm), C-27 (146,5 ppm) i C-30 (121,1 ppm) koji pripadaju skupini $-\text{CF}_3$. Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da izolirani spoj **3-8-a** ne sadrži (trifluormetoksi)benzen u svojoj strukturi.



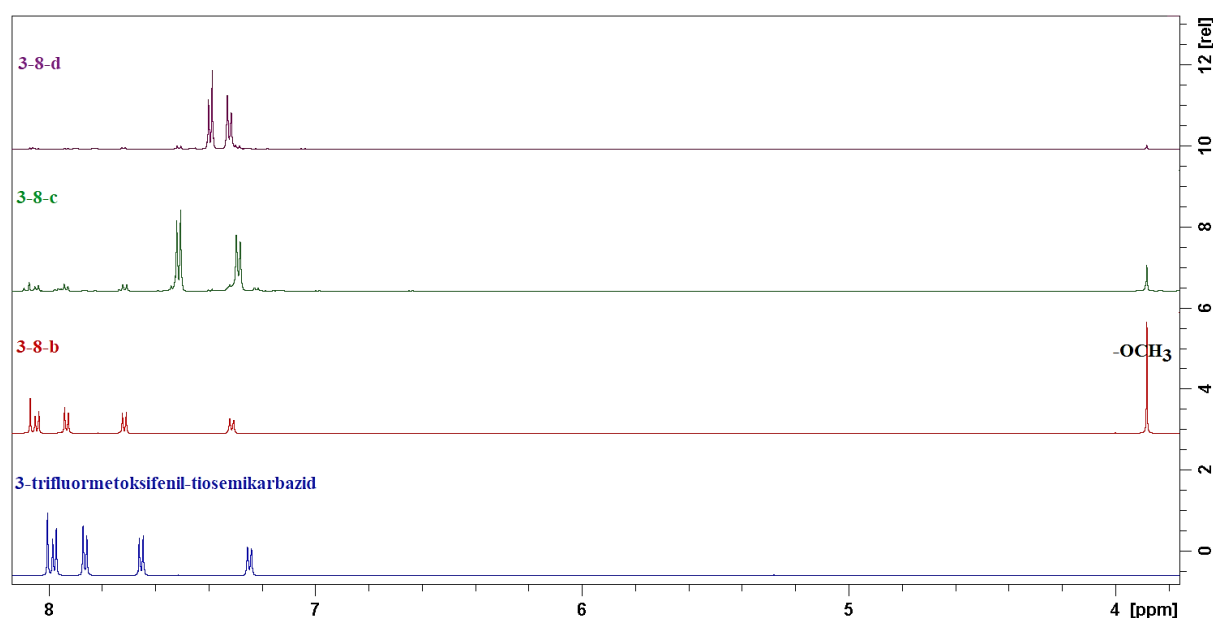
Slika 83. Uvećani prikaz spektra HSQC onečišćenja **3-8-a** (zeleni signali) i makrozona **3-8** (rozi signali) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Spektar masa spoja **3-8-a** (Dodatak, slika D128) sadrži signale pri vrijednostima m/z 892,8 i m/z 446,8 što bi odgovaralo aduktu molekule **3-8-a** s kalijem, odnosno dvostruko nabijenom ionu s kalijem, $[M/2 + K]^{2+}$. Predložena struktura spoja **3-8-a** prikazana je na slici 84a.



Slika 84. Predložene strukture spojeva: a) **3-8-a**, b) **3-8-b**, c) **3-8-c** i d) **3-8-d**

Uvidom u spektre ¹H NMR izoliranih spojeva **3-8-b**, **3-8-c** i **3-8-d** uočena je sličnost sa spektrom ¹H NMR jedne od polaznih tvari za sintezu makrozona **3-8**, a to je 3-trifluormetoksifeniltiosemikarbazid (slika 85).



Slika 85. Usporedba spektara ¹H NMR spoja 3-trifluormetoksifeniltiosemikarbazid (plavo) i spojeva **3-8-b** (crveno), **3-8-c** (zeleno) i **3-8-d** (ljubičasto) u acetonitrilu-d₃ pri 298 K

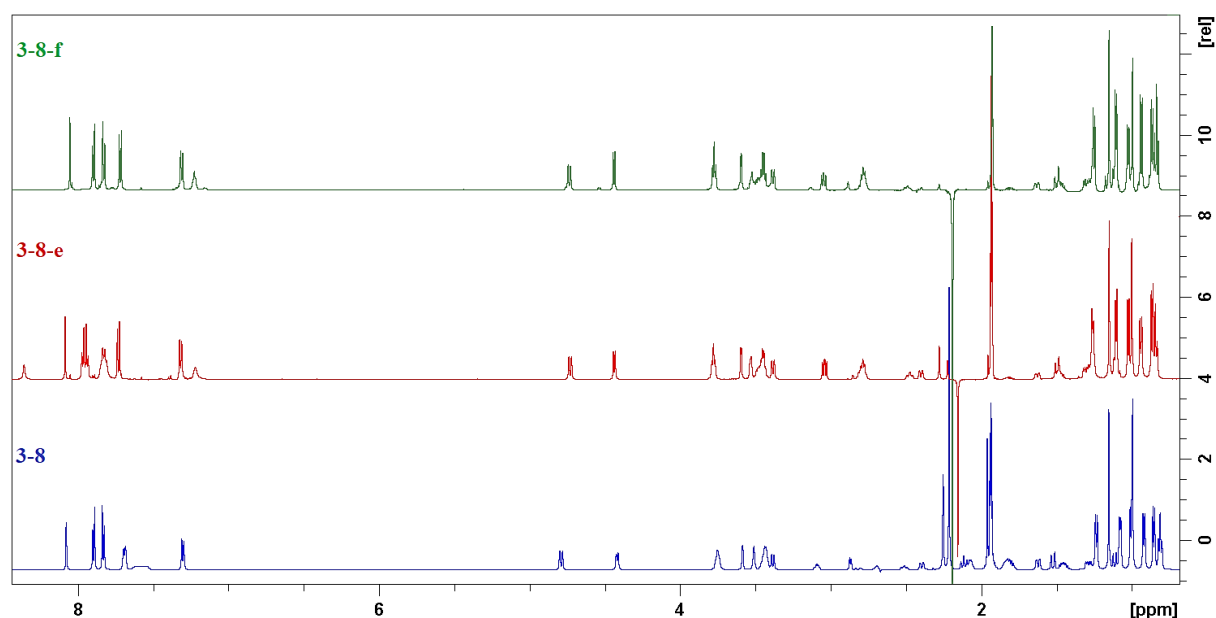
U spektru ^1H NMR spoja **3-8-b** nalazi se dodatni singlet pri 3,88 ppm koji u spektru HSQC korelira kroz jednu vezu s ugljikovim atomom pri 51,8 ppm (Dodatak, slika D129), što bi odgovaralo metoksi-skupini vezanoj na karbonilni ugljikov atom. U spektru HMBC vidljiva je korelacija metoksi-skupine s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 166,4 ppm (Dodatak, slika D130). Spektre NMR spoja **3-8-b** analogni su spektrima NMR spojeva **9a-1-c** i **3-16-c**. U spektru masa spoja **3-8-b** nalazi se signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 398. Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da se radi o metilnom esteru 3-trifluormetoksifeniltiosemikarbazida čija je molekulska masa 397 Da. Struktura spoja **3-8-b** prikazana je na slici 84b.

U spektru ^1H NMR spoja **3-8-c** nalaze se dva dubleta pri 7,51 ppm i 7,29 ppm koji u spektru HSQC koreliraju s ugljikovim atomima pri 126,8 ppm, odnosno 121,5 ppm, što je u dobrom slaganju s kemijskim pomacima atoma C-25,29 i C-26,28 u strukturi spoja **3-8-b** (slika 84b), kao i u strukturi spoja 3-trifluormetoksifeniltiosemikarbazida. U spektru su također vidljivi signali protona iz drugog benzenskog prstena, H-17,21 i H-18,20 te metoksi-skupine H-31, ali su njihovi integrali 10 puta manji od integrala protona H-25,29 i H-26,28, što znači da ne pripadaju istoj molekuli. S obzirom na multipletnost signala u spektru, može se zaključiti da se radi o 1,4-disupstituiranom benzenskom prstenu. U spektru HMBC zabilježeni su signali kvaternih ugljikovih atoma C-24 pri 137,7 ppm i C-27 pri 146,5 ppm. Budući da nema značajne promjene u kemijskim pomacima atoma H-24 do H-27, pretpostavljeno je da se radi o istim supstituentima, a to su skupina $-\text{OCF}_3$ vezana na atom C-27 i skupina $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-\text{NH}_2$ vezana na atom C-24. Dakle, spoj **3-8-c** bi mogao biti međuprodukt nastao u sintezi makrozona **3-8**. Predložena struktura spoja prikazana je na slici 84c. Skupine $-\text{NH}$ i $-\text{NH}_2$ nisu opažene u spektru zbog izmjene protona s deuterijem iz otapala korištenog za snimanje spektara NMR. Kvaterni ugljikov atom C-23 također nije opažen u ovom slučaju, kao niti u spektru makrozona **3-8**. Spektar MS spoja **3-8-c** ne sadrži signal molekuskog iona, ali sadrži mogući adukt molekule s izopropanolom i natrijem, $[\text{M} + \text{Isoprop} + \text{Na} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 335.

U spektru ^1H NMR spoja **3-8-d** nalaze se dva dubleta pri 7,39 ppm i 7,32 ppm koji u spektru HSQC koreliraju s ugljikovim atomima pri 127,52 ppm, odnosno 122,45 ppm, što je u dobrom slaganju s kemijskim pomacima atoma C-25,29 i C-26,28 u strukturi spojeva **3-8-b** i **3-8-c**, kao i u strukturi spoja 3-trifluormetoksifeniltiosemikarbazida. Stoga je pretpostavljeno da se i u ovom slučaju radi o 1,4-disupstituiranom benzenu. Međutim, u spektru HMBC spoja **3-8-d** uočeno je značajnije zasjenjenje kvaternog ugljikovog atoma C-24 (130,2 ppm) u

usporedbi sa spojem **3-8-c**, gdje je pomak istog atoma pri 137,7 ppm. Kemijski pomak drugog kvaternog ugljikovog atoma, C-27, nije se značajno promijenio te je 147,6 ppm u spektru HMBC spoja **3-8-d**, dok je u spektru spoja **3-8-c** bio pri 146,5 ppm. Na temelju navedenih podataka može se zaključiti da je jedan od supstituenata na benzenskom prstenu skupina $-\text{OCF}_3$ vezana na atom C-27, a drugi supstituent, vezan na atom C-24, bi trebala biti neka zasjenjujuća skupina, moguće $-\text{SH}$, dok bi skupine $-\text{OH}$ ili $-\text{NH}_2$ djelovale odsjenjujuće na atom C-24. Predložena struktura spoja **3-8-d** prikazana je na slici 84d.

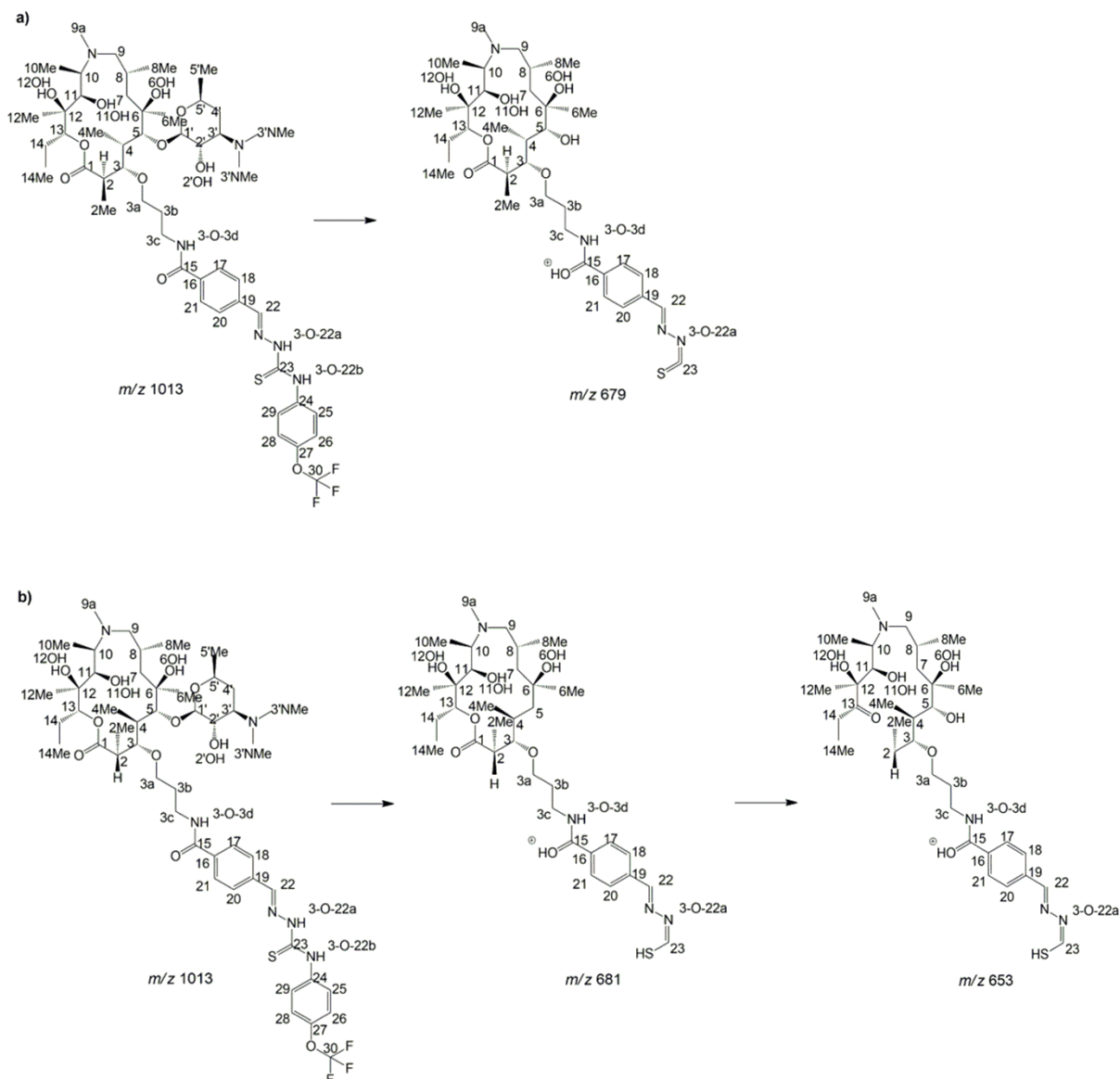
Usporedbom spektara ^1H NMR makrozona **3-8** i spoja **3-8-e**, odnosno **3-8-f**, vidljivo je da se radi o dijastereomerima (slika 86).



Slika 86. Usporedba spektara ^1H NMR makrozona **3-8** (plavo) te spojeva **3-8-e** (crveno) i **3-8-f** (zeleno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Spektri masa spojeva **3-8-e** (Dodatak, slika D131) i **3-8-f** (Dodatak, slika D132) sadrže signal protoniranog molekuskog iona $[\text{M} + \text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 1013, jednako kao u spektru masa makrozona **3-8**. Nadalje, analiza MS/MS spojeva **3-8**, **3-8-e** i **3-8-f** pokazala je sličan fragmentacijski put molekuskog iona m/z 1013 što je dodatno potvrdilo pretpostavku o postojanju dijastereomera (slika 87). Fragmentacijom molekuskog iona prvo nastaje ion-produkt vrijednosti m/z 836 prikazan na slici 87b. Daljnjom fragmentacijom nastaju ion-produkti m/z 679 u slučaju makrozona **3-8**, odnosno m/z 681 u slučaju spojeva **3-8-e** i **3-8-f**, što odgovara gubitku šećerne jedinice desozamina. U spektrima MS/MS spojeva **3-8**, **3-8-e** i **3-8-f**

uočena je razlika u intenzitetima signala navedenih iona-produkata što može upućivati na inverziju konfiguracije ugljikova atoma u šećernoj jedinici desozamina.

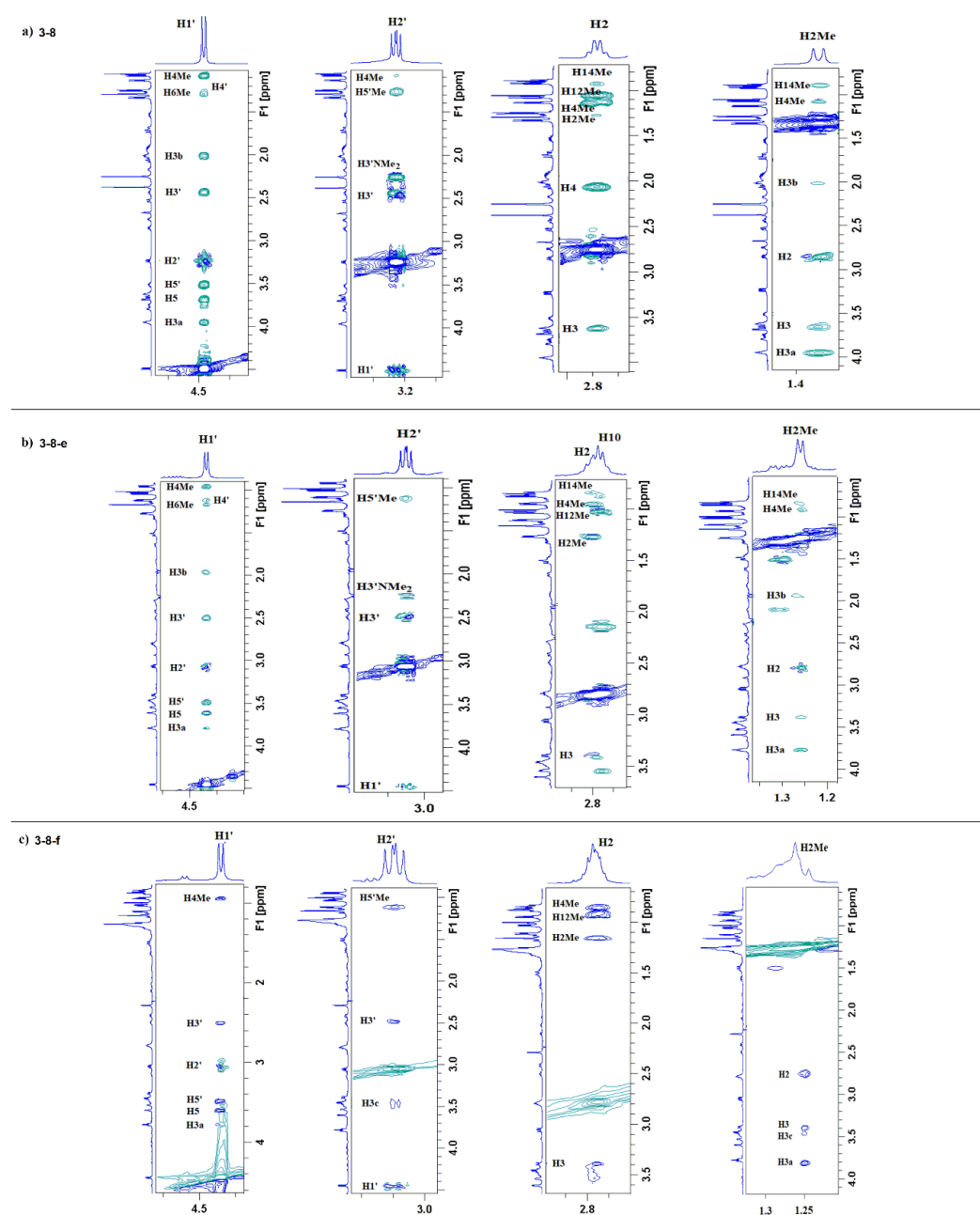


Slika 87. Fragmentacijski put na temelju spektara MS/MS: a) makrozona **3-8** i b) spoja **3-8-e**

S ciljem određivanja položaja na kojem se dogodila inverzija konfiguracije ugljikovog atoma snimljeni su spektri NOESY, te su dodatno provedeni računski eksperimenti molekulske dinamike u Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a. Analizom i usporedbom spektara NOESY spojeva **3-8**, **3-8-e** i **3-8-f** uočene su razlike križnih signala NOE (engl. *NOE cross peaks*) za protone H-2, H-2Me, H-1' i H-2' (slika 88). Križni signali ostalih protona bili

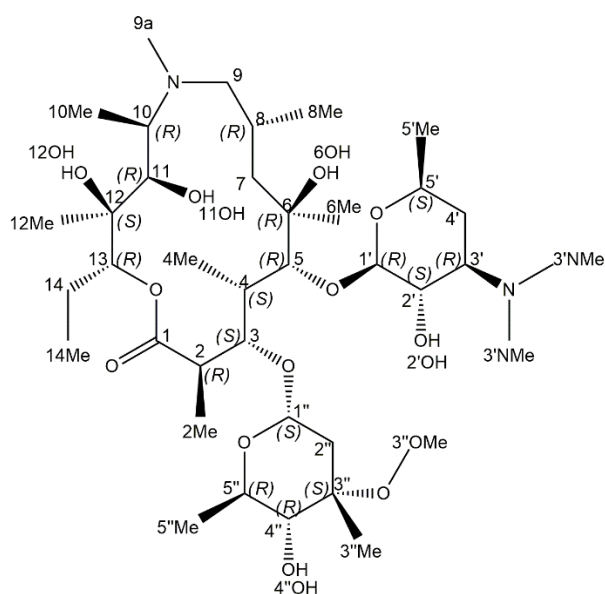
su gotovo preklapljeni kod sva tri spoja, te je stoga pretpostavljeno da se inverzija konfiguracije dogodila na položajima C-2, C-2' i C-1'.

Križni signal H2-H14Me vidljiv je u spektrima spojeva **3-8** i **3-8-e**, dok u spektru spoja **3-8-f** izostaje. Nadalje, proton H-2Me korelira s protonima H14 i H-4Me kod spojeva **3-8** i **3-8-e**, dok u spektru spoja **3-8-f** navedena korelacija nije uočena. Križni signali NOE protona H-1' bili su isti za izomere **3-8** i **3-8-e**, dok je kod izomera **3-8-f** korelacija H-1' s protonima H-6Me i H-3b izostala.



Slika 88. Izolirani dijelovi spektra NOESY spoja: a) **3-8**, b) **3-8-e** i c) **3-8-f** za atome H-1', H-2', H-2 i H-2Me

Literaturno je poznato da je konfiguracija ugljikovih atoma C-2, C-2' i C-1' u azitromicinu (*R*), (*S*) i (*R*) (slika 89), te je stoga isto očekivano za spoj **3-8**. Rezultati računskih simulacija molekulske dinamike pokazali su da je za konfiguraciju (*R*) na položaju C-2 prosječna udaljenost između atoma H-2 i H-14Me oko 4,2 nm, dok je za konfiguraciju (*S*) oko 5,2 nm. Na temelju ovih podataka može se zaključiti da će u slučaju konfiguracije (*R*) križni signal H2-H14Me biti vidljiv, dok će u slučaju konfiguracije (*S*) izostati. Sukladno rezultatima za spojeve **3-8** i **3-8-e** na položaju C-2 predložena je konfiguracija (*R*), a za spoj **3-8-f** konfiguracija (*S*). Nadalje, korelacija atoma H-2Me s H-14Me i H-4Me uočena je kod spojeva **3-8** i **3-8-e**, dok u slučaju spoja **3-8-f** korelacija izostaje što dodatno potvrđuje predloženu konfiguraciju.



Slika 89. Apsolutna konfiguracija azitromicina

U slučaju konfiguracije (*S*) na položaju C-2' računске simulacije pokazuju da je udaljenost između atoma H-2' i H-4Me oko 4,4 nm, što bi trebalo značiti da će i križni signal NOE u spektru biti vrlo slabog intenziteta. Ovakav signal uočen je u spektru spoja **3-8**, dok u spektrima spojeva **3-8-e** i **3-8-f** izostaje. Stoga je za spoj **3-8** na položaju C-2' predložena konfiguracija (*S*), a za druga dva diastereomera konfiguracija (*R*). Dodatno, u spektru spoja **3-8-f** vidljiva je korelacija atoma H-2' i H-3c, dok ona izostaje u spektrima spojeva **3-8** i **3-8-e**.

Sukladno računskim simulacijama, za konfiguraciju (*R*) na položaju C-1' karakteristična je udaljenost između atoma H-1' i H-6Me oko 3,6 nm što bi u spektru NOESY trebao biti signal jakog intenziteta. Upravo je navedena korelacija vidljiva u spektrima spojeva **3-8** i **3-8-e**, te je za ove izomere na položaju C-1' predložena konfiguracija (*R*), dok spoj **3-8-f** ima konfiguraciju

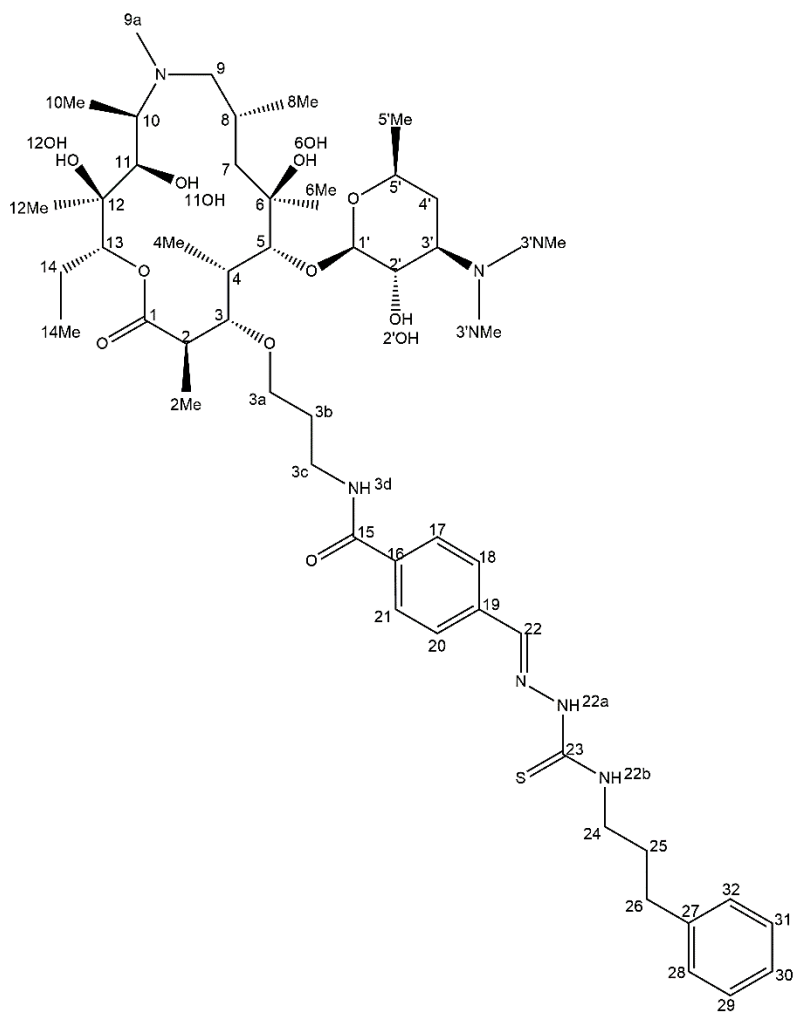
(S). Dodatno, korelacija između atoma H-1' i H-3b potkrepljuje navedene zaključke. U tablici 31 prikazane su predložene apsolutne konfiguracije atoma C-2, C-1' i C-2' za izomere **3-8**, **3-8-e** i **3-8-f**.

Tablica 31. Apsolutne konfiguracije atoma C-2, C-1' i C-2' u strukturama izomera makrozona 3-8.

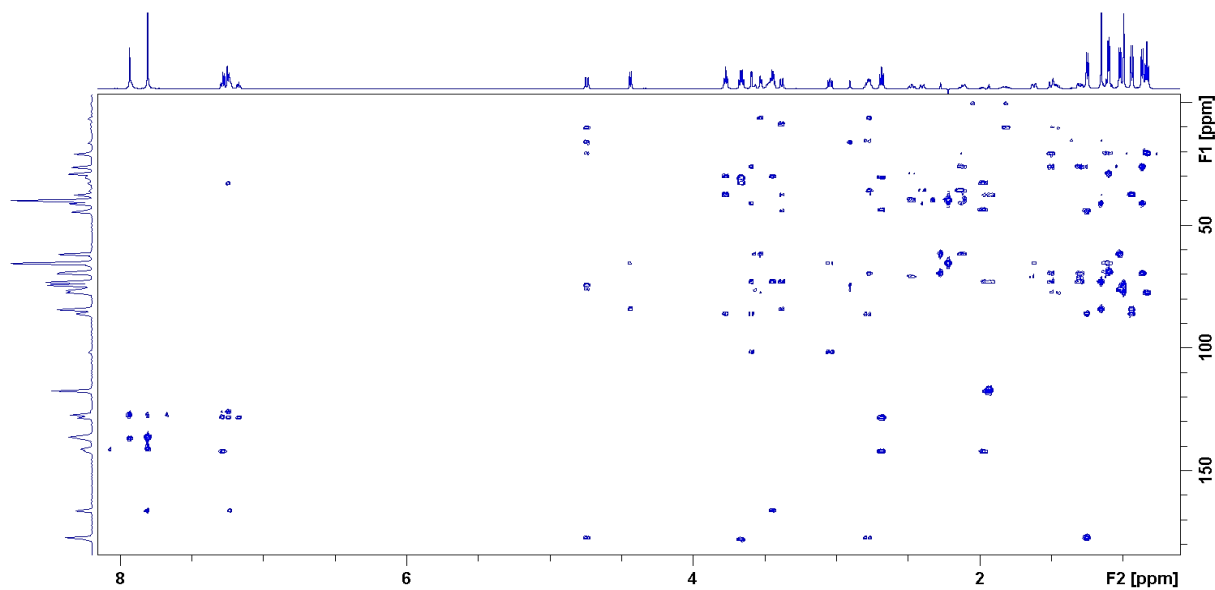
Izomer	Atom		
	C-2	C-1'	C-2'
3-8	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
3-8-e	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
3-8-f	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>

4.3.7. Analiza reakcijske smjese makrozona 3-9

Makrozon **3-9** uspješno je ekstrahirano iz reakcijske smjese višestrukim ukoncentriravanjem na SPE-sorbens C18 (slika 90). Nakon sušenja SPE-sorbensa u struji dušika analit je eluiran u cjevčicu NMR, snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR, te spektar masa. Polazne tvari za sintezu makrozona **3-9** su 3-fenilpropil tiosemikarbamid, 3-(γ -aminopropil) derivat azitromicina, HATU i DIPEA. Spektri NMR spoja 3-fenilpropil tiosemikarbamida prikazani su u Dodatku, slike D133 – D136. U spektru ^1H NMR spoja **3-9** (Dodatak, slika D137) karakterističan signal je triplet pri 7,24 ppm koji odgovara protonu –NH iz amidne veze (H-3d, slika 90) nastale reakcijom amidacije (slika 51c). U spektru ^1H NMR makrozona **3-9** izostaju signali H-1" do H-5"Me jer, za razliku od makrozona **9a-16** i **4"-16**, makrozon **3-9** ne sadrži šećernu jedinicu kladinozu. U spektru HMBC spoja **3-9** (slika 91) protoni H-3d i H-3c, čiji je kemijski pomak 3,44 ppm, koreliraju s karbonilnim ugljikovim atomom C-15 pri 166,3 ppm što dodatno potvrđuje da u spoju postoji amidna veza. U spektru ^1H NMR makrozona **3-9** također je karakterističan singlet pri 7,93 ppm koji odgovara protonu H-22 iz imino veze tiosemikarbamidnog dijela molekule. Proton H-22 u spektru HMBC korelira s ugljikovim atomima C18 i C20 pri 127,3 ppm te s kvaternim ugljikovim atomom C19 pri 136,8 ppm. U području od 0,83 ppm do 4,74 ppm nalaze se svi signali makrolaktonskog prstena i desozamina. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon **3-9** u deuteriranom acetonitrilu prikazani su u tablici 32. Spektar masa makrozona **3-9** snimljen uz pozitivnu ionizaciju sadrži signal protoniranog molekulskog iona $[\text{M}+\text{H}]^+$ pri vrijednosti m/z 971,6, što odgovara molekulskoj masi makrozona **3-9** od 970,6 Da.



Slika 90. Struktura makrozona 3-9 s pobrojanim atomima ugljika



Slika 91. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC makrozona 3-9 u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Tablica 31. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR za makrozon 3-9 u deuteriranom acetonitrilu.

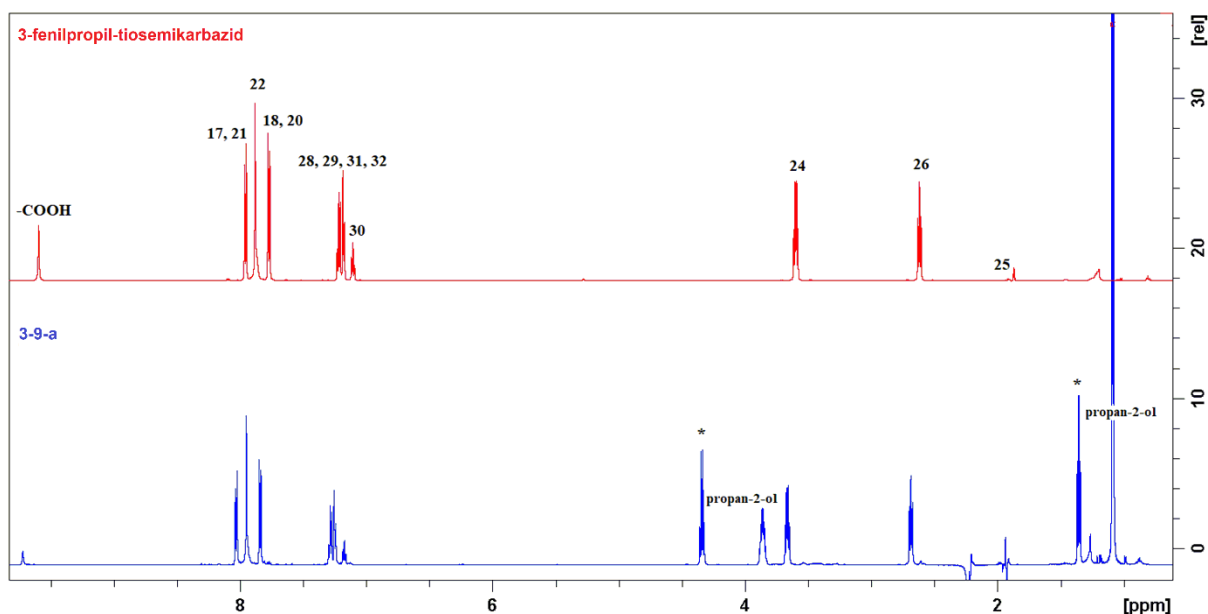
Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm	Atom	δ (^1H) / ppm	δ (^{13}C) / ppm
1	-	177,5	17; 21	7,81	127,3
2	2,77	44,2	18; 20	7,81	127,3
2Me	1,25	15,6	19	-	136,8
3	3,38	86,1	22	7,93	141,3
4	2,11	37,5	22a	*	-
4Me	0,94	8,5	22b	7,92	-
5	3,59	84,1	23	-	178,0
6	-	-	24	3,66	43,8
6Me	1,15	26,1	25	1,98	30,5
6OH	*	-	26	2,68	32,7
7eq; 7ax	1,50; 1,30	41,1	27	-	142,2
8	1,84	26,1	28; 32	7,25	128,4
8Me	0,87	20,8	29; 31	7,28	128,4
9eq; 9ax	2,40; 2,12	69,5	30	7,17	125,8
9a-N	2,27	35,8	1'	4,44	101,5
10	2,77	61,7	2'	3,05	70,8
10Me	1,02	6,5	2'OH	*	-
11	3,53	76,1	3'	2,47	65,4
11OH	*	-	3'NMe ₂	2,22	39,7
12	-	74,3	4'eq; 4'ax	1,63; 1,11	28,9
12Me	0,99	16,2	5'	3,47	68,9
12OH	2,91	-	5'Me	1,10	20,7
13	4,74	77,5	3a	3,77	72,9
14eq; 14ax	1,82; 1,47	20,8	3b	1,94	30,2
14Me	0,83	10,2	3c	3,44	37,7
15	-	166,3	3d	7,24	-
16	-	136,3			

* nije opaženo

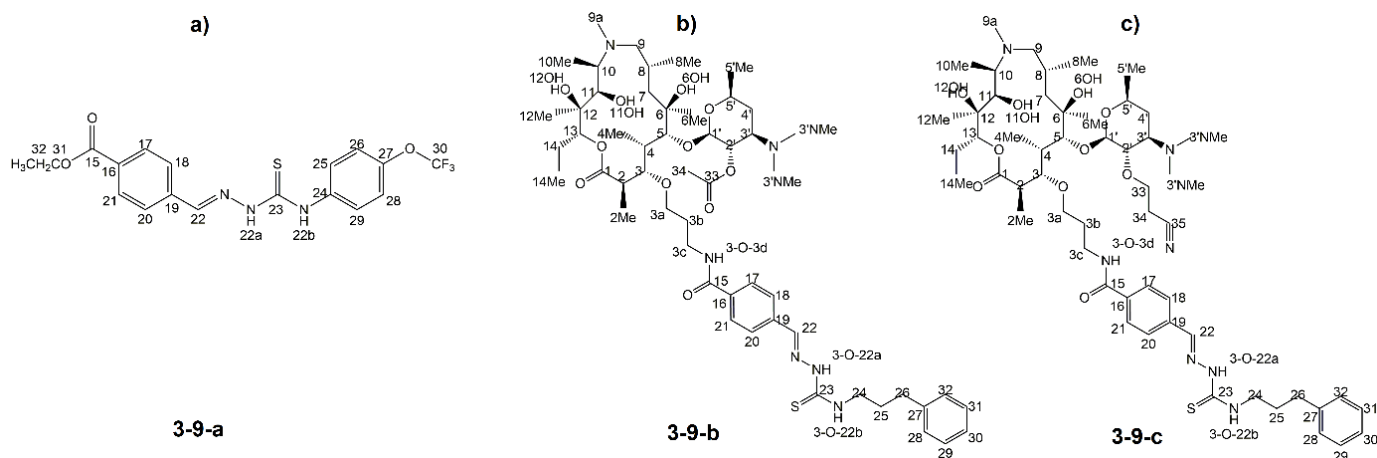
Iz uzorka reakcijske smjese makrozona 3-9 uspješno je izolirano šest komponenata, a to su: 3-9-a (udio 7,56 %), 3-9-b (udio 6,39 %), 3-9-c (udio 2,59 %), 3-9-d (udio 1,04 %), 3-9-e (udio 1,18 %) i 3-9-f (udio 1,01 %).

Usporedbom spektara ^1H NMR izoliranog spoja 3-9-a i 3-fenilpropil tiosemikarbazida može se zaključiti da je onečišćenje 3-9-a tiosemikarbazonskog porijekla (slika 92). U spektru spoja 3-9-a zabilježena su dva nova signala od kojih je jedan kvartet pri 4,34 ppm s integralom približno 2, a drugi je triplet pri 1,36 ppm s integralom približno 3. Navedena dva nova signala u međusobnoj su korelaciji u spektru COSY i čine zaseban spinski sustav (Dodatak, slika D138). U spektru HSQC signal pri 4,34 ppm korelira s ugljikovim atomom pri 61,0 ppm, a signal pri 1,36 ppm s ugljikovim atomom pri 13,5 ppm (Dodatak, slika D139). Na temelju navedenih podataka pretpostavljeno je da se radi o etilnoj skupini, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, vezanoj na heteroatom, najvjerojatnije kisik. U spektru HMBC (Dodatak, slika D140) nova metilenska

skupina korelira s kvaternim ugljikovim atomom pri 165,9 ppm koji odgovara karbonilnom ugljikovom atomu C15 u strukturi makrozona **3-9** prikazanoj na slici 78. Na temelju svega navedenoga može se zaključiti da je spoj **3-9-a** etilni ester kiseline čija je struktura prikazana na slici 93a.

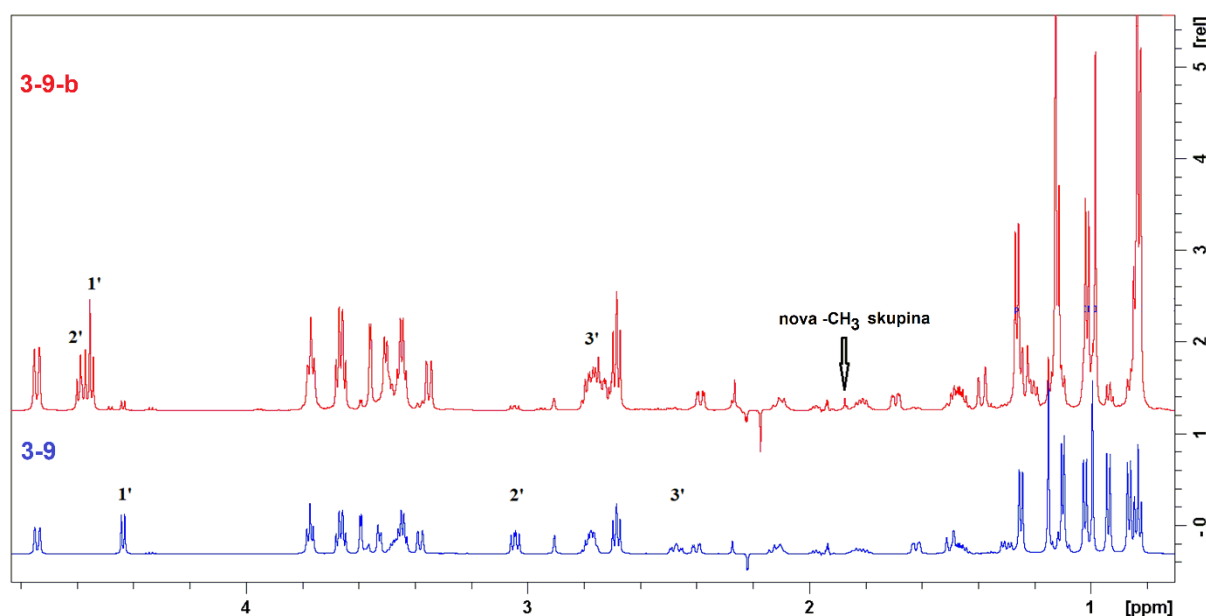


Slika 92. Usporedba spektara ^1H NMR spoja **3-9-a** (plavo) i 3-fenilpropil tiosemikarbazida (crveno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K. Brojčane oznake u spektru 3-fenilpropil tiosemikarbazida odgovaraju strukturi spoja na slici 51, dok su zvjezdicom označeni novi signali u spektru spoja **3-9-a**



Slika 93. Predložene strukture izoliranih spojeva: a) **3-9-a**, b) **3-9-b** i c) **3-9-c**

Spektar ^1H NMR izoliranog spoja **3-9-b** usporediv je sa spektrom makrozona **3-9** (slika 94). Detaljnijom analizom spektra izolirane komponente opaženo je da su signali protona H-1' i H-3' na desozaminu blago odsjenjeni, dok je proton H-2' jače odsjenjen u odnosu na pripadajući signal u spektru makrozona **3-9**. U tablici 32 prikazani su kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR desozamina (atomi 1' do 5') za spoj **3-9-b** i makrozon **3-9**. Iz tablice je vidljivo da se kemijski pomaci atoma 1' do 3' značajnije razlikuju (označeno crvenom bojom u tablici 32), dok su vrijednosti kemijskih pomaka za atome 4' i 5' gotovo nepromijenjene. Također se može opaziti da je proton H-2' u strukturi spoja **3-9-b** značajno odsjenjen, dok su ugljikovi atomi C-1' i C-3' zasjenjeni. Na temelju navedenoga pretpostavljeno je da je u strukturi spoja **3-9-b** na položaju 2' vezana acetilna skupina koja djeluje odsjenjujuće na protone H-1' – H-3'. Nadalje, u spektru ^1H NMR spoja **3-9-b** vidljiv je singlet pri 1,88 ppm koji u spektru HSQC korelira s ugljikovim atomom pri 20,5 ppm, što bi moglo odgovarati metilnoj skupini $-\text{CH}_3$ iz acetilne skupine (Dodatak, slika D141). U spektru HMBC nova metilna skupina korelira s kvaternim ugljikovim atomom pri 169,7 ppm, kao i proton H-2', što je dokaz da je na položaju 2' vezana acetilna skupina (Dodatak, slika D142). U spektru MS zabilježen je signal protoniranog molekuskog iona pri vrijednosti m/z 1013,6 što odgovara molekulknoj masi acetiliranog makrozona od 1012,6 Da (Dodatak, slika D143). U spektru MS također je vidljiv signal iona-fragmenta pri vrijednosti m/z 971,6 koji nastaje gubitkom acetaldehida, a jednak je molekulknoj masi makrozona 3-9. Predložena struktura spoja **3-9-b** prikazana je na slici 93b.

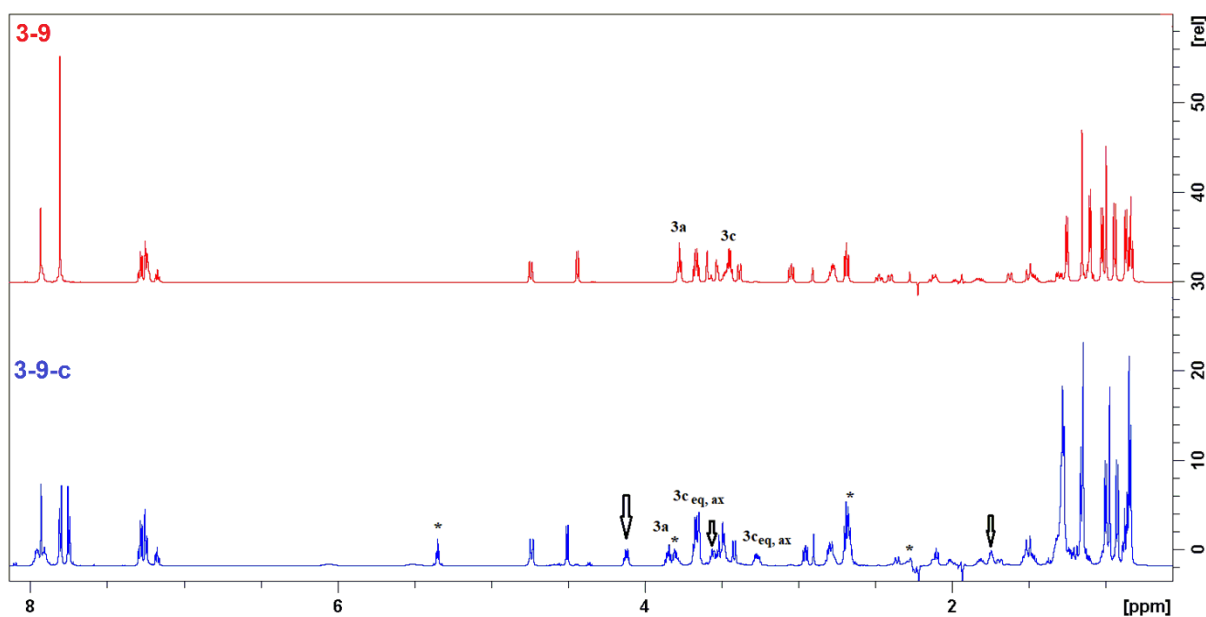


Slika 94. Usporedba spektara ^1H NMR makrozona **3-9** (plavo) i spoja **3-9-b** (crveno) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Tablica 32. Usporedba kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR za atome 1' – 5' u strukturi makrozona 3-9 i spoja 3-9-b.

Atom	3-9		3-9-b	
	$\delta (^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C})/\text{ppm}$	$\delta (^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1'	4,44	101,5	4,55	99,0
2'	3,05	70,8	4,58	71,4
3'	2,47	65,4	2,76	62,7
4'	1,63; 1,11	28,9	1,70; 1,24	30,3
5'	3,47	68,9	3,49	68,7

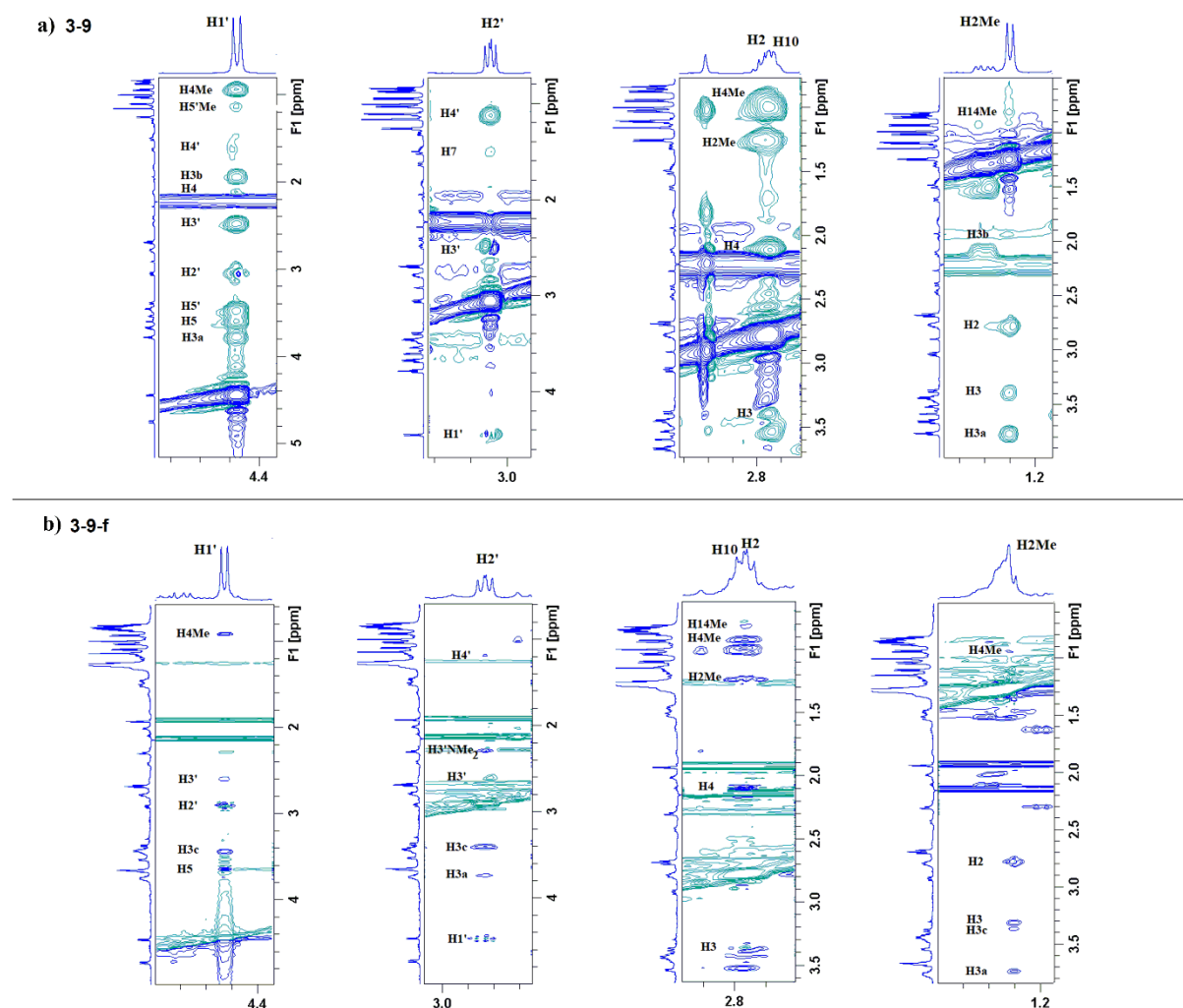
Usporedbom spektara ^1H NMR spoja 3-9-c i makrozona 3-9 vidljivo je da je spoj 3-9-c makrozonskog porijekla (slika 95). U spektru ^1H NMR izoliranog spoja vidljivi su novi signali pri 4,12 ppm, 3,55 ppm i 1,75 ppm.



Slika 95. Usporedba spektara ^1H NMR makrozona 3-9 (crveno) i spoja 3-9-c (plavo) u acetonitrilu- d_3 pri 298 K. Strelicom su označeni novi signali koji pripadaju spoju 3-9-c, a zvjezdicom su označeni signali nepoznatog onečišćenja u uzorku koje nije analizirano

Analizom spektra HSQC spoja **3-9-c** opaženo je da signali pri 4,12 ppm i 3,55 ppm odgovaraju neekvivalentnoj metilenskoj skupini H-33_{eq,ax} čiji ugljikov atom ima kemijski pomak pri 72,0 ppm (Dodatak, slika D144). Proton čiji je kemijski pomak 1,75 ppm korelira s ugljikovim atomom pri 29,7 ppm i odgovara novoj metilenskoj skupini H-34. U spektru COSY nove metilenske skupine u međusobnoj su korelaciji (Dodatak, slika D145). Nadalje, spektar NOESY sadrži korelacije protona H-33_{eq} s protonima H-33_{ax}, H-2', H-34 i H-4Me, dok proton H-34 ima korelacije s H-33_{eq,ax}, H-3c i H-4Me (Dodatak, slika D146). Navedene činjenice upućuju na to da su nove metilenske skupine H-33 i H-34 vezane na položaj 2'OH desozamina te da je struktura tog dijela molekule –O–CH₂–CH₂–**R**. Pretpostavka je da je supstituent **R** nitrilna skupina, budući da se u spektru MS (Dodatak, slika D147) nalazi signal pri vrijednosti *m/z* 1024,6, kao i signal njegovog dvostruko nabijenog iona pri vrijednosti *m/z* 514,6, što bi odgovaralo molekulskoj masi spoja **3-9-c** (1023,6 Da). Struktura spoja **3-9-c** prikazana je na slici 93c. Gubitkom propionitrila masa molekule je 970,6 Da, a u spektru MS vidljiv je ion-fragment pri *m/z* 971,6 (koji ujedno odgovara molekulskoj masi makrozona 3-9). Spektar HMBC sadrži korelacije atoma H-33_{eq} s atomom C-34 pri 29,7 ppm, kao i korelaciju atoma H-34 s atomom C-33 pri 72,0 ppm (Dodatak, slika D148).

Spektri NMR i MS spojeva **3-9-d**, **3-9-e** i **3-9-f** upućuju na dijastereomere. Masa spojeva **3-9-d** i **3-9-e** nije bila dovoljna za snimanje spektara NOESY, pa su ti spojevi izuzeti iz daljnjeg istraživanja. Snimljeni su spektri NOESY za dijastereomere **3-9** i **3-9-f** te su provedene računske simulacije molekulske dinamike, analogno dijastereomerima makrozona **3-8** opisanima u poglavlju 4.3.6. Na slici 96 prikazana je usporedba izoliranih dijelova spektra NOESY za makrozon **3-9** i njegov dijastereomer **3-9-f**. Karakteristični križni signali NOE za atome H-2 i H-2Me bili su usporedivi sa signalima u spektrima izomera **3-8** i **3-8-e** ukazujući na konfiguraciju (*R*) na položaju C-2. Korelacije atoma H-1' i H-2' u spektru izomera **3-9-f** bile su jednake onima opaženima kod izomera **3-8-f** upućujući na konfiguraciju (*S*) na položaju C-1', odnosno konfiguraciju (*R*) na položaju C-2'. U tablici 33 prikazane su predložene apsolutne konfiguracije atoma C-2, C-1' i C-2' za izomere **3-9** i **3-9-f**.



Slika 96. Izolirani dijelovi spektara NOESY spojeva: a) 3-9 i b) 3-9-f za atome H-1', H-2', H-2 i H-2Me.

Tablica 33. Apsolutne konfiguracije atoma C-2, C-1' i C-2' u strukturama izomera makrozona 3-9.

Izomer	Atom		
	C-2	C-1'	C-2'
3-9	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
3-9-f	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>

Analizom odabranih reakcijskih smjesa iz tri različite klase novosintetiziranih makrozona uspješno su izolirane i strukturno karakterizirane glavne komponente - makrozoni, te brojni sporedni i razgradni produkti. Izolirani spojevi mogu se podijeliti na spojeve tiosemikarbazonске i makrolidne strukture. Posebno su zanimljivi i važni izolirani dijastereomeri makrozona koji su pokazali dobru antibakterijsku aktivnost na odabrane

rezistentne bakterijske sojeve kao i glavni spoj. Strukturna analiza dijastereomera spektroskopijom NMR u kombinaciji s molekulskom dinamikom pokazala je da se inverzija konfiguracije događa na atomima C-2, C-1' i C-2'. Poznato je da su makrolidi vrlo osjetljivi na kiselo-bazne promjene u otopini što predstavlja izazov tijekom njihove sinteze. Sintetski put makrozona klase 3- sastoji se od 7 koraka.²⁹ Epimerizacija je već uočena ranije tijekom sinteze nekih ketolida.¹²⁹ Ugljikov atom C-2 u strukturi ketolida može biti kemijski aktiviran susjednim okso-skupinama te prijeći u reaktivni enolni oblik koji brzo reagira s elektrofilnim reagensima kao što su halogeni elementi. U slučaju makrozona **3-8**, koji je dominirao u reakcijskoj smjesi i čija je konfiguracija (*R*) na položaju C-2, identificiran je i njegov (*S*)-epimer (**3-8-f**), samo u puno manjoj količini. Nadalje, na inverziju konfiguracije mogu utjecati sintetski postupci tijekom pripreve 3-aminopropil azitromicina, prekursora za sintezu makrozona.²⁹ Reakcija O-alkilacije na položaju C-3 i zaštita hidroksilne skupine 2'-OH provode se uz dodatak jake baze NaH. Pretpostavlja se da je epimerizacija na položajima C-2 i C-2' rezultat bazno katalizirane reakcije uključujući deprotonaciju i protonaciju te enolatni anion kao međuprodukt. Stoga su vodikov atom H-2, koji je kiselog karaktera, i upotreba baze NaH odgovorni za nastajanje dijastereomera. Inverzija konfiguracije na položaju C-1' najvjerojatnije se događa pod istim reakcijskim uvjetima.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom je radu tehnika LC-SPE/krio NMR uspješno primijenjena za analizu triju modelnih sustava bioaktivnih molekula i lijekova. Kao modelni sustavi istraživani su derivati karbohidrazida, etodolak i makrozoni. Za svaki modelni sustav prvo je razvijena metoda HPLC za odjeljivanje komponenata smjese. Zatim su istraženi i optimirani parametri za učinkovitu ekstrakciju odabranih analita na SPE-sorbense kao što su: vrsta nepokretne faze na SPE-sorbensu, volumen injektiranja, broj injektiranja i dodatni protok pokretne faze. Za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju izoliranih spojeva korištene su tehnika LC-MS i spektroskopija NMR. Snimljeni su i analizirani spektri ^1H , COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC i NOESY.

Razvijena metoda LC-SPE/krio NMR uspješno je primijenjena za praćenje kemijske reakcije kondenzacije karbohidrazida i salicilaldehida. Ekstrakcija odabranih komponenata reakcijske smjese na SPE-sorbense C18 te snimanje i analiza spektara NMR omogućili su identifikaciju produkata reakcije zastupljenih u uzorku u niskim koncentracijama. Najmanja masa izoliranog produkta, 1,5-bis(saliciliden)karbohidrazida, bila je 1,95 μg .

Analizom uzorka 7-etiltriptofola, polazne tvari za sintezu etodolaka, kao i odabranih frakcija, prethodno pročišćenih semipreparativnom tekućinskom kromatografijom, učinkovito je izolirano i strukturno karakterizirano 17 onečišćenja. Identificirana onečišćenja derivati su indola, cinolina, azobenzena, bifenila, karbazola, piridoindola, anilina i kinolina.

Tehnika LC-SPE/krio NMR dokazala se kao brza i učinkovita metoda i za analizu novih derivata azitromicina, makrozona. Kromatografska analiza 6 reakcijskih smjesa makrozona na koloni fenil (Waters Xbridge Phenyl) pokazala je da je udio makrozona bio od 6,39 % za spoj **3-9** do 46,7 % za spoj **9a-1**, dok je udio onečišćenja bio od 0,01 % do 35,1 %. Istraživanje djelotvornosti ekstrakcije makrozona pokazalo je da se analiti najbolje zadržavaju na SPE-sorbensu C18 uz dodatni protok pokretne faze od 1,5 mL min⁻¹, te da zadržavanje najviše ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima supstituenta R vezanog na makrolaktonski prsten. Analizom odabranih reakcijskih smjesa iz triju različitih klasa makrozona uspješno su izolirane i strukturno karakterizirane glavne komponente - makrozoni, te brojni sporedni produkti i razgradni produkti. Izolirani spojevi mogu se podijeliti na spojeve tiosemikarbazonske i makrolidne strukture. Poseban doprinos ovog istraživanja je izolacija i identifikacija

dijastereomera makrozona koji također nastaju u kemijskim reakcijama pripreme makrozona, a koji pokazuju različitu antibakterijsku aktivnost na odabrane rezistentne bakterijske sojeve u usporedbi s glavnim spojem. Uporabom spektroskopije NMR u kombinaciji s računima molekulske dinamike pokazano je da se inverzija konfiguracije događa na atomu C-2 makrolaktonskog prstena i na atomima C-1' i C-2' šećerne jedinice desozamina te su pojašnjeni mogući razlozi nastanka dijastereomera.

Tehnika LC-SPE/krio NMR vrlo je djelotvorna, brza i ekonomična tehnika za odjeljivanje, izolaciju i karakterizaciju komponenata prisutnih u smjesama uz utrošak manjih količina uzorka i otapala u odnosu na postojeće tehnike *off-line*. Stoga ova tehnika ima veliki potencijal u analizi složenih smjesa spojeva s naglaskom na identifikaciju i strukturnu karakterizaciju nepoznatih komponenata sadržanih u vrlo malim količinama.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
2D LC/IT-TOF-MS	<i>Two-dimensional Liquid Chromatography/ Ion Trap-Time-of-Flight-Mass Spectrometry</i>	Spregnuti sustav dvodimenzijske tekućinske kromatografije i spektrometrije masa sa stupicom iona i analizatorom vremena leta
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
DAD	<i>Diode Array Detector</i>	Detektor s nizom dioda
DIPEA	-	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i>	Ionizacija elektroraspršenjem
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Američka agencija za hranu i lijekove
HATU	-	Heksafluorfosfat azabenzotriazol tetrametil-uronijeva sol
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPLC-CAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography- Charged Aerosol Detector</i>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz detektor s nabijenim aerosolom
HTLC	<i>High-Temperature Liquid Chromatography</i>	Tekućinska kromatografija pri temperaturama višima od 60 °C
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>	Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu kod ljudi
IT-TOF/MS	<i>Ion Trap-Time-of-Flight-Mass Spectrometry</i>	Spektrometrija masa sa stupicom iona i analizatorom vremena leta
IT-TOF-MS/MS	<i>Ion Trap-Time-of-Flight-Tandem Mass Spectrometry</i>	Tandemna spektrometrija masa sa stupicom iona i analizatorom vremena leta
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa
LC-NMR	<i>Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
LC-NMR-MS	<i>Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance-Mass Spectrometry</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije, spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije i spektrometrije masa
LC-SPE	<i>Liquid Chromatography-Solid-Phase Extraction</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i ekstrakcije na čvrstoj fazi
LC-SPE/cryo NMR	<i>Liquid Chromatography-Solid-Phase Extraction/cryo Nuclear Magnetic Resonance</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i ekstrakcije na čvrstoj fazi/ spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije s krio-probom
LC-SPE/NMR	<i>Liquid Chromatography-Solid-Phase Extraction/ Nuclear Magnetic Resonance</i>	Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i ekstrakcije na čvrstoj fazi/ spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Spektrometrija masa
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>	Disperzija matrice u čvrstoj fazi
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-charge ratio</i>	Omjer mase i naboja
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>	Tehnika NMR
PLE	<i>Pressurized Liquid Extraction</i>	Ekstrakcija tekuće-tekuće pri povišenom tlaku
<i>S/N</i>	<i>Signal-to-Noise ratio</i>	Omjer signala i šuma
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>	Ekstrakcija na čvrstoj fazi
SPME	<i>Solid-Phase MicroExtraction</i>	Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
TOF	<i>Time-of-Flight</i>	Analizator vremena leta
UHPLC	<i>Ultra-high performance Liquid Chromatography</i>	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
WATERGATE	<i>WATER-suppression by GrAdient-Tailored Excitation</i>	Tehnika supresije signala molekula vode pomoću gradijentnih pulseva
WET	<i>Water suppression Enhanced through T1 effects</i>	Tehnika supresije signala molekula vode potpomognuta učincima T1

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. ICH, Impurities in drug substances Q3A(R2), u: International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva, Švicarska, 2006.
2. S. Ashu, K. Saloni i B. Narasimhan, *Int. Res. J. Pharm.* **3** (2012) 57–59.
3. C. Prakash, C. L. Shaffer i A. Nedderman, *Mass Spectrom. Rev.* **26** (2007) 340–369.
4. P. Wright, *Xenobiotica* **41** (2011) 670–686.
5. M. R. Meyer i H. H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.* **403** (2012) 1221–1231.
6. P. Novak, P. Tepeš, I. Fistrić, I. Bratoš i V. Gabelica, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 1268–1272.
7. P. Novak, P. Tepeš, M. Cindrić, M. Ilijaš, S. Dragojević i K. Mihaljević, *J. Chrom. A* **1033** (2004) 299–303.
8. K. E. Zhang, B. Hee, C. A. Lee, B. Liang i B. C. M. Potts, *Drug Metab. Dispos.* **29** (2001) 729–734.
9. C. A. Daykin, O. Corcoran, S. H. Hansen, I. Bjornsdottir, C. Cornett, S. C. Connor, J. C. Lindon i J. K. Nicholson, *Anal. Chem.* **73** (2001) 1084–1090.
10. M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Whitters, W. E. Maas i O. Corcoran, *Anal. Chem.* **75** (2003) 1546–1551.
11. H. Kovacs, D. Moskau i M. Spraul, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **46** (2005) 131–155.
12. V. Exarchou, M. Godejohann, T. A. van Beek, I. P. Gerotheranassis i J. Vervoort, *Anal. Chem.* **75** (2003) 6288–6294.
13. G. Miliauskas, T. A. van Beek, P. de Waard, R. P. Venskutonis i E. J. R. Sudhölter, *J. Chrom. A* **1112** (2006) 276–284.
14. G. Schlotterbeck i S. M. Ceccarelli, *Bioanalysis* **1** (2009) 549–559.
15. C. Seger, M. Godejohann, M. Spraul, H. Stuppner i F. Hadacek, *J. Chrom. A* **1136** (2006) 82–88.
16. R. Brkljača, J. L. Wolfender i S. Urban, *Chem. Biol.* **7** (2020) 61–82.
17. M. Halabalaki, K. Vouggogiannopoulou, E. Mikros i A. L. Skaltsounis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **25** (2014) 1–7.
18. J. L. Wolfender, G. Marti, A. Thomas i S. Bertrand, *J. Chrom. A* **1382** (2015) 136–164.
19. R. M. Maggio, N. L. Calvo, S. E. Vignaduzzo i T. S. Kaufman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 102–122.
20. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan i P. Novak, *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 543–547.

21. P. Schmidt, C. Kolb, M. Godejohann, A. Reiser, M. Philipp, H. C. Müller i K. Karaghiosoff, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **222** (2023) 115068.
22. J. Larsen, D. Staerk, C. Cornett, S. H. Hansen i J. W. Jaroszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49** (2009) 839–842.
23. I. Habinovec, T. Jednačak i P. Novak, *ADMET&DMPK* **3** (2015) 352–358.
24. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol i F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018.,
25. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins i D. Bertrand, *J. Med. Chem.* **63** (2020) 6462–6473.
26. B. Z. Fan, H. Hiasa, W. Lv, S. Brody, Z. Y. Yang, C. Aldrich, M. Cushman i J. H. Liang, *Eur. J. Med. Chem.* **193** (2020) 112222.
27. P. Gopal i T. Dick, *Int. J. Antimicrob. Agents* **45** (2015) 430–433.
28. M. Bukvić Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša i N. Kujundžić, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 853–856.
29. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša i P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **56** (2020) 106147.
30. Y. Chang, L. X. Wang, Y. P. Li i C. Q. Hu, *J. Chromatogr. Sci.* **54** (2016) 187–194.
31. G. Liu, B. Zhu, X. Ren i J. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **186** (2020) 113324.
32. K. Albert, *On-line LC-NMR and Related Techniques*, John Wiley & Sons Ltd, Engleska, 2002, str. 1–236.
33. N. Watanabe i E. Niki, *Proc. Japan Acad. Ser. B* **54** (1978) 194–199.
34. J. F. Haw, T. E. Glass, D. W. Hausler, E. Motell i H. C. Dorn, *Anal. Chem.* **52** (1980) 1135–1140.
35. K. Albert, M. Kunst i E. Bayer, *Anal. Chem.* **61** (1989) 772–775.
36. S. H. Smallcombe, S. L. Patt i P. A. Keifer, *J. Magn. Reson. Ser A* **117** (1995) 295–303.
37. M. V. S. Elipe, *Anal. Chim. Acta* **497** (2003) 1–25.
38. M. Spraul, M. Hofmann i P. Dvortsak, *Anal. Chem.* **65** (1993) 327–330.
39. M. Spraul, M. Hofmann, I. D. Wilson, E. Lenz, J. K. Nicholson i J. C. Lindon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11** (1993) 1009–1015.
40. J. K. Roberts i R. J. Smith, *J. Chrom. A* **677** (1994) 385–389.
41. P. Novak, P. Tepeš, M. Cindrić, M. Ilijaš, S. Dragojević i K. Mihaljević, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 1442–1447.
42. C. Pan, F. Liu, J. Qin, W. Wang, D. Drinkwater i R. Vivilecchia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 581–590.
43. P. Novak, P. Tepeš, M. Ilijaš, I. Fistrić, I. Bratoš, A. Avdagić, Z. Hameršak, V. Gabelica Marković i M. Dumić, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 68–72.

44. S. Provera, L. Martini, G. Guercio, L. Turco, L. Costa i C. Marchioro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 389–395.
45. J. P. Shockcor, I. S. Silver, R. M. Wurm, P. N. Sanderson, R. D. Farrant, B. C. Sweatman i J. C. Lindon, *Xenobiotica* **26** (1996) 41–48.
46. W. J. Ehlhardt, J. M. Woodland, T. M. Baughman, M. Vandenbranden, S. A. Wrighton, J. S. Kroin, B. H. Norman i S. R. Maple, *Drug Metab. Dispos.* **26** (1997) 42–51.
47. A. E. Mutlib, H. Chen, G. A. Nemeth, J. A. Markwalder, S. P. Seitz, L. S. Gan i D. D. Christ, *Drug Metab. Dispos.* **27** (1999) 1319–1333.
48. R. Singh, I. W. Chen, L. Jin, M. V. Silva, B. H. Arison, J. H. Lin i B. K. Wong, *Drug Metab. Dispos.* **29** (2001) 1578–1587.
49. F. S. Pullen, A. G. Swanson, M. J. Newman i D. S. Richards, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **9** (1995) 1003–1006.
50. J. P. Shockcor, S. E. Unger, I. D. Wilson, P. J. Foxall, J. K. Nicholson i J. C. Lindon, *Anal. Chem.* **68** (1996) 4431–4435.
51. Z. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 516–527.
52. K. I. Burton, J. R. Everett, M. J. Newman, F. S. Pullen, D. S. Richards i A. G. Swanson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15** (1997) 1903–1912.
53. C. A. Scott, D. A. Cragg, F. Row, D. J. White i P. C. J. White, *J. Magn. Reson.* **60** (1984) 397–404.
54. M. Spraul, A. S. Freund, R. E. Nast, R. S. Withers, W. E. Maas i O. Corcoran, *Anal. Chem.* **75** (2003) 1546–1551.
55. G. B. Scarfe, B. Wright, E. Clayton, S. Taylor, I. D. Wilson, J. C. Lindon i J. K. Nicholson, *Xenobiotica* **28** (1998) 373–388.
56. G. J. Dear, R. S. Plumb, B. C. Sweatman, J. Ayrton, J. C. Lindon, J. K. Nicholson i I. M. Ismail, *J. Chrom. B* **748** (2000) 281–293.
57. J. P. Shockcor, S. E. Unger, P. Savina, J. K. Nicholson i J. C. Lindon, *J. Chrom. B* **748** (2000) 269–279.
58. C. Clarkson, M. Sibum, R. Mensen i J. W. Jaroszewski, *J. Chrom. A* **1165** (2007) 1–9.
59. L. Griffiths i R. Horton, *Magn. Reson. Chem.* **36** (1998) 104–109.
60. N. T. Nyberg, H. Baumann i L. Kenne, *Magn. Reson. Chem.* **39** (2001) 236–240.
61. V. Exarchou, M. Godejohann, T. A. van Beek, I. P. Gerothanassis i J. Vervoort, *Anal. Chem.* **75** (2003) 6288–6294.
62. G. Miliauskas, T. A. van Beek, P. de Waard, R. P. Venskutonis i E. J. R. Sudhölter, *J. Nat. Prod.* **68** (2005) 168–172.

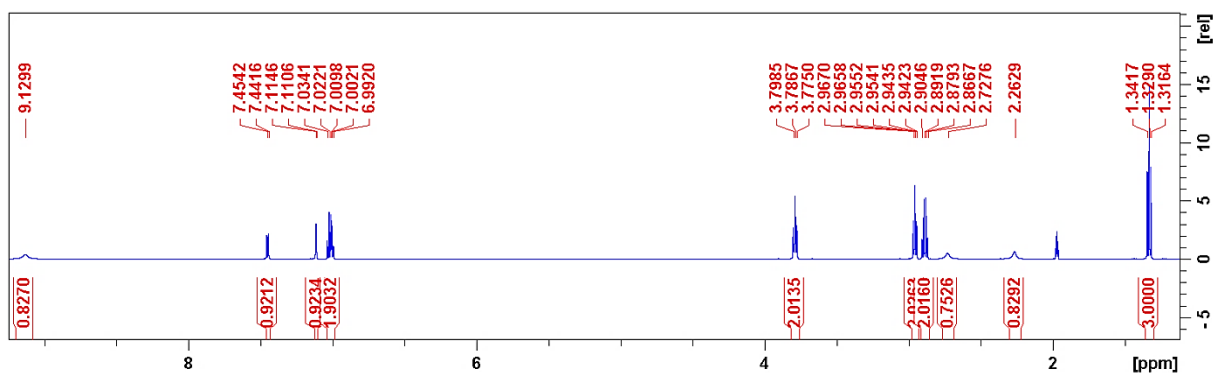
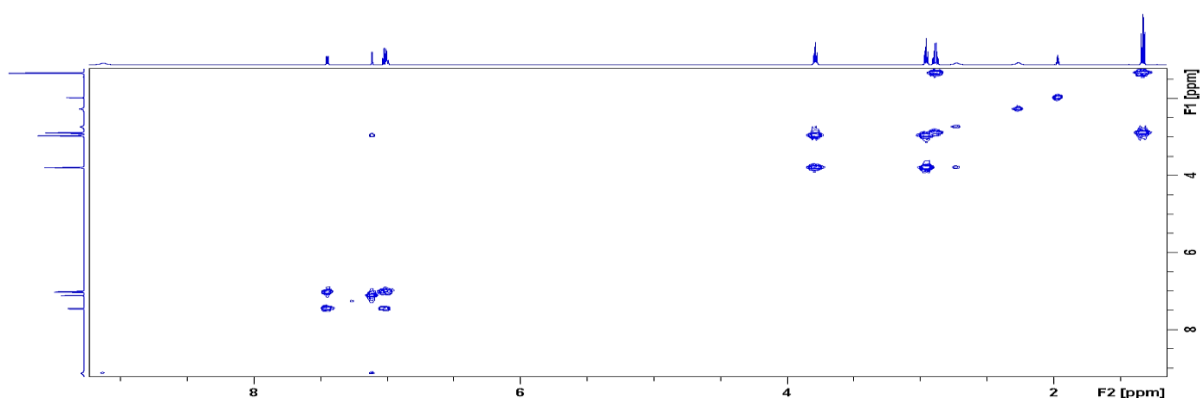
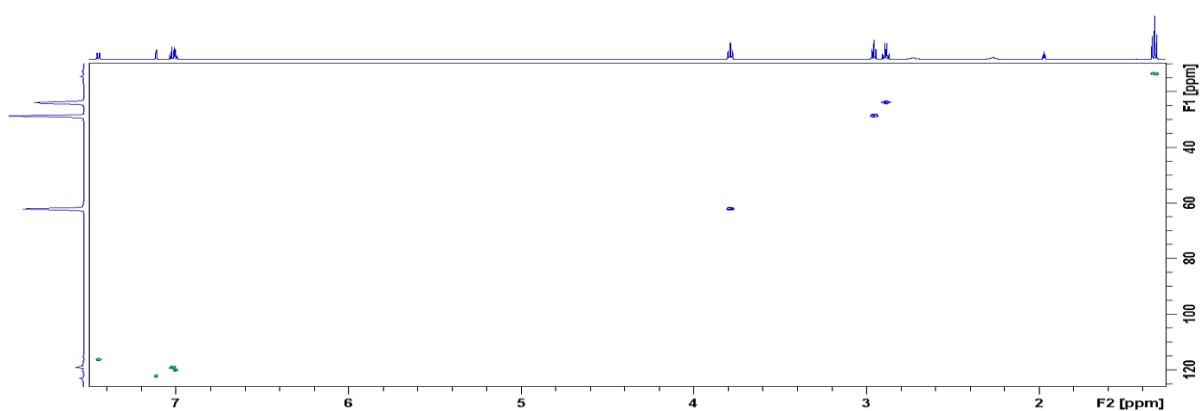
63. C. Seger, M. Godejohann, L. H. Tseng, M. Spraul, A. Girtler, S. Sturm et al., *Anal. Chem.* **77** (2005) 878–885.
64. C. Clarkson, D. Staerk, S. H. Hansen i J. W. Jaroszewski, *Anal. Chem.* **77** (2005) 3547–3553.
65. M. Lambert, D. Staerk, S. H. Hansen i J. W. Jaroszewski, *J. Nat. Prod.* **68** (2005) 1500–1509.
66. S. Christophoridou, P. Dais, L. H. Tseng i M. Spraul, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4667–4679.
67. C. Y. Wang i S. S. Lee, *Phytochem. Anal.* **16** (2005) 120–126.
68. A. Pukalskas, T. A. van Beek i P. de Waard, *J. Chrom. A* **1074** (2005) 81–88.
69. C. C. Chang, W. T. Tsai, C. K. Chen, C. H. Chen i S. S. Lee, *Fitoterapia* **144** (2020) 104455.
70. C. Wen, D. Wang, X. Li, T. Huang, C. Huang i K. Hu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **150** (2018) 144–151.
71. M. Godejohann, L. H. Tseng, U. Braumann, J. Fuchser i M. Spraul, *J. Chrom. A* **1058** (2004) 191–196.
72. M. Sandvoss, B. Bardsley, T. L. Beck, E. Lee-Smith, S. E. North, P. J. Moore et al., *Magn. Reson. Chem.* **43** (2005) 762–770.
73. B. Kammere, H. Scheible, G. Zurek, M. Godejohann, K. P. Zeller, C. H. Gleiter, W. Albrecht i S. Laufer, *Xenobiotica* **37** (2007) 280–297.
74. F. Rinaldi, J. Fan, C. Pathirana i V. Palaniswamy, *Magn. Reson. Chem.* **51** (2013) 517–522.
75. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal i R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 148–173.
76. M. Harča, Izolacija i strukturna karakterizacija procesnih onečišćenja 3-brom-5-(trifluormetil)anilina primjenom sustava LC-SPE/NMR, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018., str. 1–150.
77. P. Schmidt, C. Kolb, M. Godejohann, A. Reiser, M. Philipp, H. C. Müller i K. Karaghiosoff, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **222** (2023) 115068.
78. A. J. Simpson, L. H. Tseng, M. J. Simpson, M. Spraul, U. Braumann, W. L. Kingery, B. P. Kelleher i M. H. B. Hayes, *Analyst* **129** (2004) 1216–1222.
79. U. C. Meier, *J. Chrom. A* **1286** (2013) 159–165.
80. K. B. Glaser, *InflammoPharmacology* **3** (1995) 335–345.
81. C. A. Demerson, L. G. Humber, T. A. Dobson i I. L. Jirkovsky, US patent 3,843,681, 22. listopada 1974.
82. C. A. Demerson, L. G. Humber, T. A. Dobson i I. L. Jirkovsky, US patent 3,939,178, 17. veljače 1976.
83. C. A. Demerson i L. G. Humber, US patent 4,585,877, 29. travnja 1986.
84. G. Vincenzo i P. Franco, US patent 5,599,946, 4. veljače 1997.
85. E. Vigano i P. Colombo, US patent 6,066,741, 23. svibnja 2000.

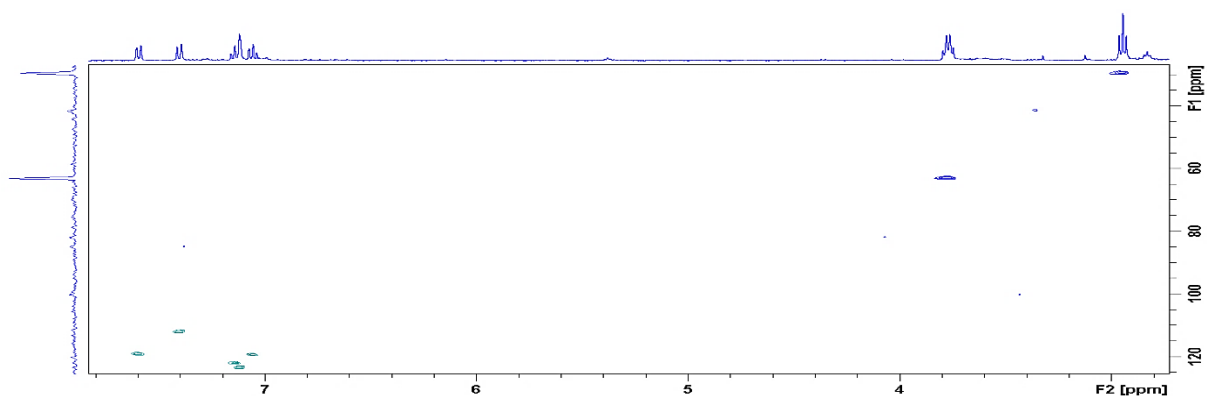
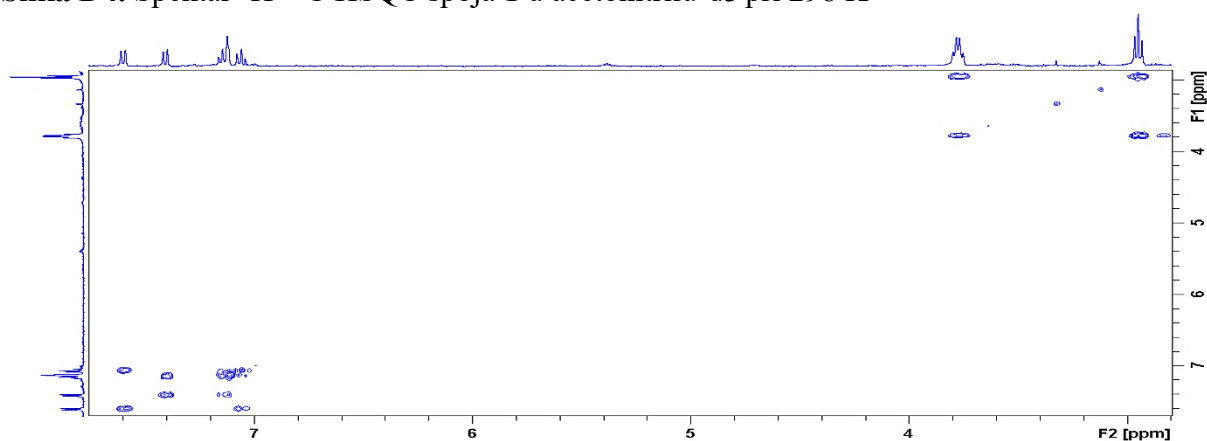
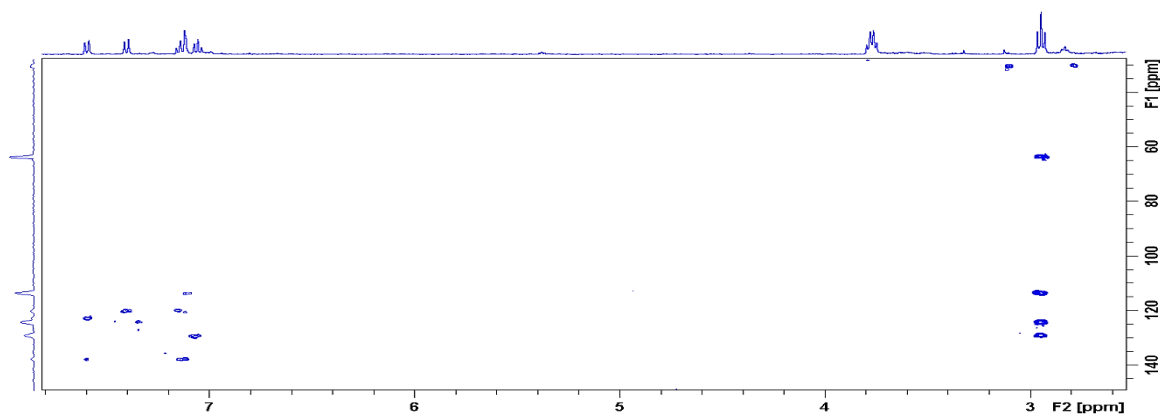
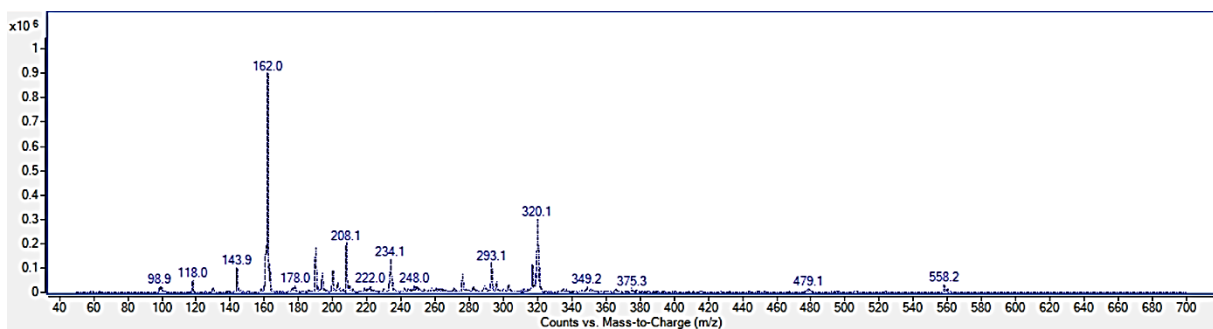
86. E. L. Larghi i T. S. Kaufman, *Eur. J. Org. Chem.* **2011** (2011) 5195–5231.
87. M. C. Sekharayya, G. V. Narayana, S. Nigam i G. Madhusudhan, *Ind. J. Chem.* **51B** (2012) 1763–1766.
88. L. Zhu i C. Wang, CN 101077872 B, 21. lipnja 2007.
89. Y. J. Jiang, CN 1740174, 23. kolovoza 2005.
90. ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), u: International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva, Švicarska, 1995.
91. R. Holm i D. P. Elder, *Eur. J. Pharm. Sci.* **87** (2016) 118–135.
92. M. Singh, S. Sethi i R. Bhushan, *J. Sep. Sci.* **43** (2019) 1–13.
93. G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher i F. Köhler, *Arzneim.-Forsch.* **29** (1979) 1640–1642.
94. H. Noedl, S. Krudsood, W. Leowattana, N. Tangpukdee, W. Thanachartwet, S. Looareesuwan, R. S. Miller, M. Fukuda, K. Jongsakul, K. Yingyuen, S. Sriwichai, C. Ohrt i C. Knirsch, *Antimicrob. Agents Chemoter.* **51** (2007) 651–656.
95. J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore i T. A. Steitz, *Moll. Cell* **10** (2002) 117–128.
96. H. Čipčić Paljetak, L. Tomašković, M. Matijašić, M. Bukvić, A. Fajdetić, D. Verbanac i M. Perić, *Curr. Top. Med. Chem.* **17** (2017) 1–22.
97. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Cindrić, K. Brajša, M. Dumić i N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.* **52** (2007) 138–145.
98. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak i N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3459–3470.
99. M. Bukvić Krajačić, M. Perić, K. S. Smith, Z. Ivezić Schönfeld, D. Žiher, A. Fajdetić, N. Kujundžić, W. Schönfeld, G. Landek, J. Padovan, D. Jelić, A. Ager, W. K. Milhous, W. Ellis, R. Spaventi i C. Ohrt, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3595–3605.
100. M. Perić, A. Fajdetić, R. Rupčić, S. Alihodžić, D. Žiher, M. Bukvić Krajačić, K. S. Smith, Z. Ivezić Schönfeld, J. Padovan, G. Landek, D. Jelić, A. Hutinec, M. Mesić, A. Ager, W. Y. Ellis, W. K. Milhous, C. Ohrt i R. Spaventi, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 1389–1401. *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
101. S. Ma, R. Ma, Z. Liu, C. Ma i X. Shen, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
102. A. Hutinec, M. Đerek, G. Lazarevski, V. Šunjić, H. Čipčić Paljetak, S. Alihodžić, V. Eraković Haber, M. Dumić i N. Maršić, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 3244–3249.
103. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Aršić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš i N. Košutić-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
104. F. Schlunzen, J. M. Harms, F. Franceschi, H. A. S. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach i A. Yonath, *Structure* **11** (2003) 329–338.

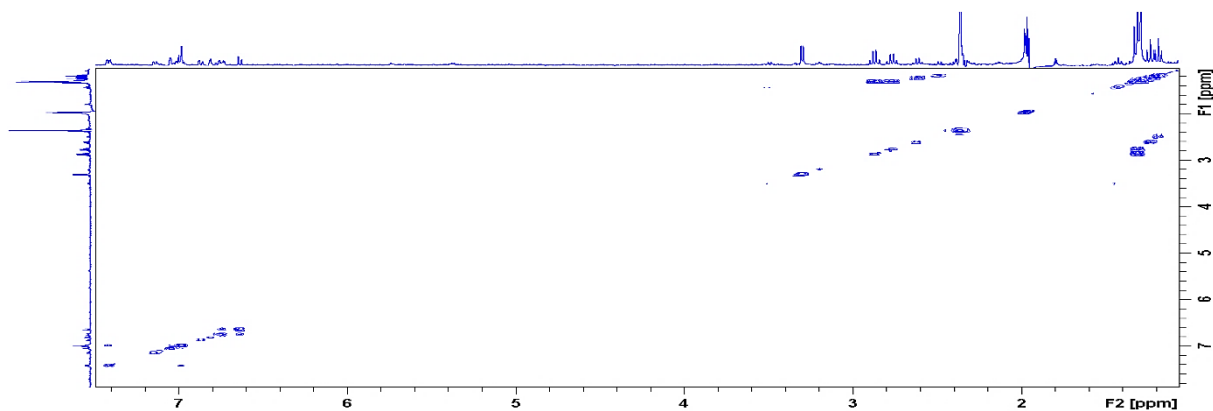
105. M. T. Labro, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3** (2002) 61–68.
106. L. Tomašković, M. Komac, O. Makaruha Stegić, V. Munić, J. Ralić, B. Stanić, M. Banjanac, S. Marković, B. Hrvačić, H. Čipčić Paljetak, J. Padovan, I. Glojnarić, V. Eraković Haber, M. Mesić i M. Merčep, *Bioorg. Med. Chem.* **21** (2013) 321–332.
107. A. Janas i P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662.
108. I. Kanfer, M. F. Skinner i R. B. Walker, *J. Chrom. A* **812** (1998) 255–286.
109. M. J. Gonzalez de la Huebra i U. Vincent, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 376–398.
110. J. Wang, *Mass Spectrom. Rev.* **28** (2009) 50–92.
111. L. K. Bekele i G. G. Gebeyehu, *ISRN Anal. Chem.* **2012** (2012) 1–18.
112. E. Wilms, H. Trumpie, W. Veenendaal i D. Touw, *J. Chrom. B* **814** (2005) 37–42.
113. J. Wang, G. Liu, B. Zhu i L. Tang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **184** (2020) 113170.
114. K. Räder, A. Wildfeuer, A. Schwedass i H. Laufen, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **344** (1985) 416–421.
115. J. Dow, M. Lemar, A. Frydman i J. Gaillot, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **344** (1985) 275–283.
116. G. Liu, Y. Xu, J. Sang, B. Zhu i J. Wang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **33** (2019) 1058–1066.
117. <https://www.shimadzu.eu.com/trap-free-2d-lcms-impurity-identification-system>
(preuzeto 4. svibnja 2023.)
118. N. P. Prajapati i H. D. Patel, *Synth. Commun.* **49** (2019) 2767–2804.
119. I. Đilović, M. Rubčić, V. Vrdoljak, S. Kraljević Pavelić, M. Kralj, I. Piantanida i M. Cindrić, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 5189–5198.
120. G. R. Parrilha, R. G. dos Santos i H. Beraldo, *Coord. Chem. Rev.* **458** (2022) 214418.
121. O. Özbek i C. Berkel, *Polyhedron* **238** (2023) 116426.
122. L. Tang, P. Zhou, Q. Zhang, Z. Huang, J. Zhao i M. Cai, *Inorg. Chem. Commun.* **36** (2013) 100–104.
123. A. Nejabatdoust, H. Zamani i A. Salehzadeh, *Microb. Drug Resist.* **25** (2019) 966–974.
124. I. Mikulandra, Priprava, karakterizacija i biološka aktivnost makrozona, novih derivata azitromicina, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2022., str. 1–199.
125. T. Jednačak, P. Novak, A. Hodžić, O. Scheibelhofer, J. G. Khinast, J. Plavec, P. Šket i J. Parlov Vuković, *Acta Chim. Slov.* **61** (2014) 161–169.
126. P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo i L. Mondello, *J. Chrom. A* **1184** (2008) 353–368.
127. B. W. J. Pirok, D. R. Stoll i P. J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* **91** (2019) 240–263.
128. M. Kushwaha, B. Goel, S. Jaglan i S. K. Jain, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **43** (2020) 131–137.

-
129. T. C. Henninger, X. Xu, D. Abbanat, E. Z. Baum, B. D. Foleno, J. J. Hilliard, K. Bush, D. J. Hlasta i M. J. Macielag, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 4495–4499.

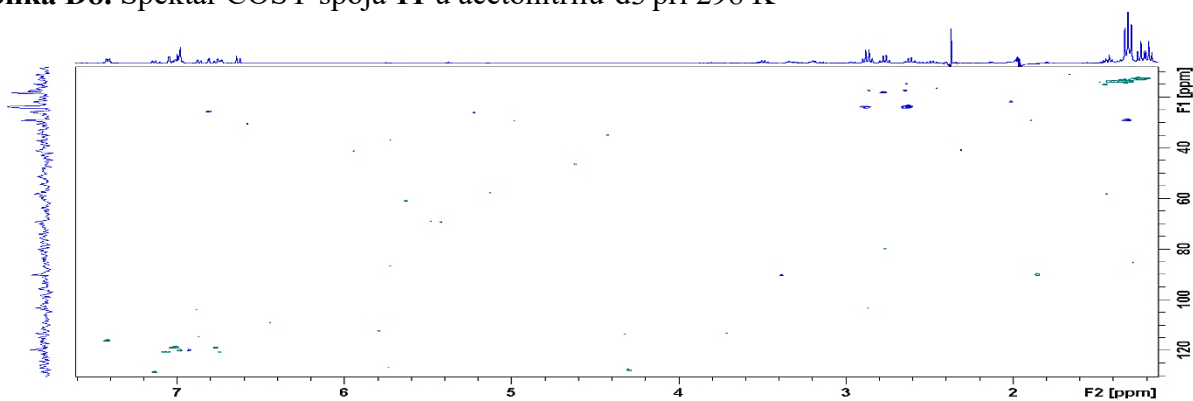
§ 8. DODATAK

Slika D1. Spektar ^1H NMR 7-etiltriptofola u acetonitrilu-d $_3$ pri 298 KSlika D2. Spektar COSY 7-etiltriptofola u acetonitrilu-d $_3$ pri 298 KSlika D3. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC 7-etiltriptofola u acetonitrilu-d $_3$ pri 298 K

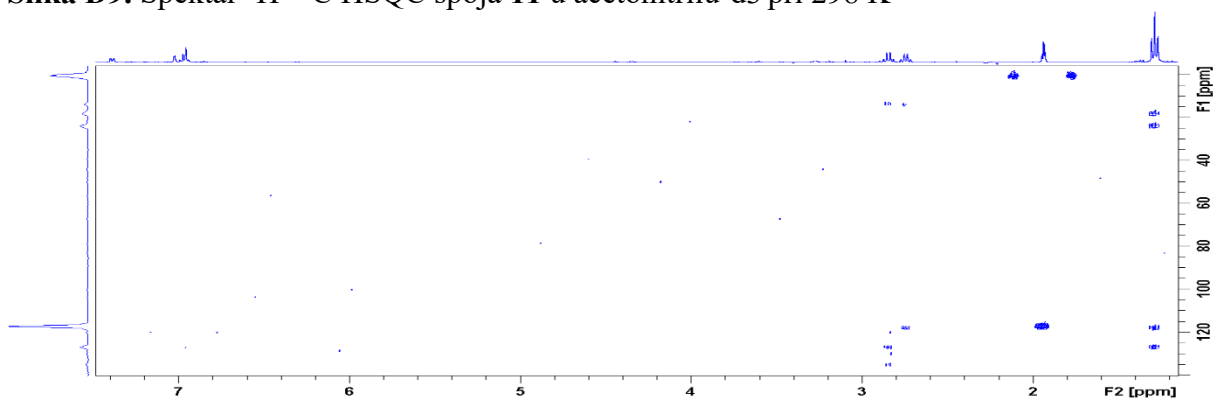
Slika D4. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **1** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D5. Spektar COSY spoja **1** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D6. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja **1** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D7. Spektar ESI-MS spoja **1** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



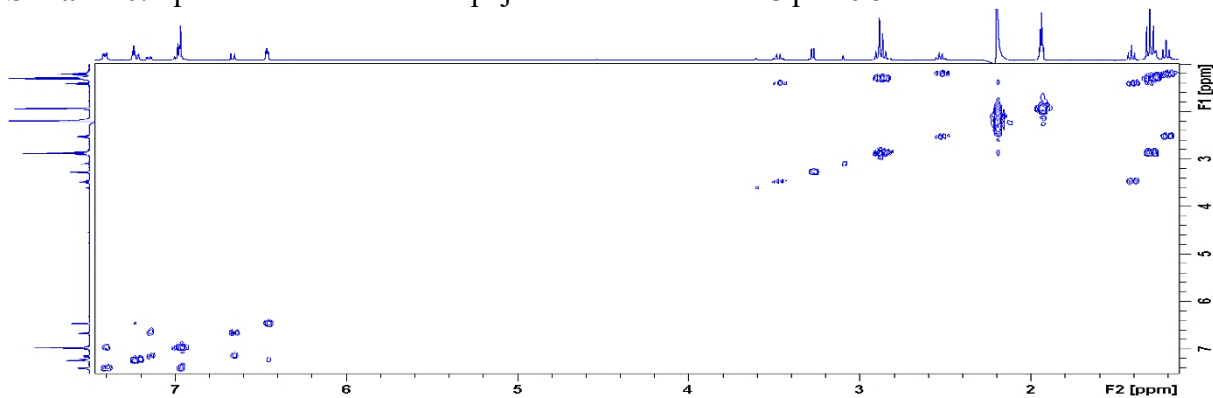
Slika D8. Spektar COSY spoja **11** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



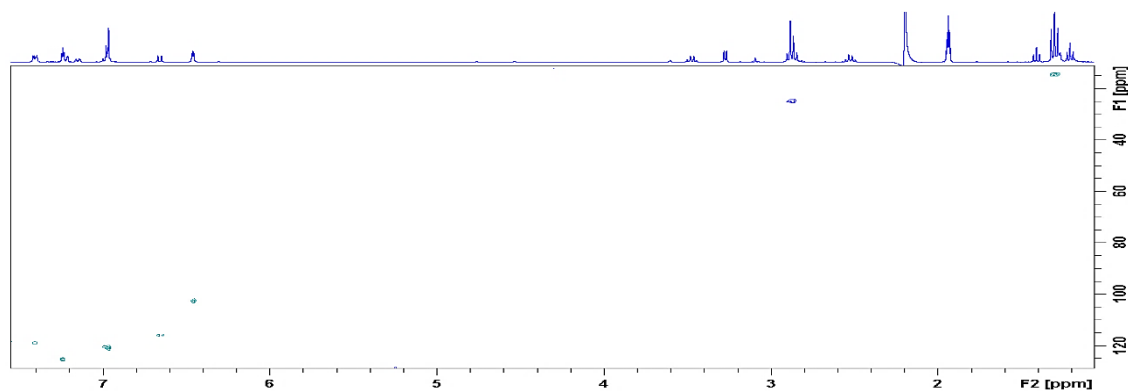
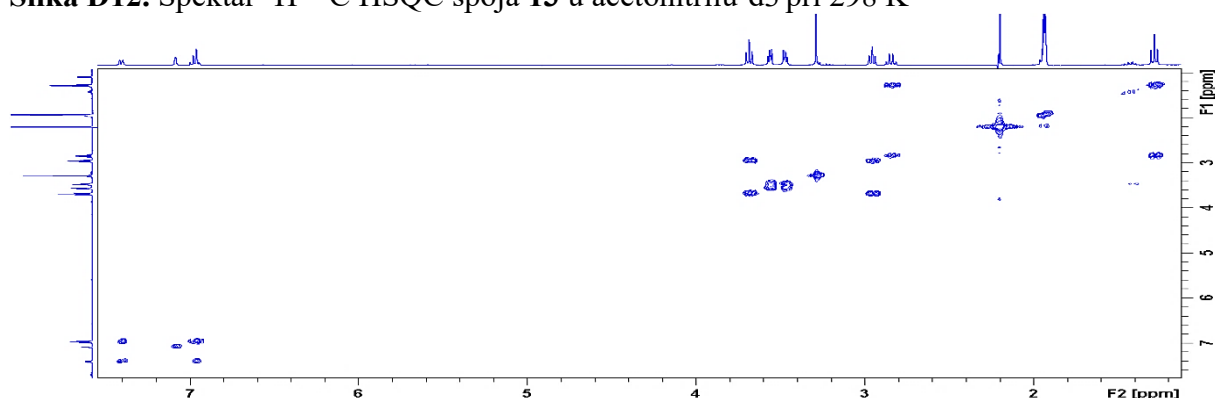
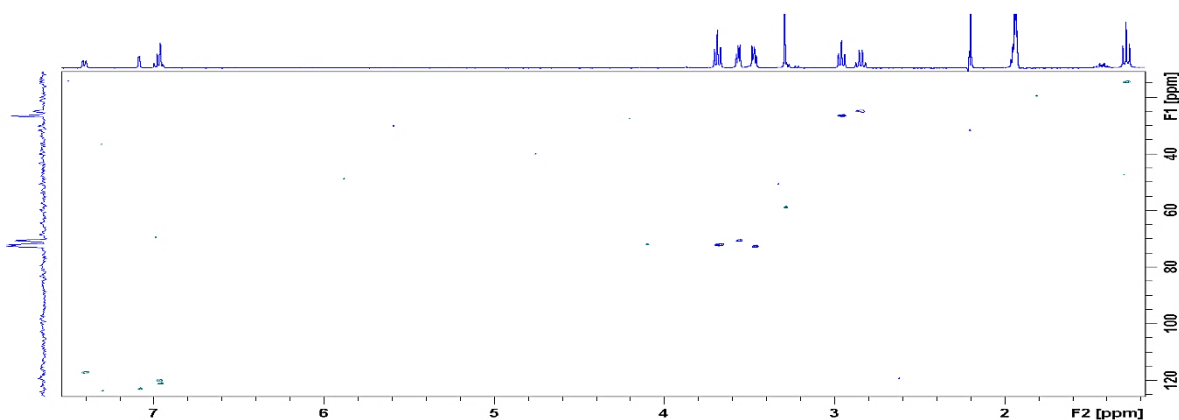
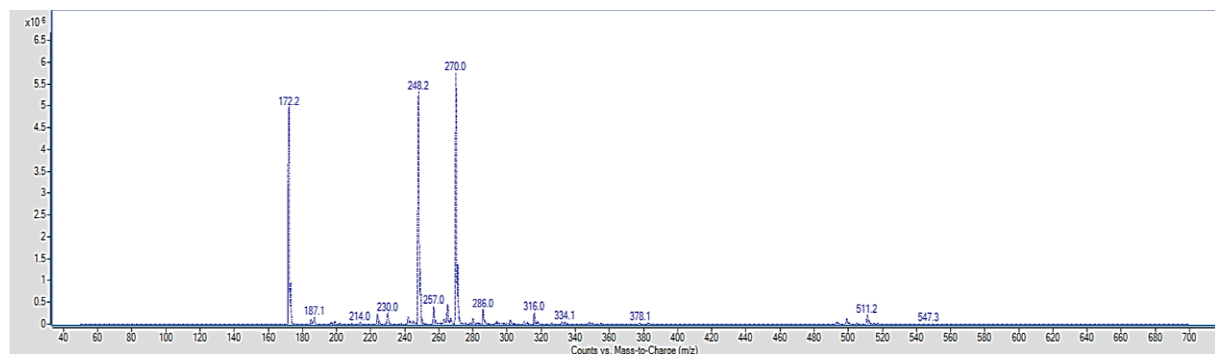
Slika D9. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **11** u acetonitrilu-d3 pri 298 K

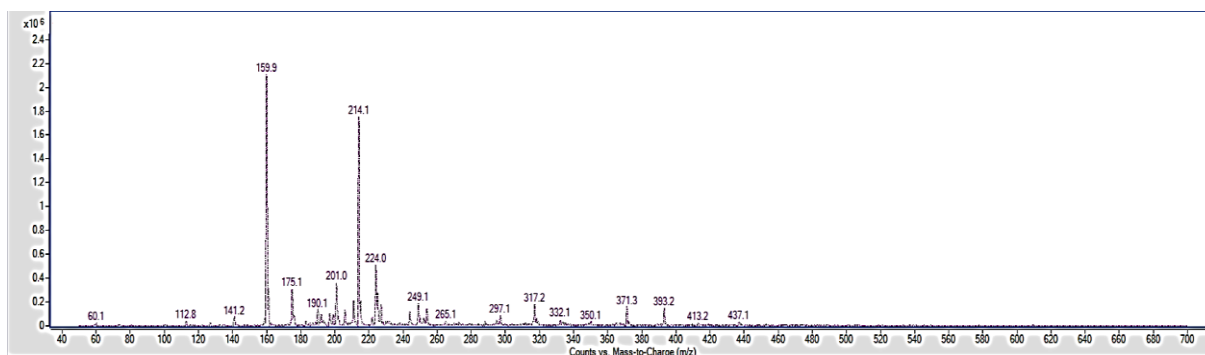


Slika D10. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja **11** u acetonitrilu-d3 pri 298 K

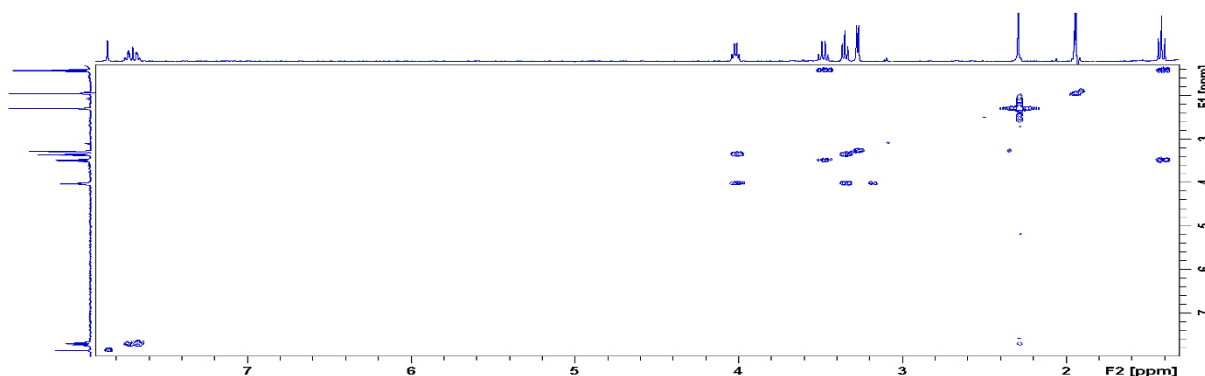


Slika D11. Spektar COSY spoja **13** u acetonitrilu-d3 pri 298 K

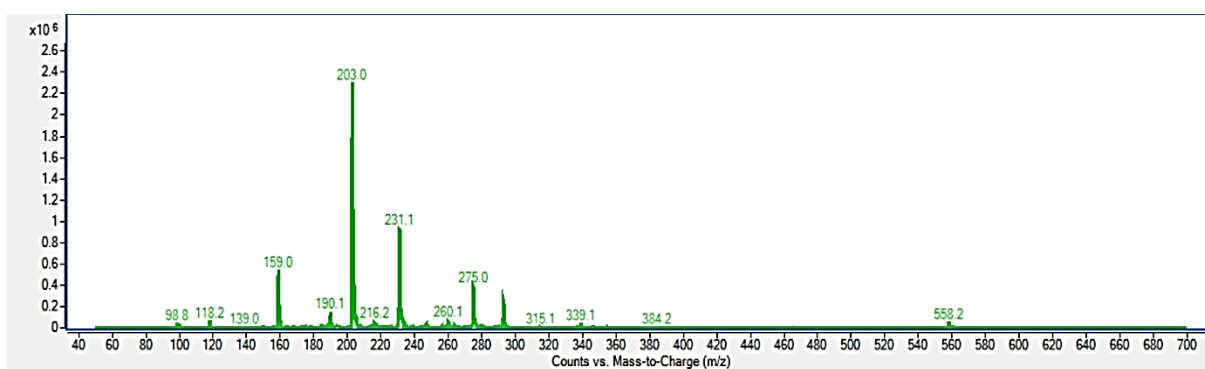
Slika D12. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **13** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D13. Spektar COSY spoja **8** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D14. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **8** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D15. Spektar ESI-MS spoja **8** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



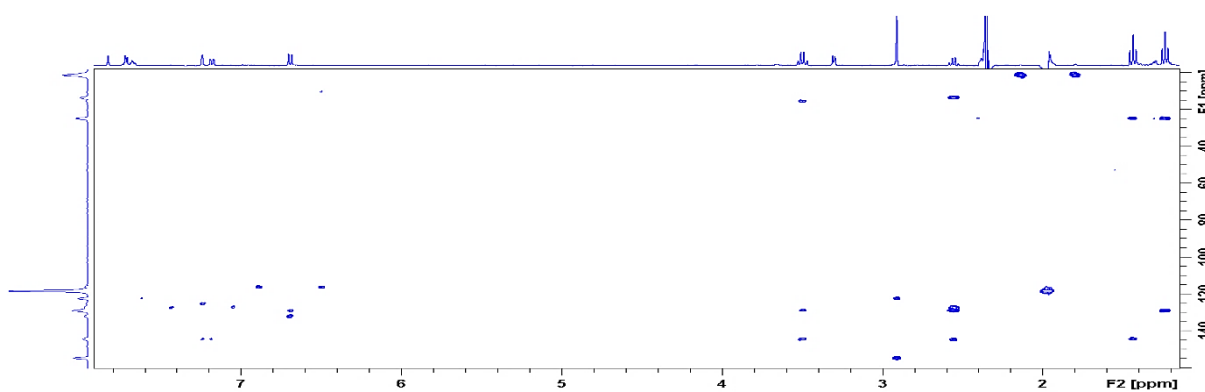
Slika D16. Spektar ESI-MS spoja 9 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

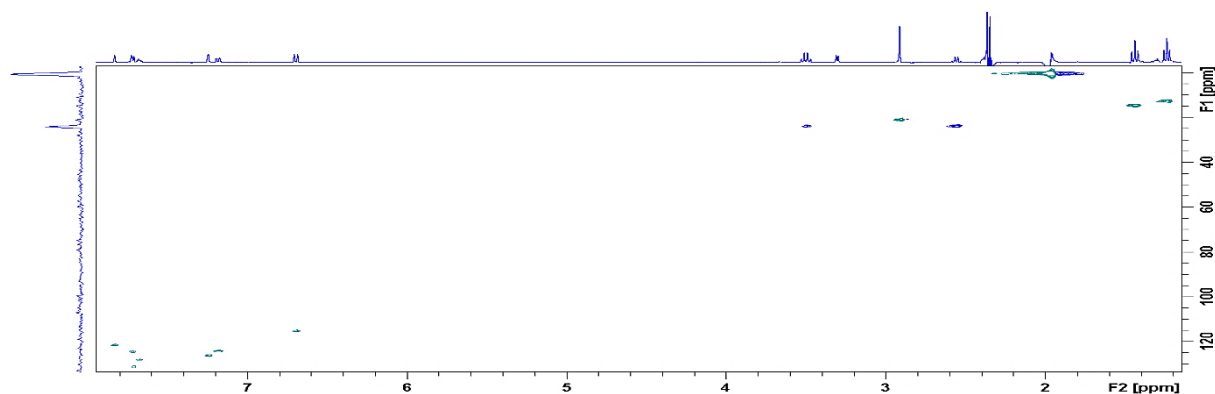
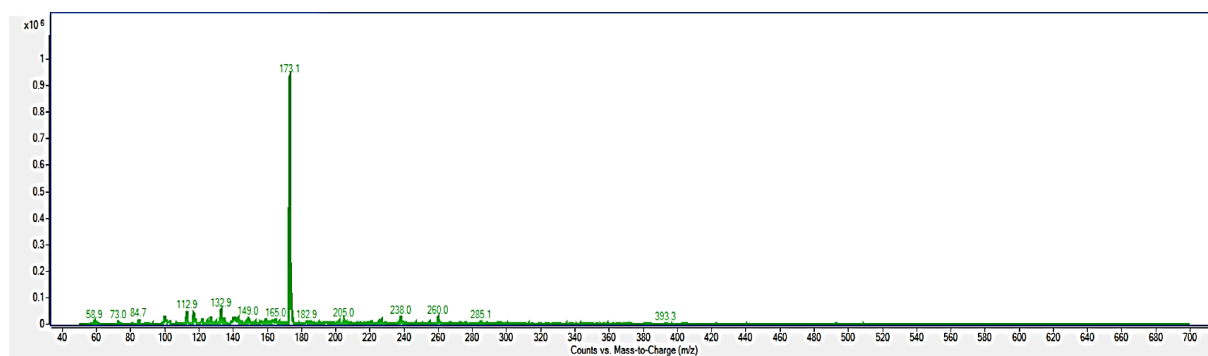
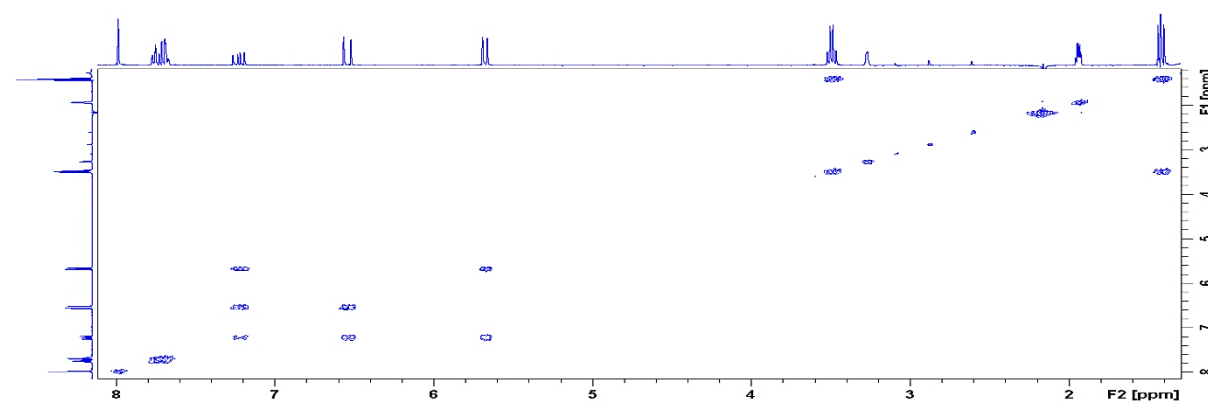


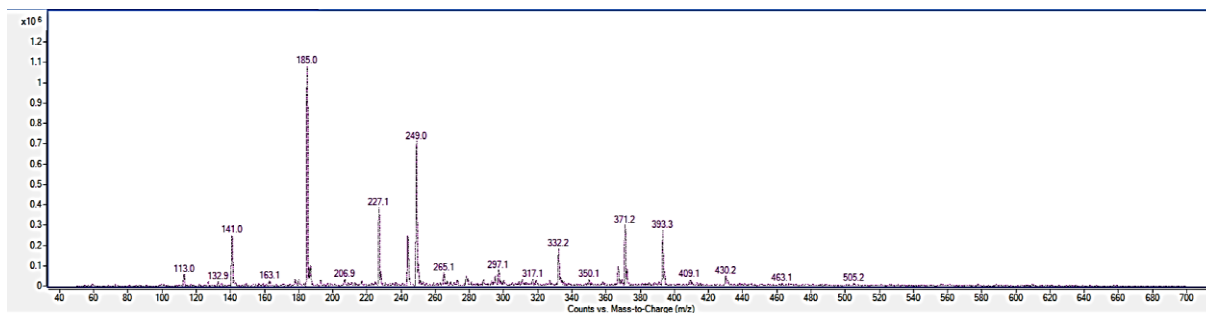
Slika D17. Spektar COSY spoja 3 u acetonitrilu-d3 pri 298 K.



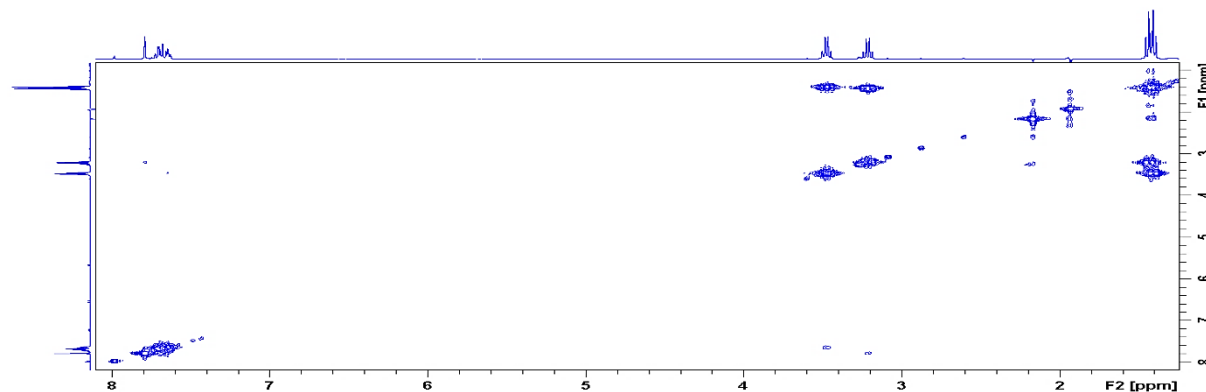
Slika D18. Spektar ESI-MS spoja 3 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

Slika D19. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja 4 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

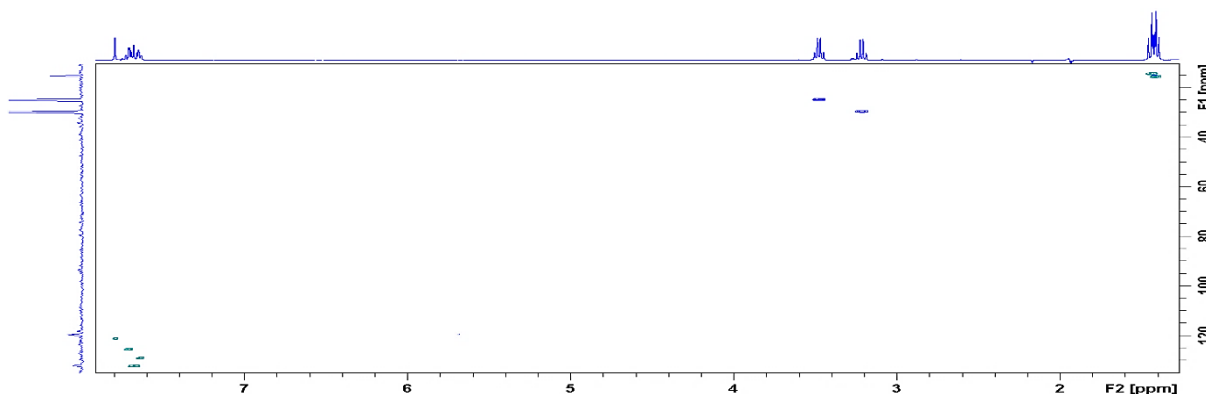
Slika D20. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **4** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D21. Spektar ESI-MS spoja **4** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D22. Spektar COSY spoja **6** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



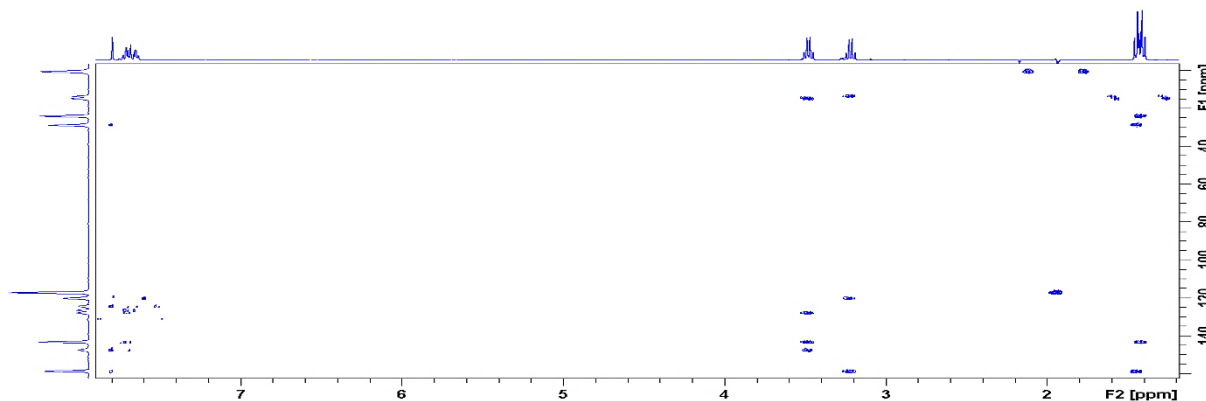
Slika D23. Spektar ESI-MS spoja 6 snimljen uz pozitivnu ionizaciju



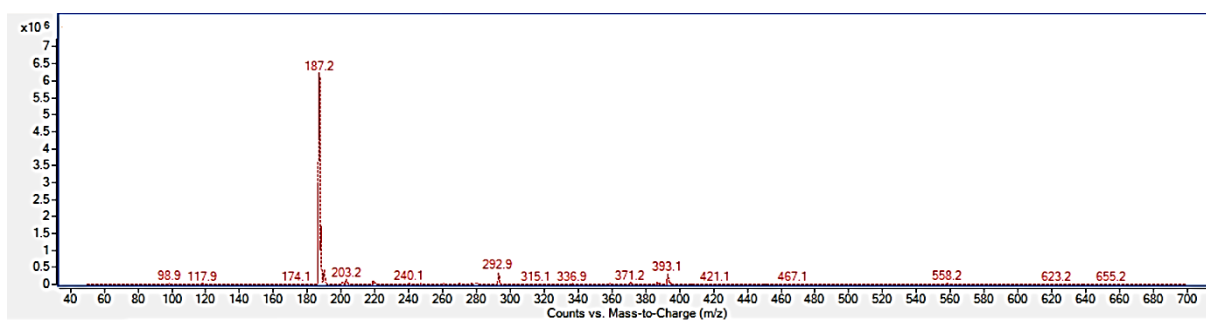
Slika D24. Spektar COSY spoja 7 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



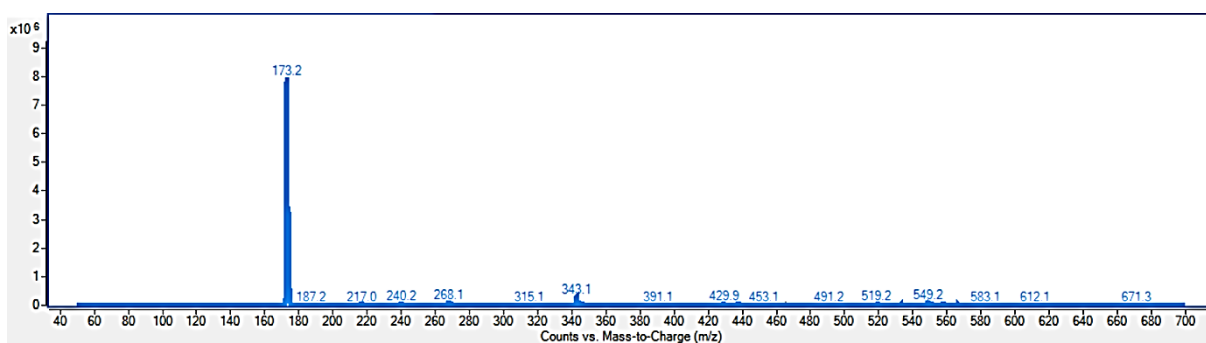
Slika D25. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja 7 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



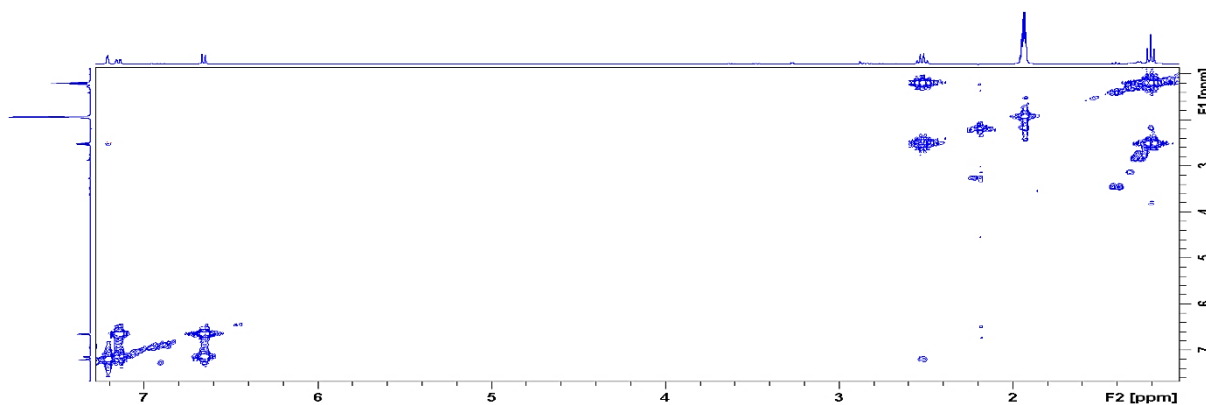
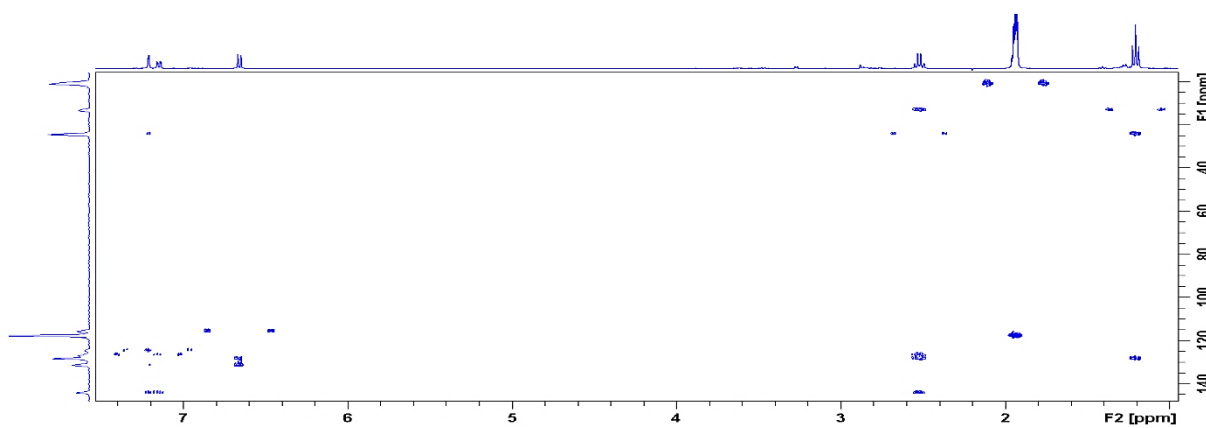
Slika D26. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja 7 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

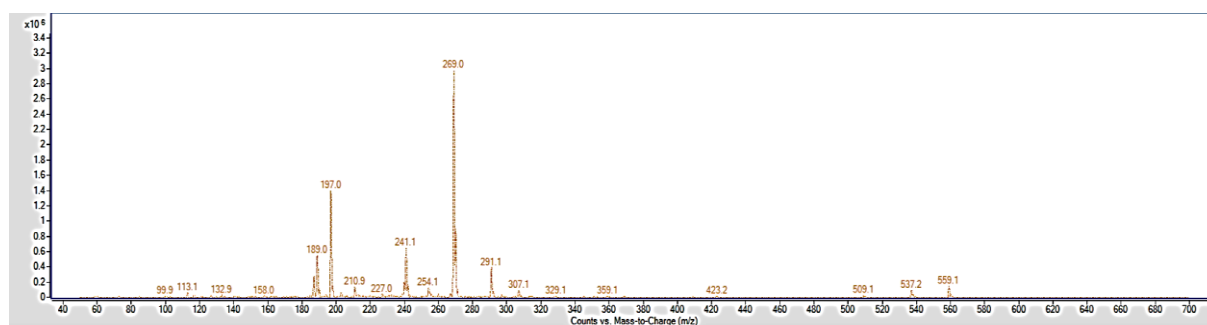


Slika D27. Spektar ESI-MS spoja 7 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

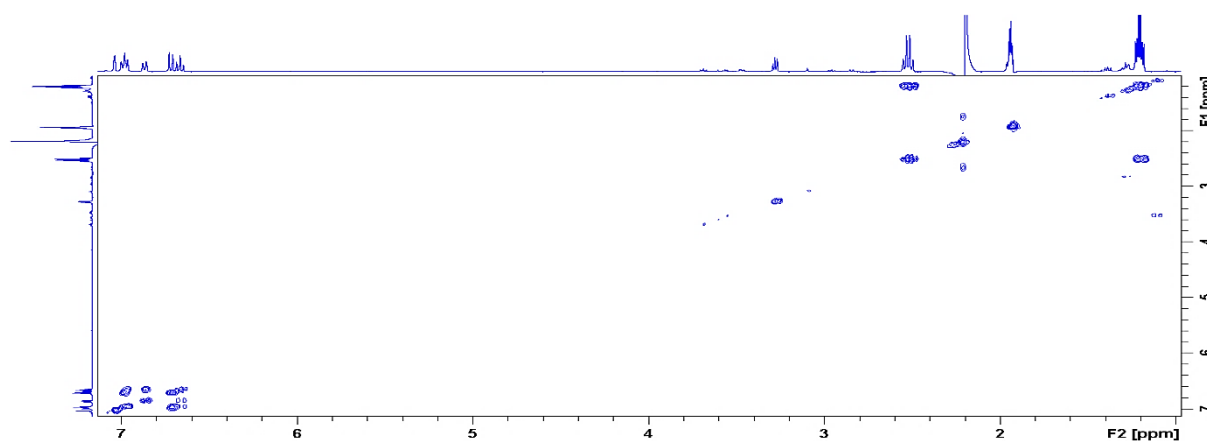


Slika D28. Spektar ESI-MS spoja 14 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

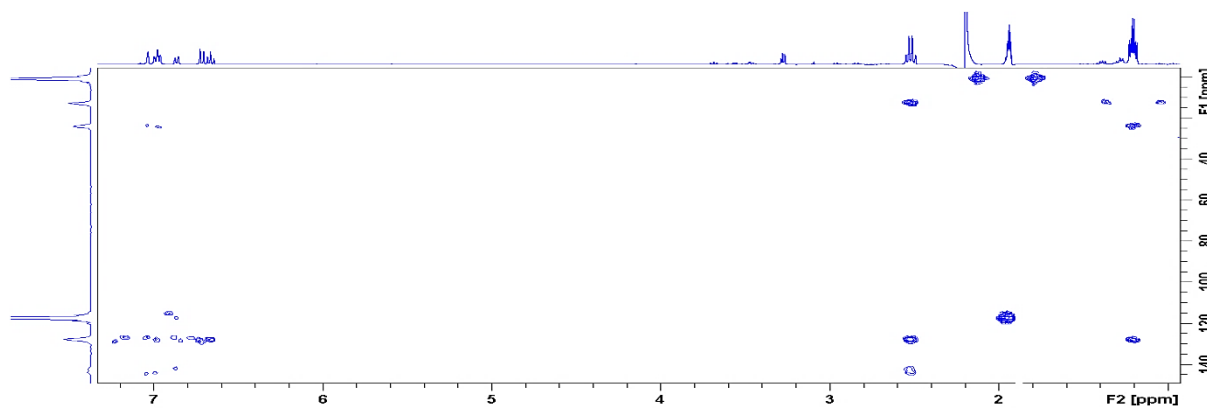
Slika D29. Spektar COSY spoja 5 u acetonitrilu-d₃ pri 298 KSlika D30. Spektar ¹H-¹³C HMBC spoja 5 u acetonitrilu-d₃ pri 298 K

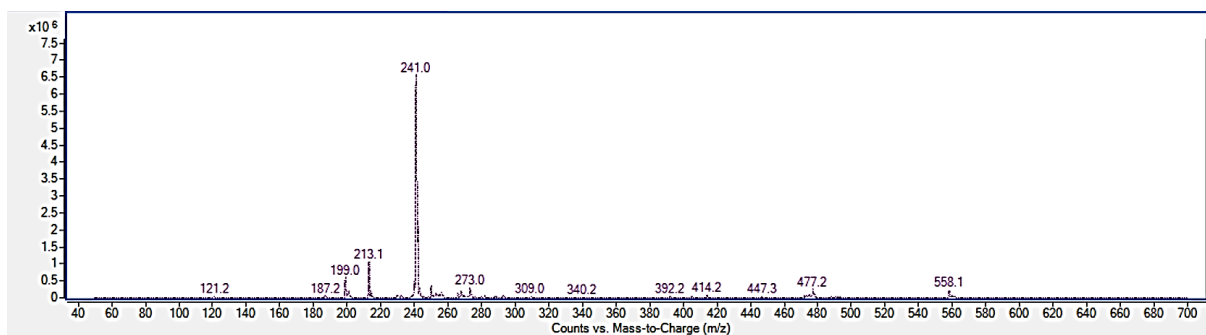


Slika D31. Spektar ESI-MS spoja 5 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

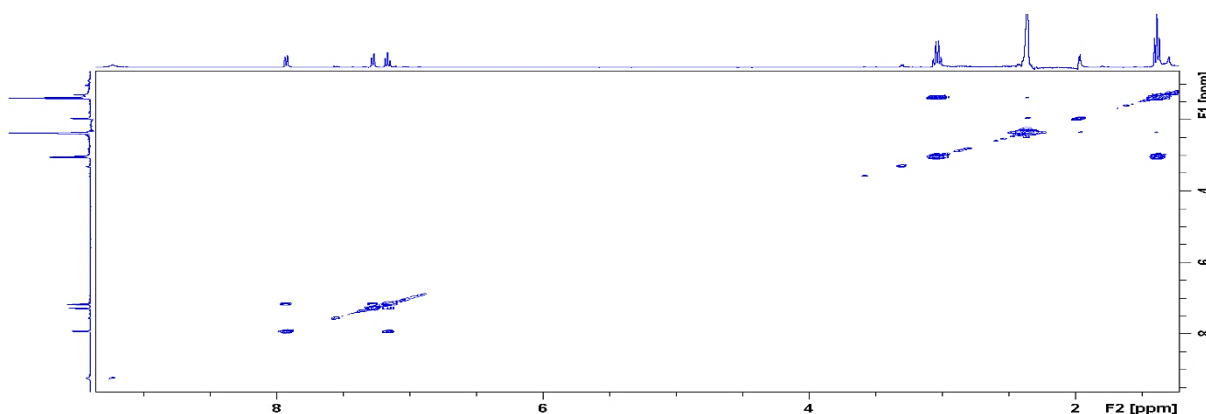


Slika D32. Spektar COSY spoja 10 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

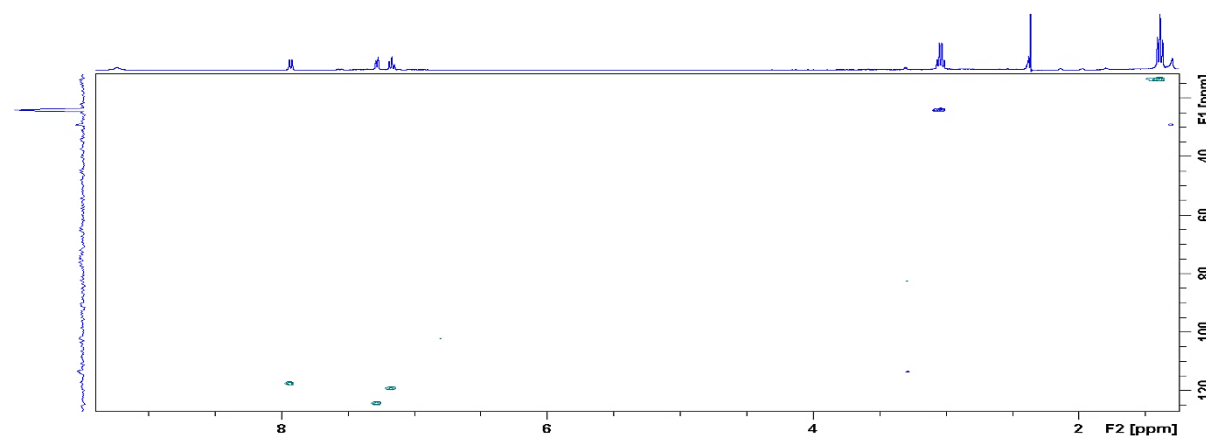
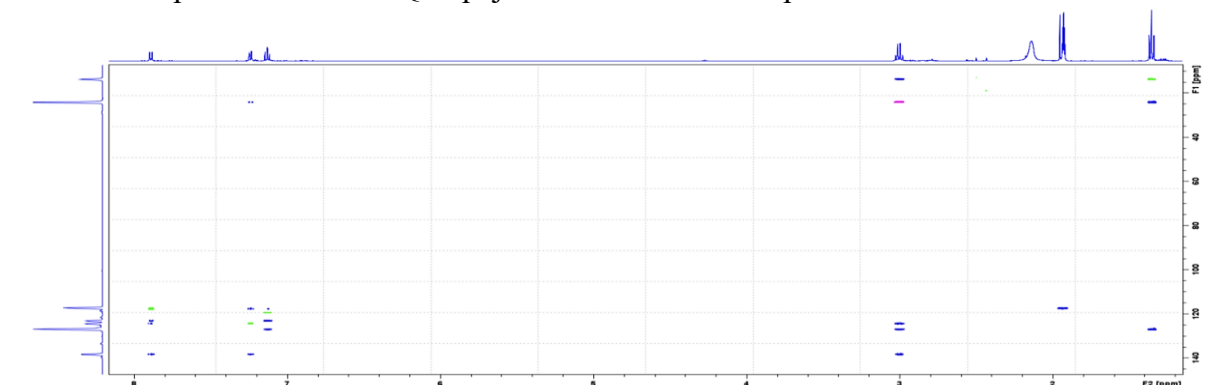
Slika D33. Spektar ¹H-¹³C HMBC spoja 10 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

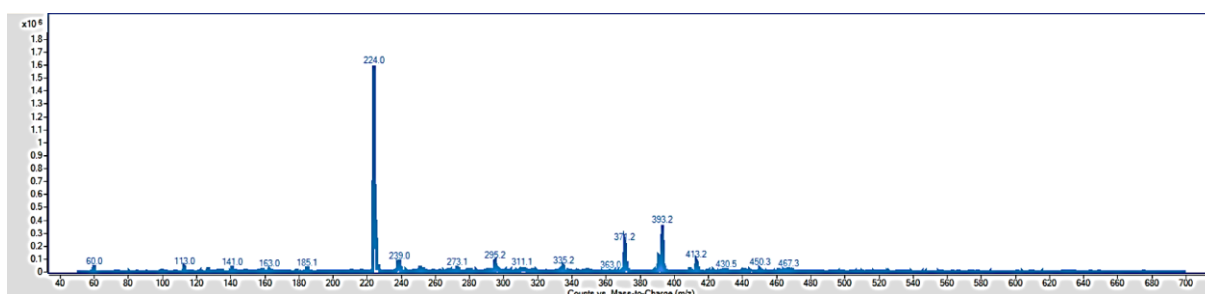
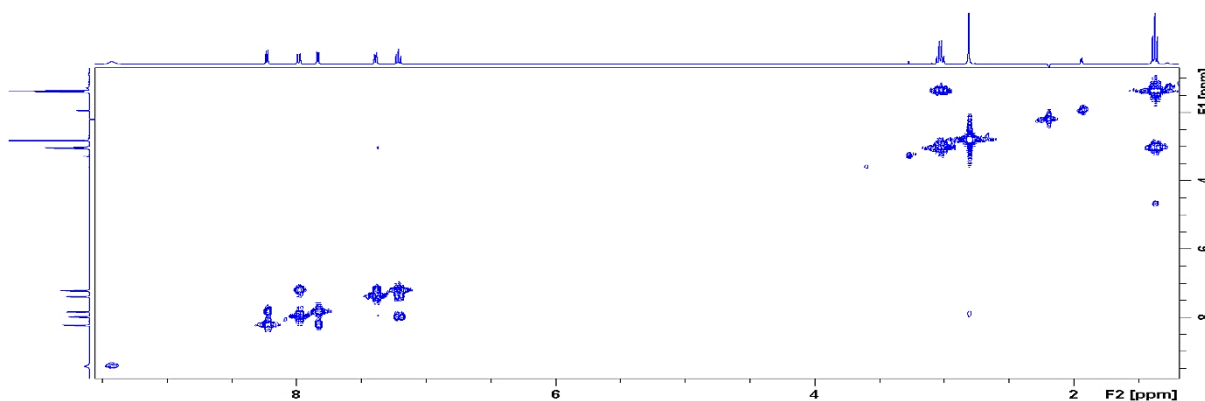
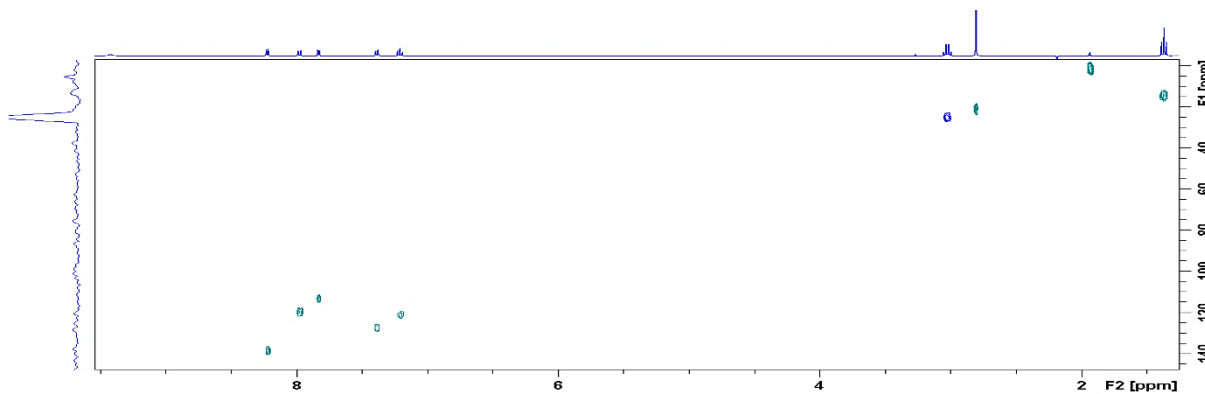
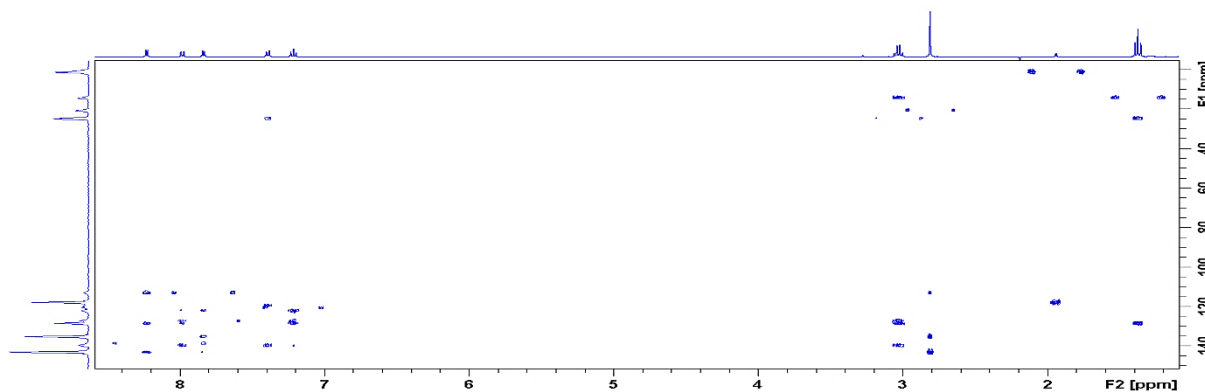


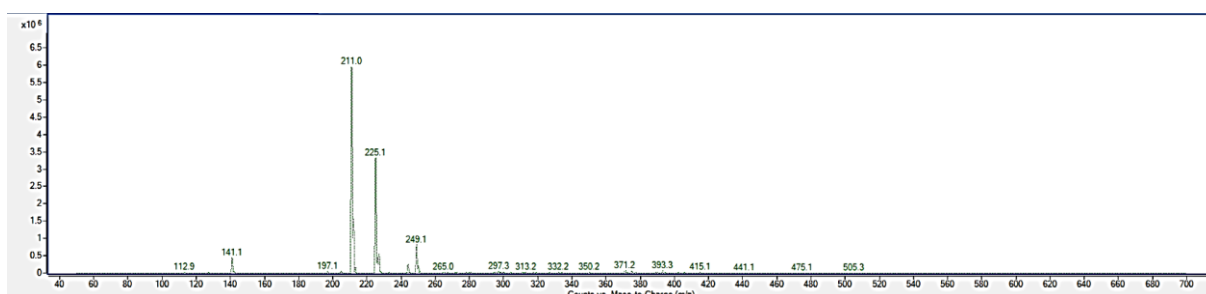
Slika D34. Spektar ESI-MS spoja 10 snimljen uz pozitivnu ionizaciju



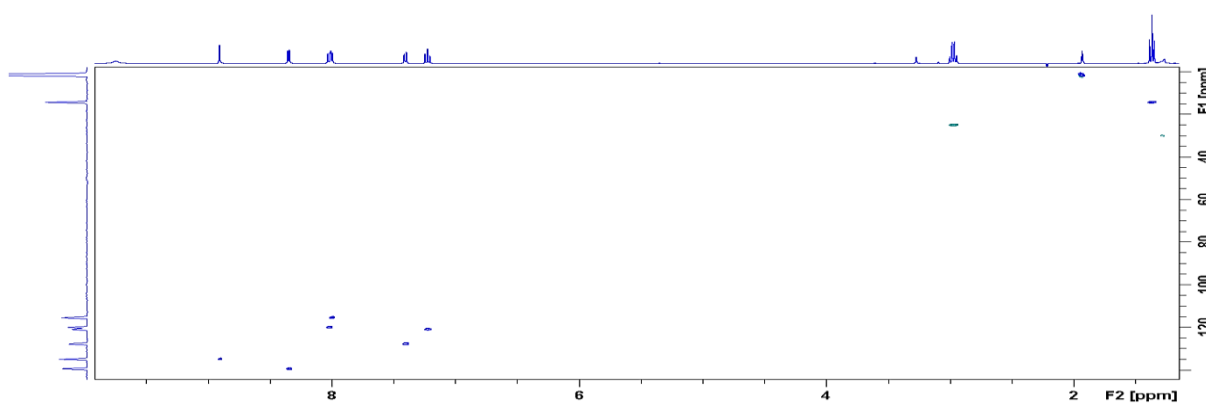
Slika D35. Spektar COSY spoja 12 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

Slika D36. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja 12 u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D37. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja 12 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

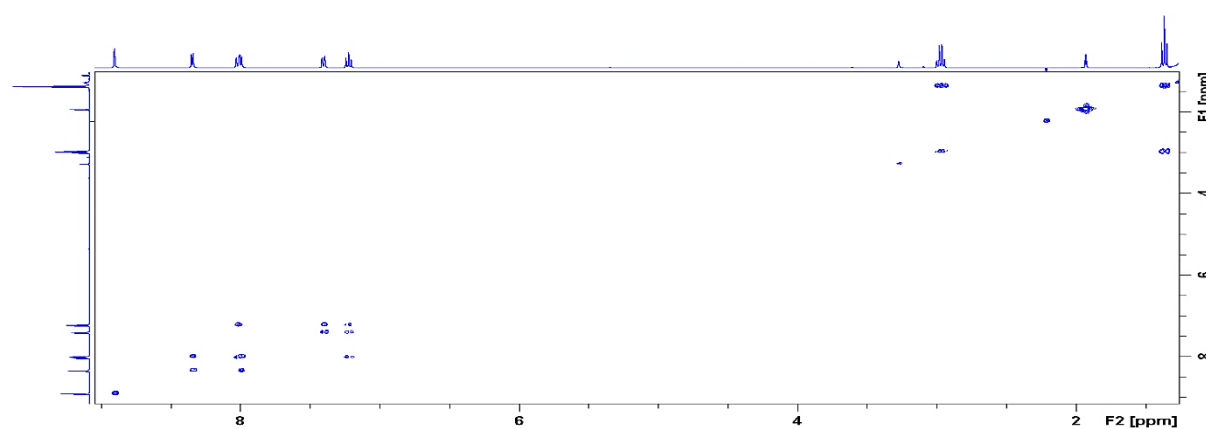
Slika D38. Spektar ESI-MS spoja **12** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D39. Spektar COSY spoja **16** u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D40. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **16** u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D41. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja **16** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



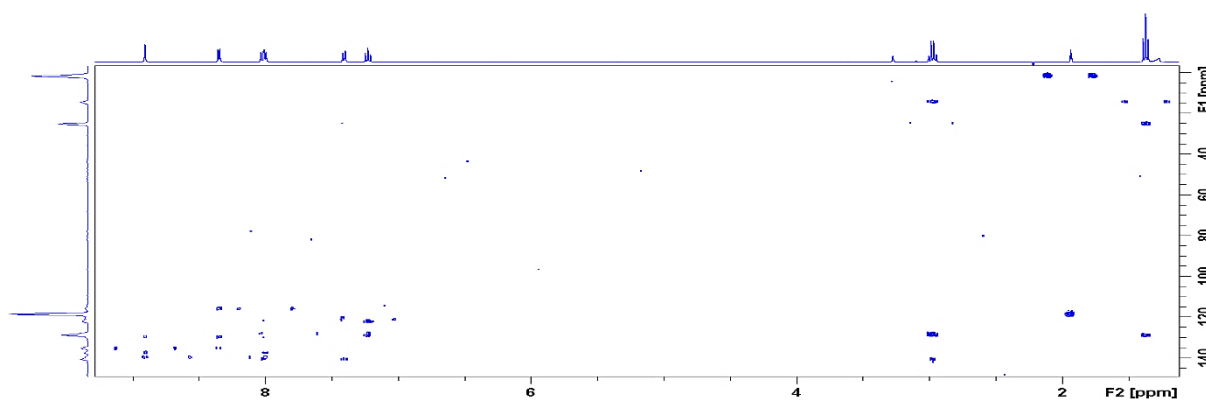
Slika D42. Spektar ESI-MS spoja **16** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



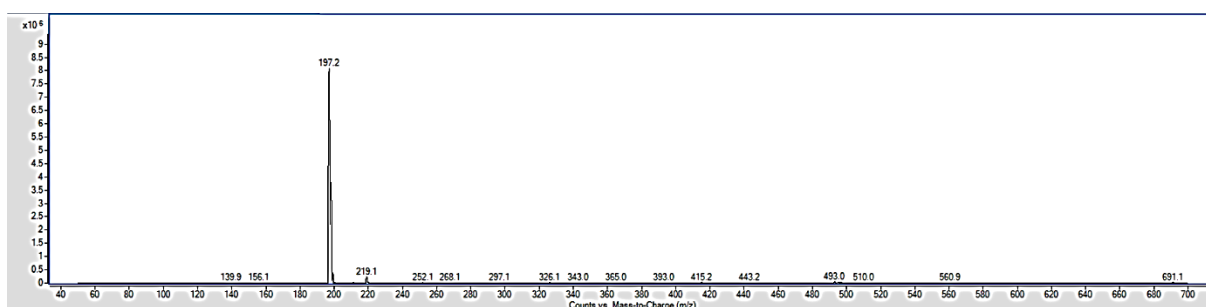
Slika D43. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC spoja **15** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



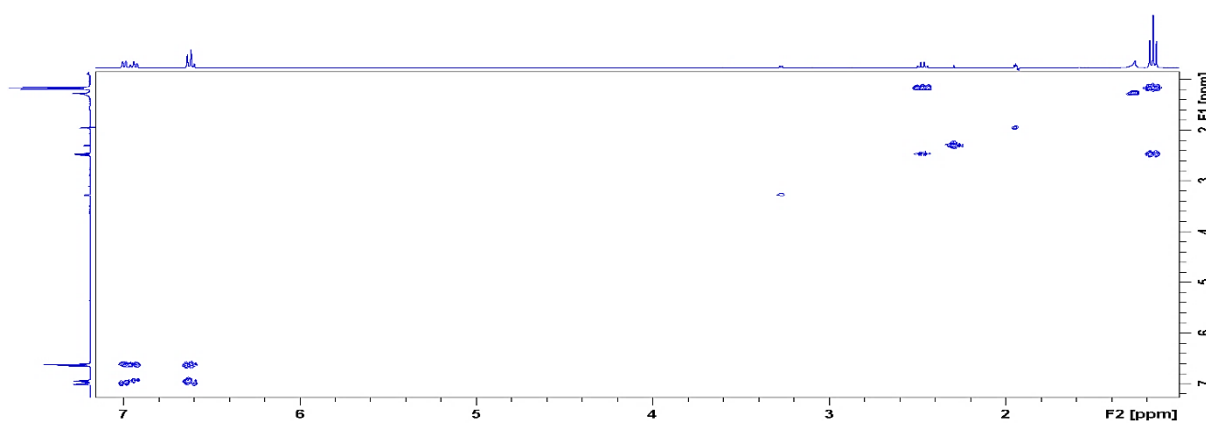
Slika D44. Spektar COSY spoja **15** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



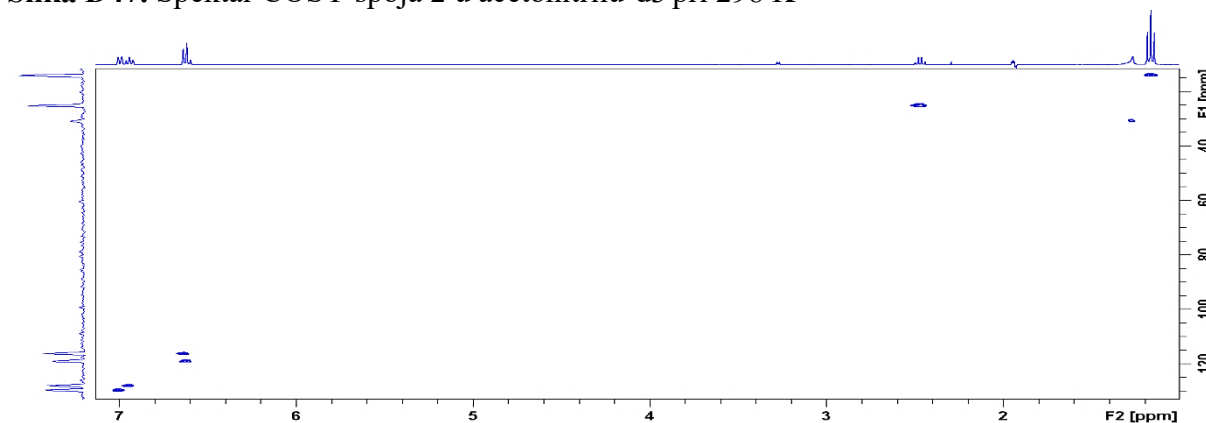
Slika D45. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja **15** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



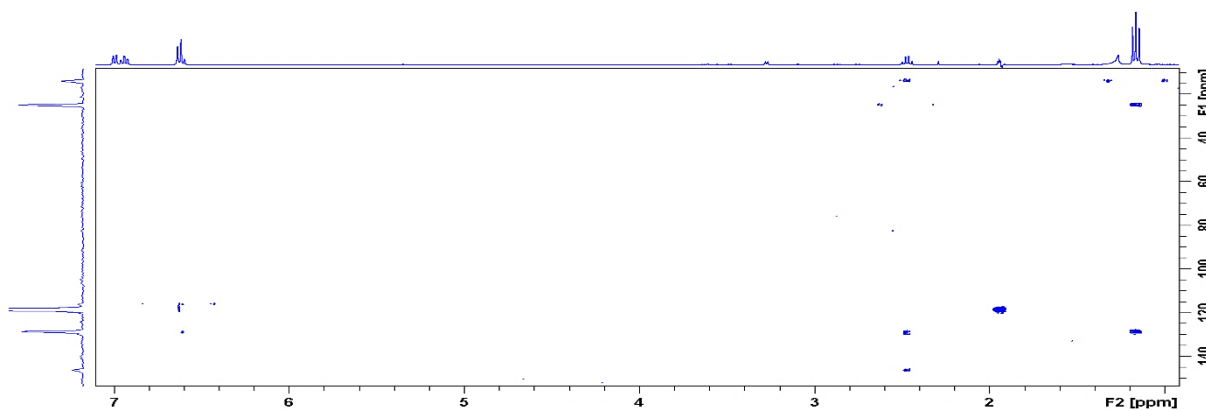
Slika D46. Spektar ESI-MS spoja 15 snimljen uz pozitivnu ionizaciju



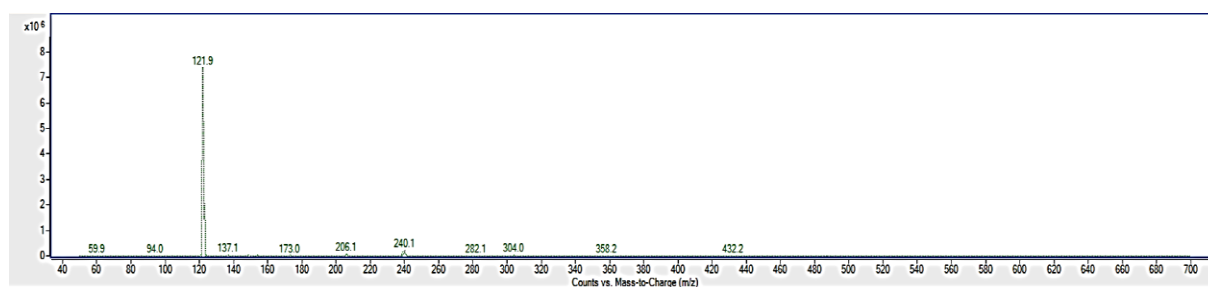
Slika D47. Spektar COSY spoja 2 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



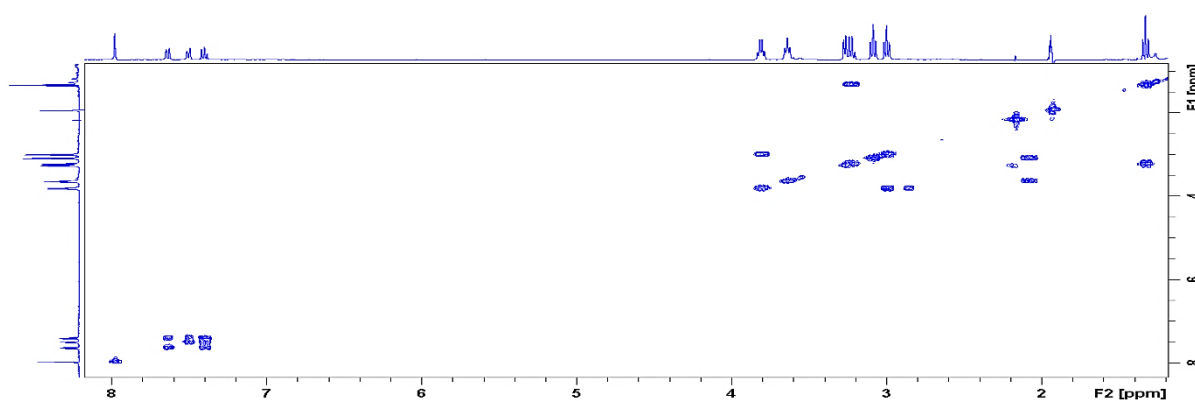
Slika D48. Spektar ¹H-¹³C HSQC spoja 2 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



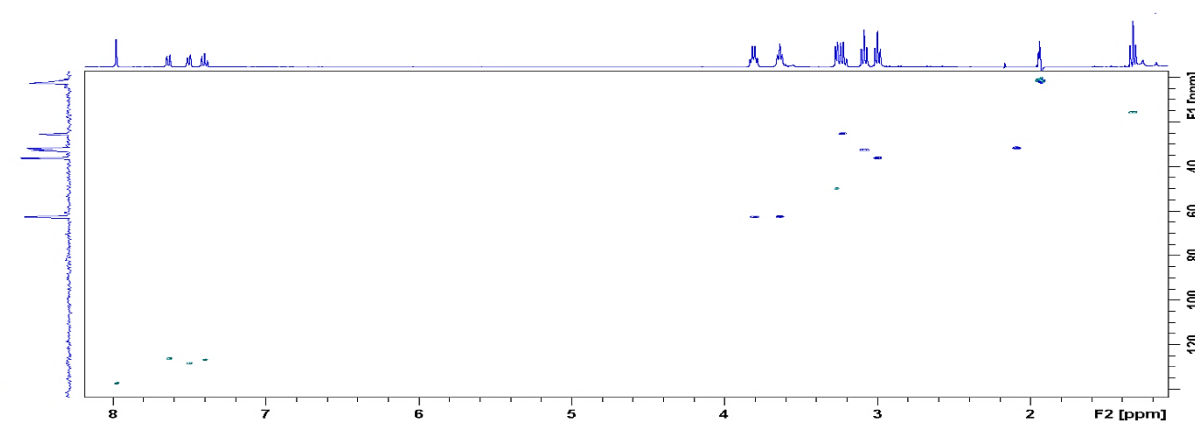
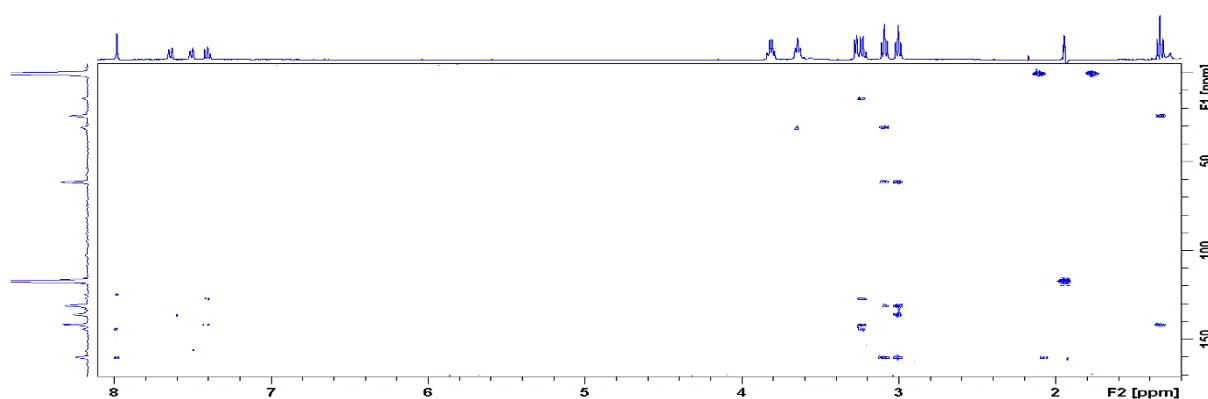
Slika D49. Spektar ¹H-¹³C HMBC spoja 2 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

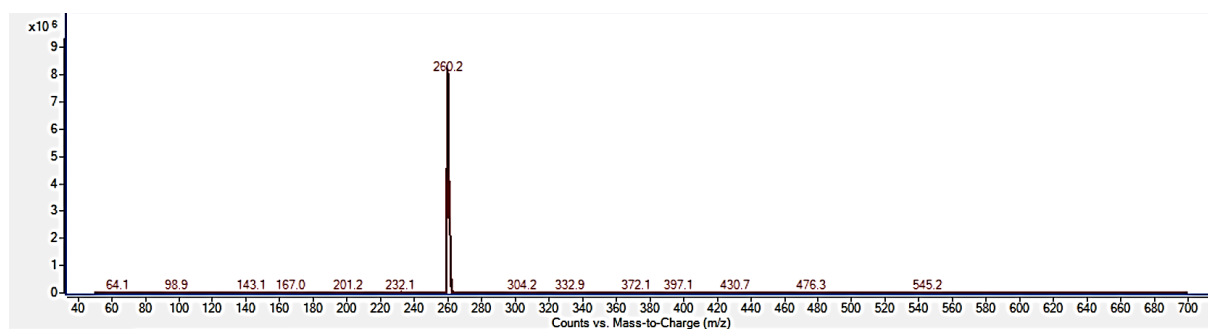


Slika D50. Spektar ESI-MS spoja 2 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

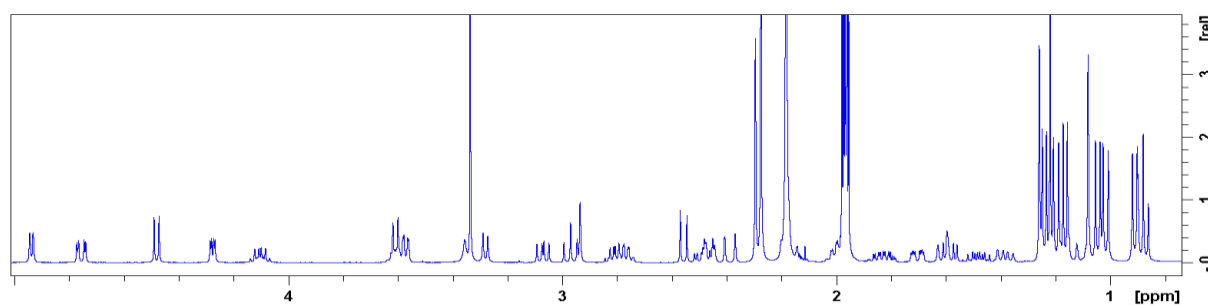


Slika D51. Spektar COSY spoja 17 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

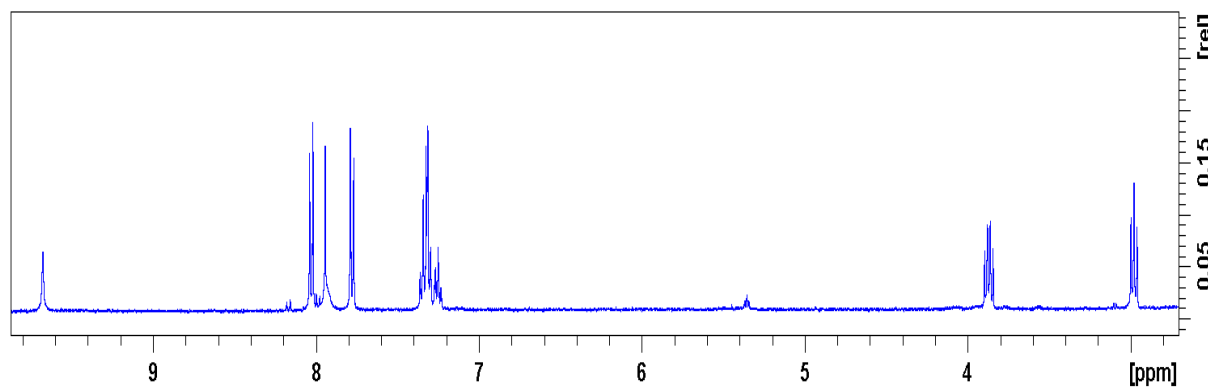
Slika D52. Spektar ¹H-¹³C HSQC spoja 17 u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D53. Spektar ¹H-¹³C HMBC spoja 17 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



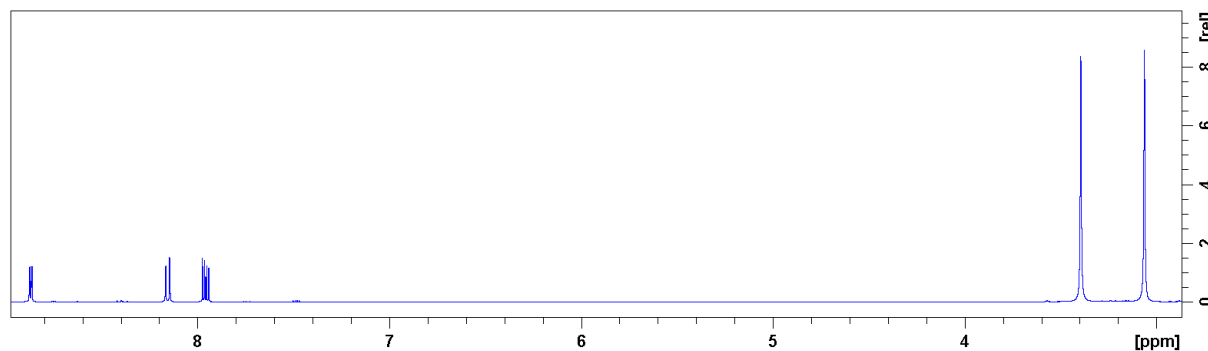
Slika D54. Spektar ESI-MS spoja **17** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



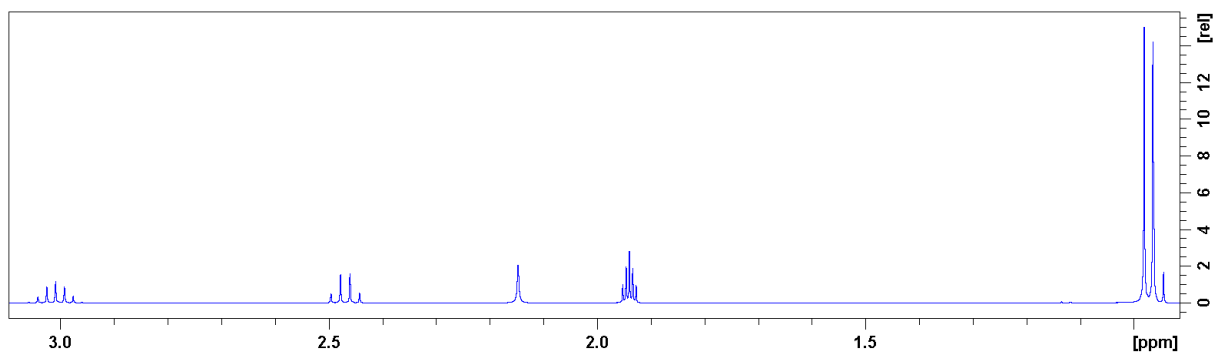
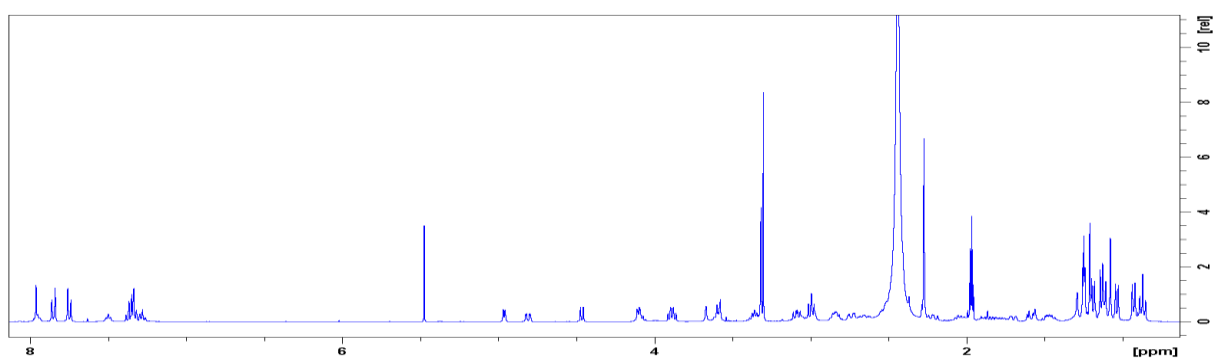
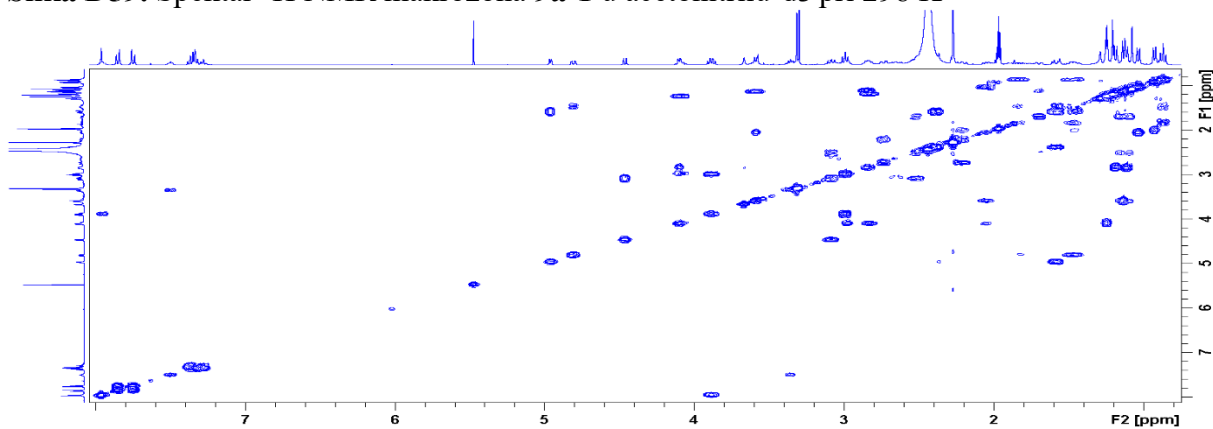
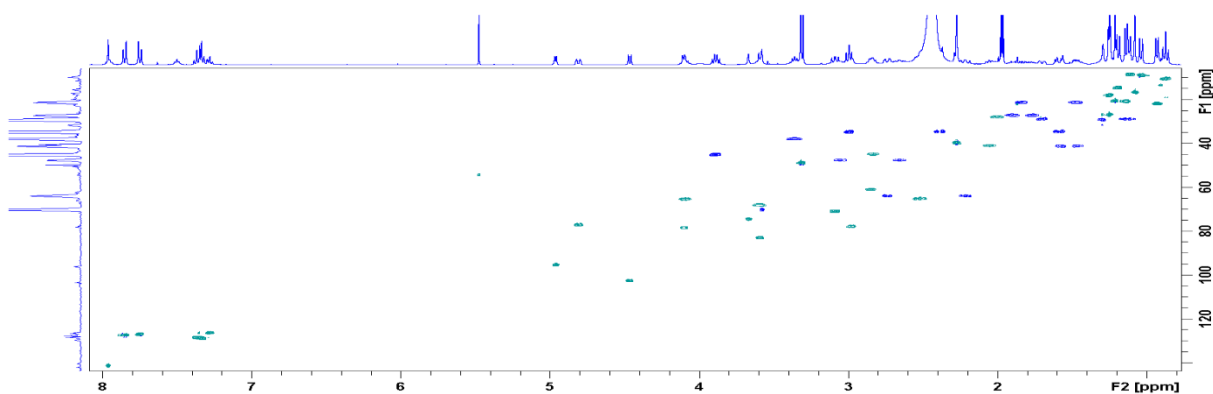
Slika D55. Spektar ¹H NMR spoja **9a**-(γ -aminopropil) azitromicin u acetonitrilu- d₃ pri 298 K

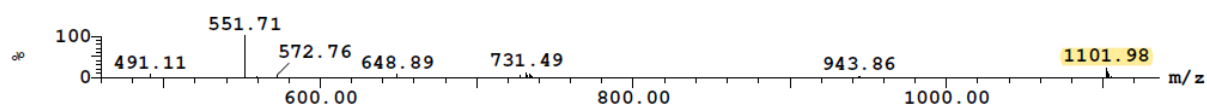
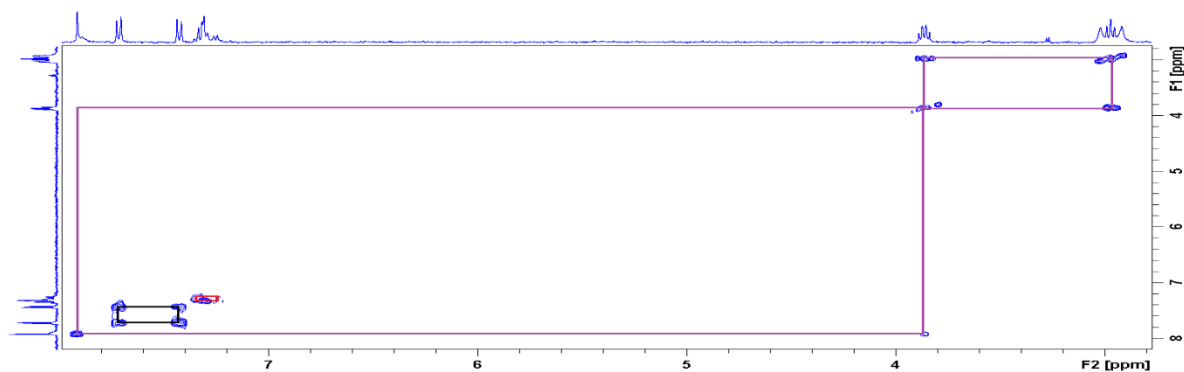
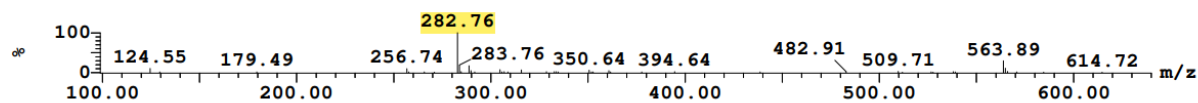
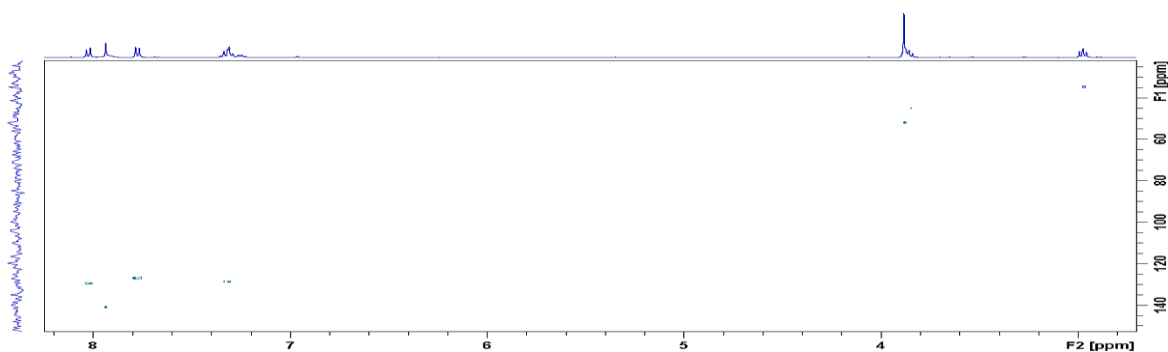
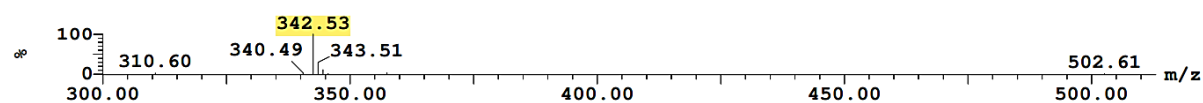


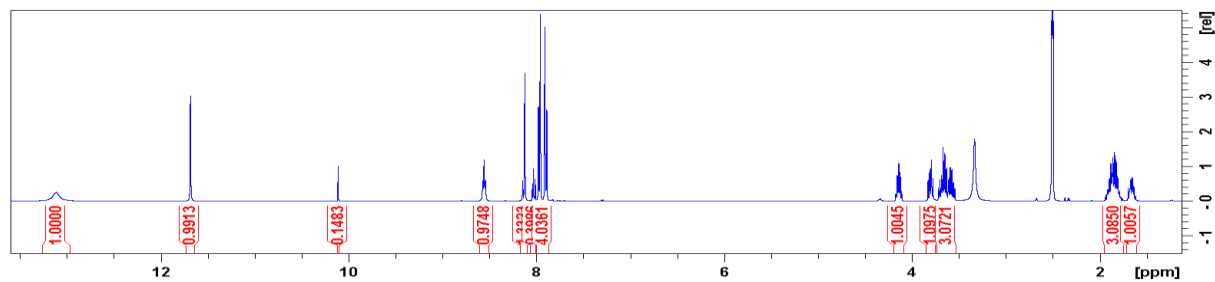
Slika D56. Spektar ¹H NMR spoja etilfenil tiosemikarbazid u acetonitrilu- d₃ pri 298 K



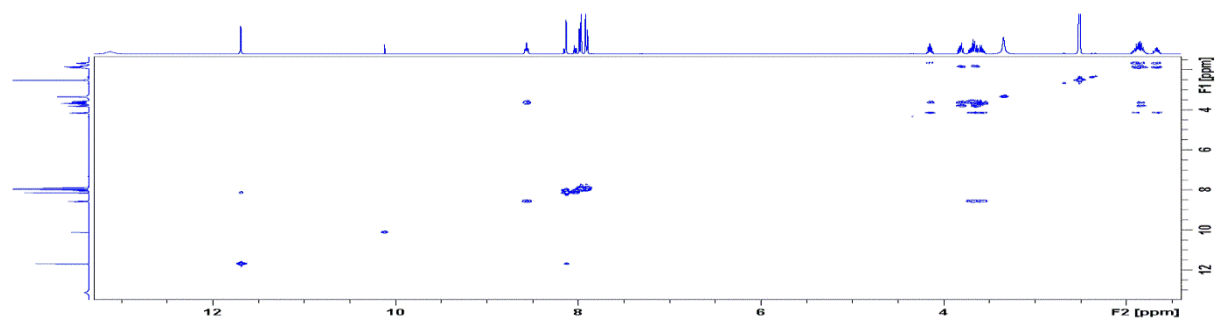
Slika D57. Spektar ¹H NMR spoja HATU u acetonitrilu- d₃ pri 298 K

Slika D58. Spektar ^1H NMR spoja DIPEA u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D59. Spektar ^1H NMR makrozona **9a-1** u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D60. Spektar COSY makrozona **9a-1** u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D61. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC makrozona **9a-1** u acetonitrilu-d3 pri 298 K

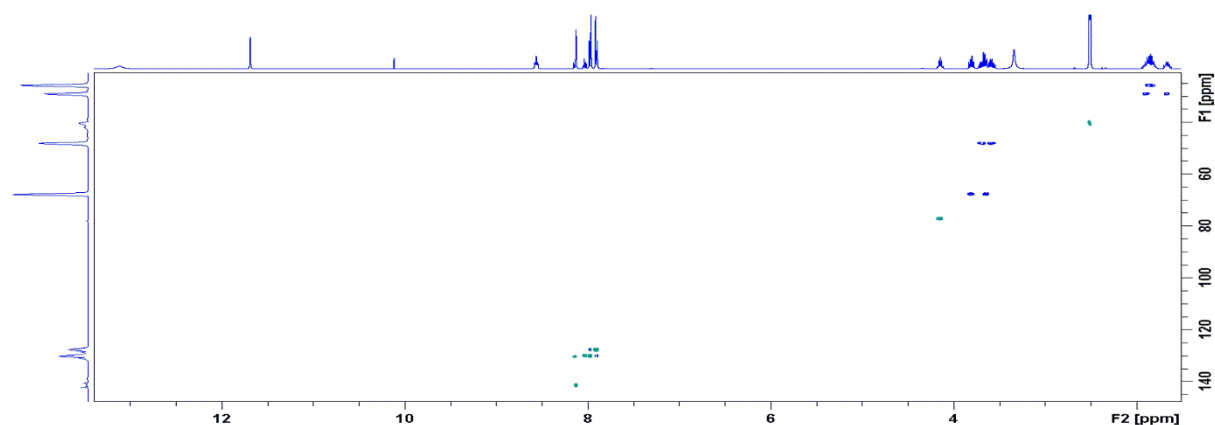
Slika D62. Spektar ESI-MS makrozona **9a-1** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D63. Spektar COSY izoliranog spoja **9a-1-a** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D64. Spektar ESI-MS izoliranog spoja **9a-1-a** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D65. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC izoliranog spoja **9a-1-c** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D66. Spektar ESI-MS izoliranog spoja **9a-1-c** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



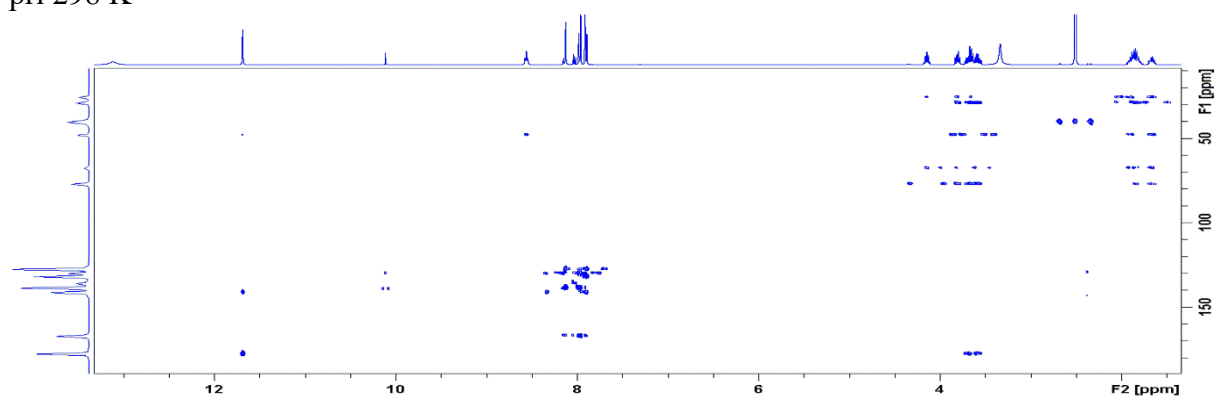
Slika D67. Spektar ^1H NMR tetrahidrofurfuril tiosemikarbazida u dimetilsulfoksidu- d_6 pri 298 K



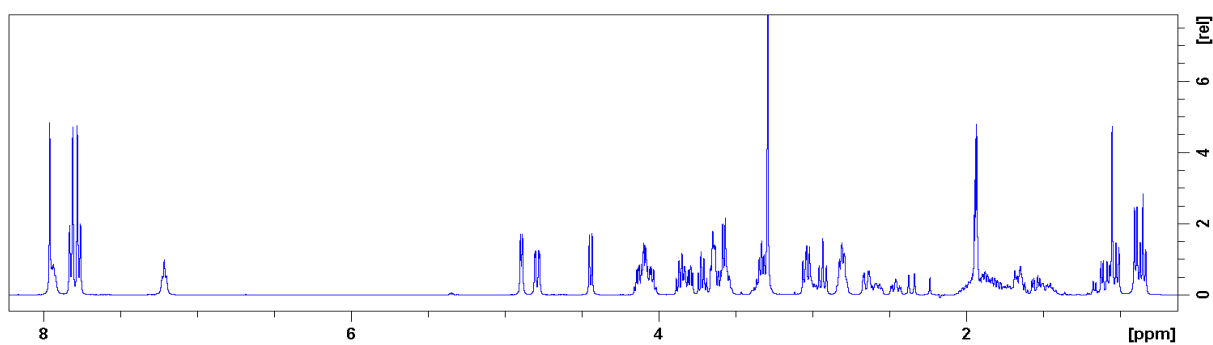
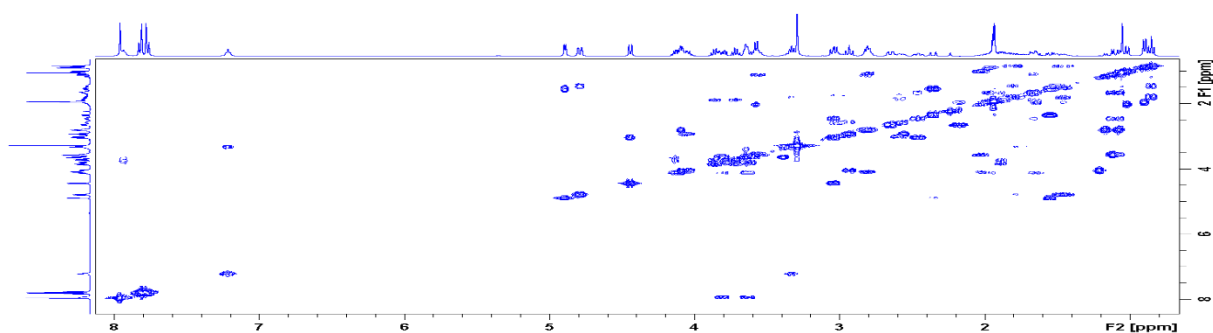
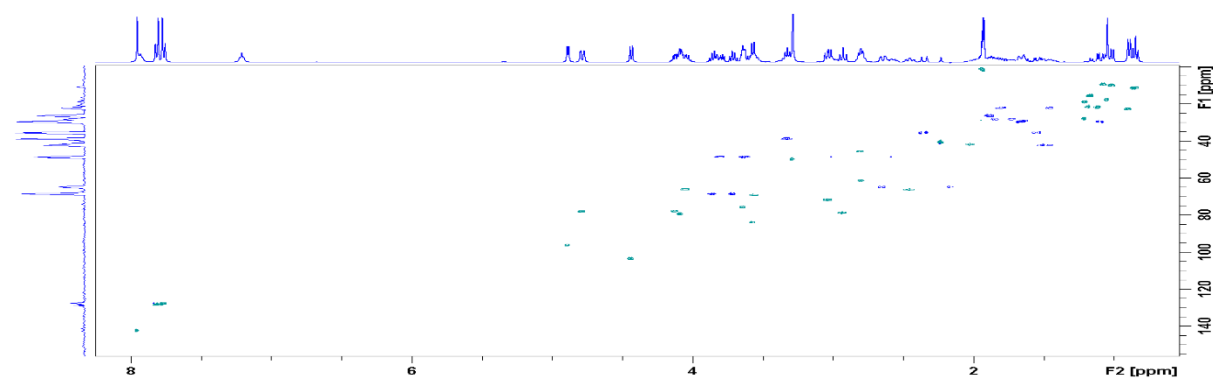
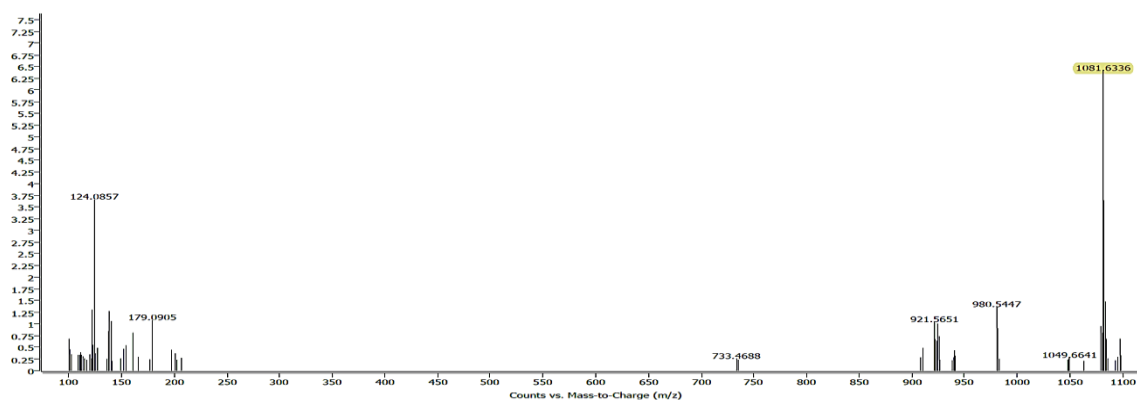
Slika D68. Spektar COSY tetrahidrofurfuril tiosemikarbazida u dimetilsulfoksidu- d_6 pri 298 K

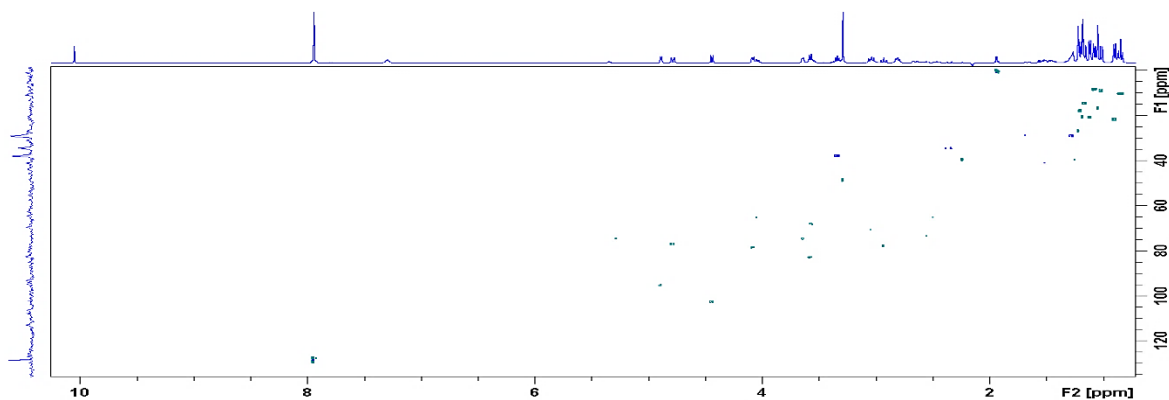
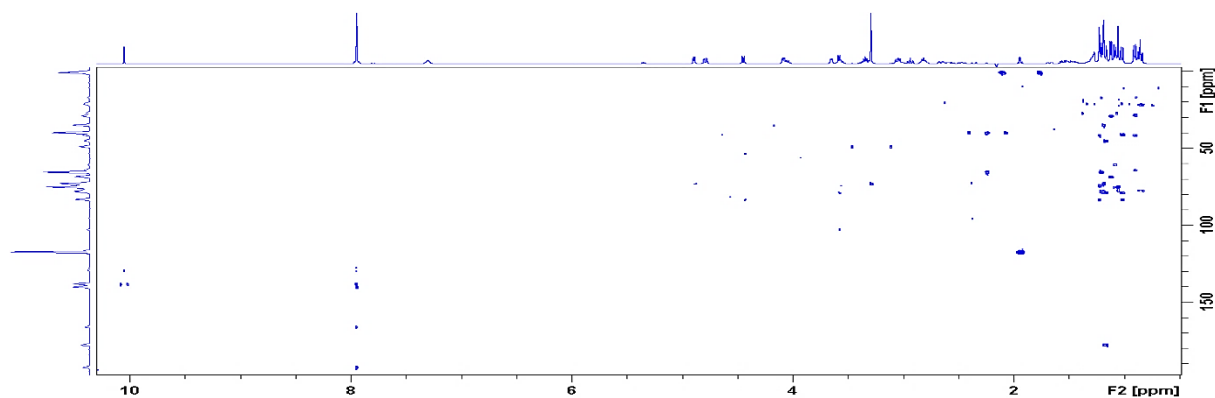
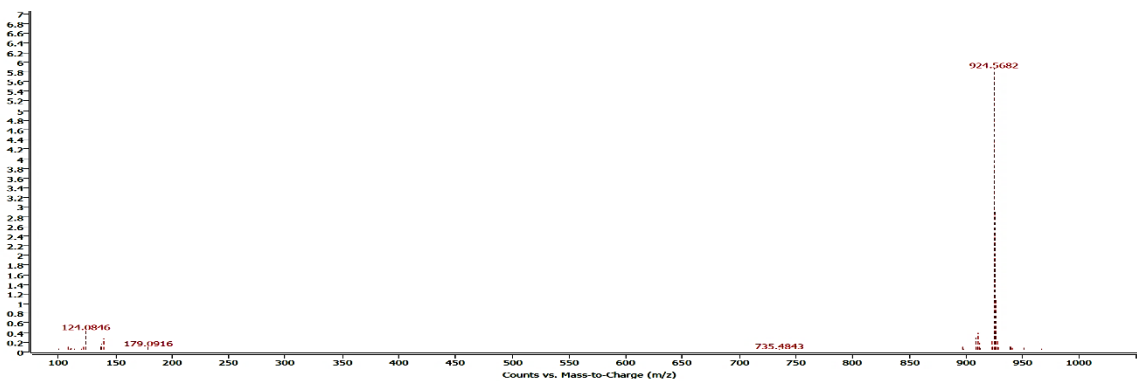
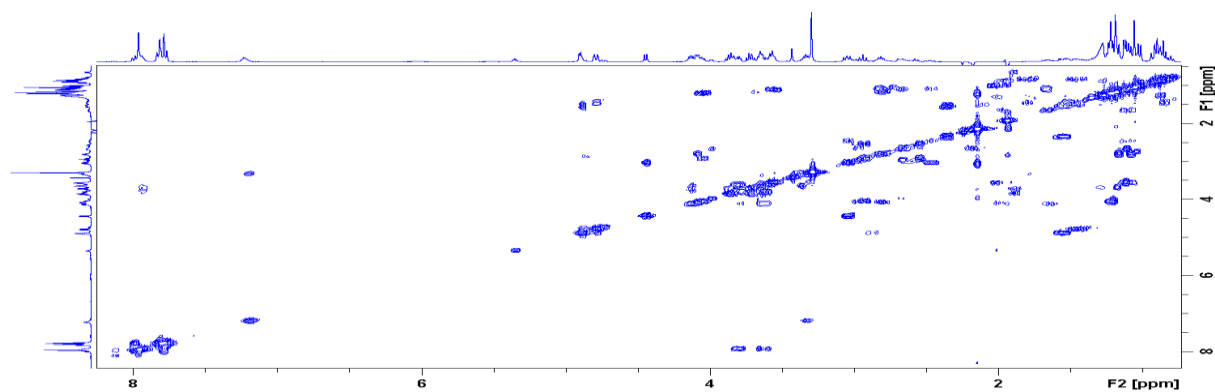


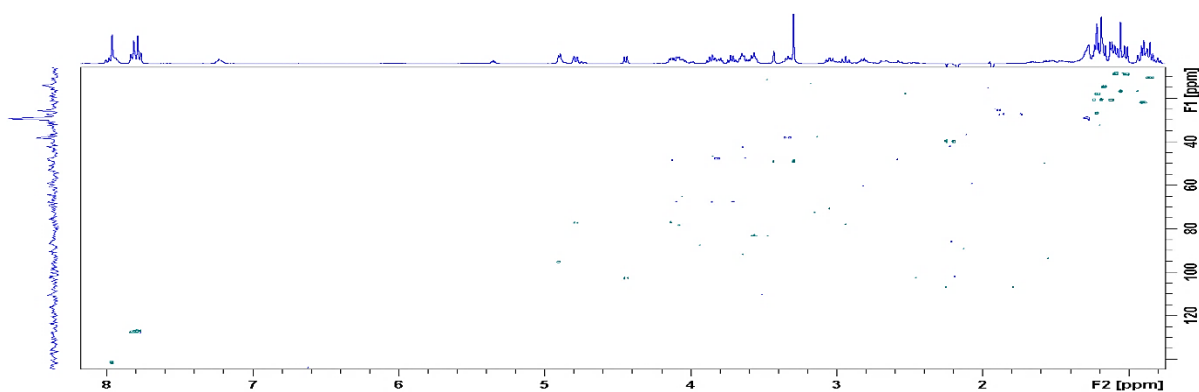
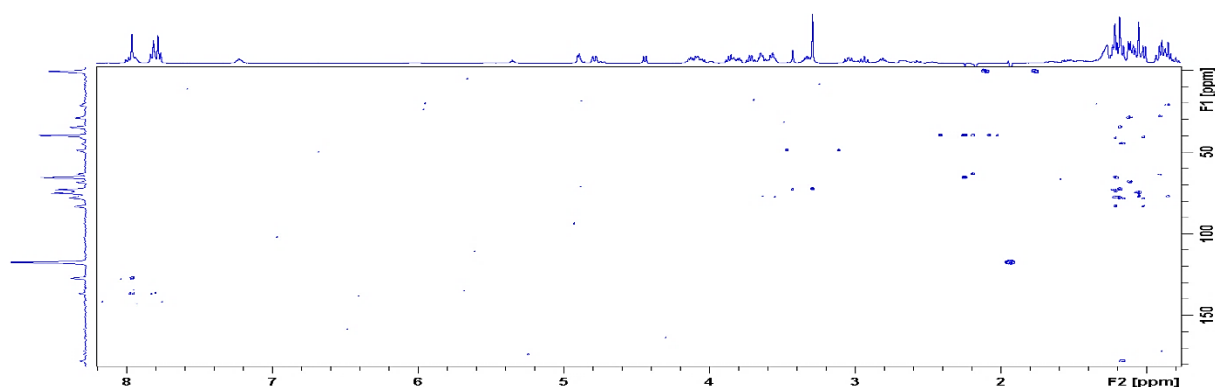
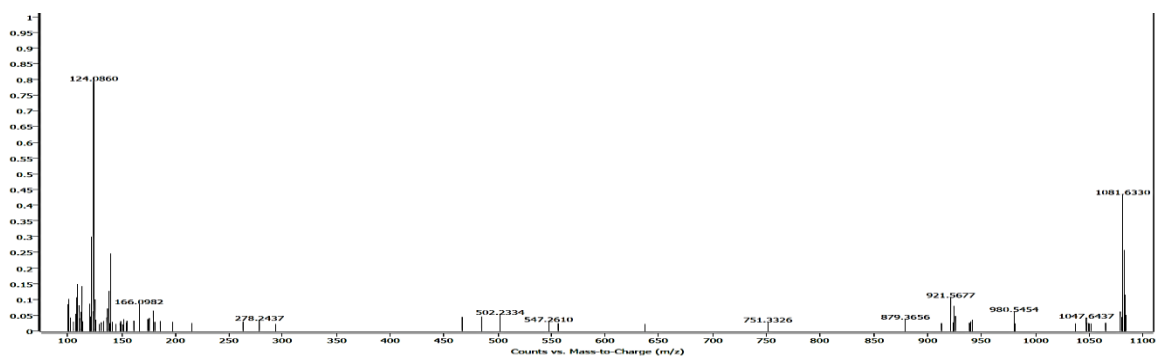
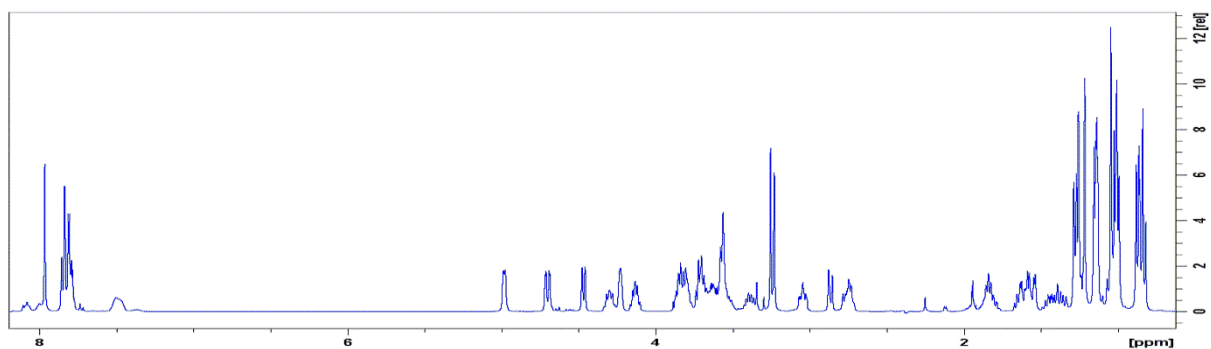
Slika D69. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC tetrahidrofurfuril tiosemikarbazida u dimetilsulfoksidu- d_6 pri 298 K

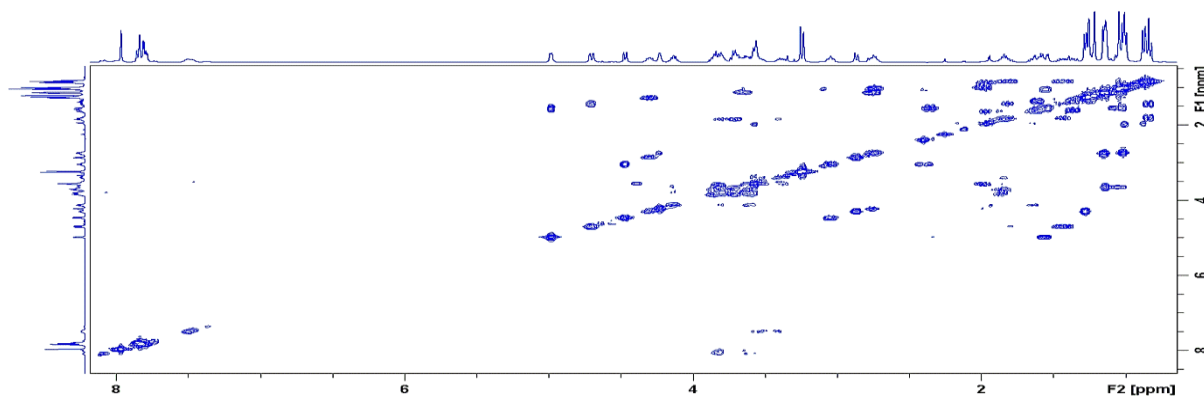


Slika D70. Spektar HMBC tetrahidrofurfuril tiosemikarbazida u dimetilsulfoksidu- d_6 pri 298 K

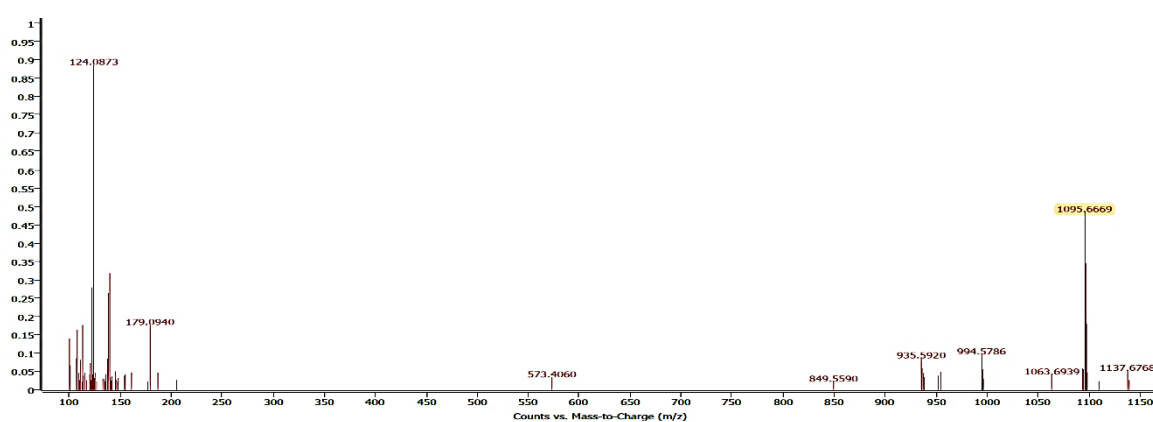
Slika D71. Spektar ^1H NMR makrozona **9a-16** u acetonitrilu-d₃ pri 298 KSlika D72. Spektar COSY makrozona **9a-16** u acetonitrilu-d₃ pri 298 KSlika D73. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC makrozona **9a-16** u acetonitrilu-d₃ pri 298 KSlika D74. Spektar ESI-MS makrozona **9a-16** snimljen uz pozitivnu ionizaciju

Slika D75. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **9a-16-a** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D76. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **9a-16-a** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D77. Spektar ESI-MS onečišćenja **9a-16-a** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D78. Spektar COSY onečišćenja **9a-16-b** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

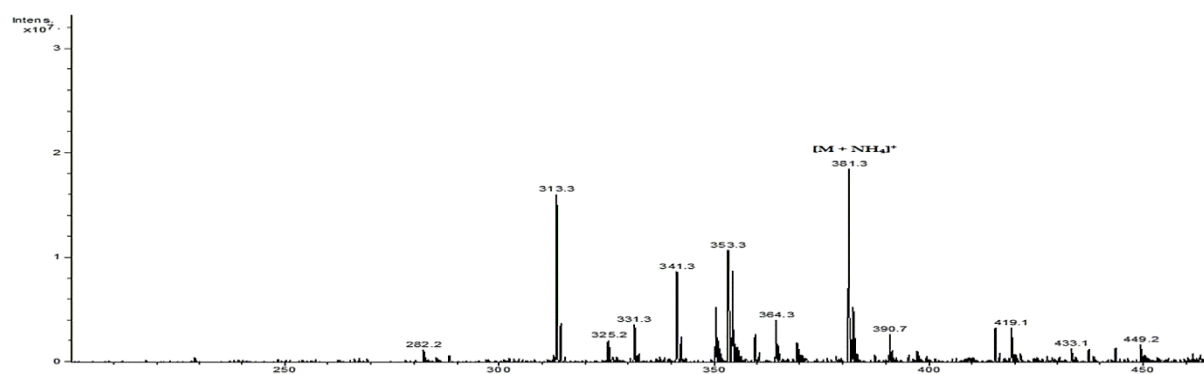
Slika D79. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **9a-16-b** u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D80. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **9a-16-b** u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D81. Spektar ESI-MS onečišćenja **9a-16-b** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D82. Spektar ^1H NMR makrozona **4''-16** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



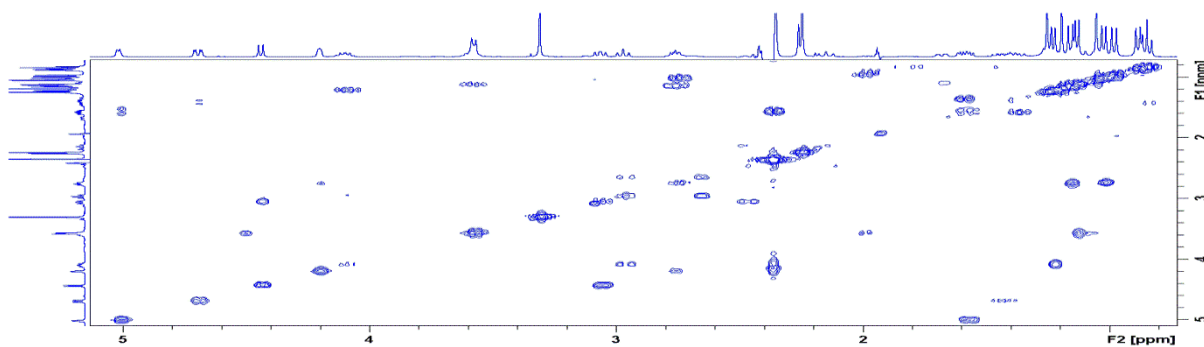
Slika D83. Spektar COSY makrozona 4''-16 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



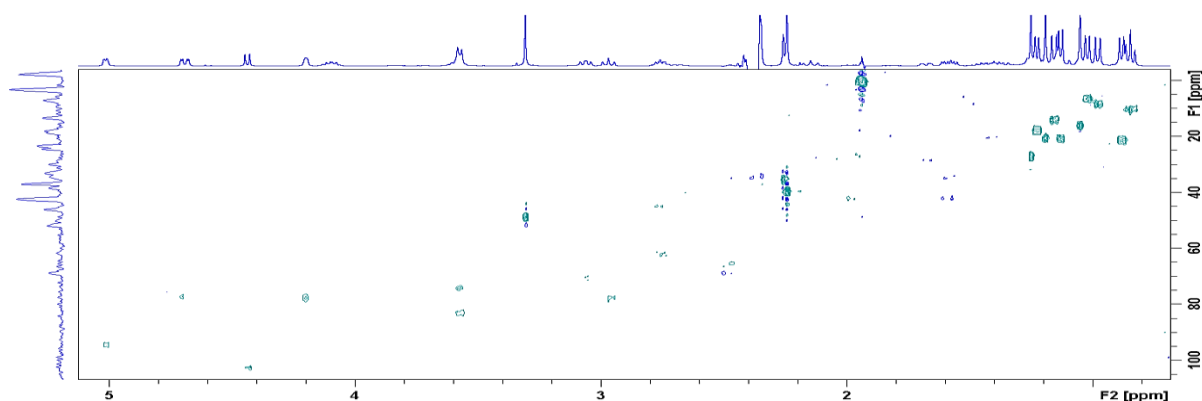
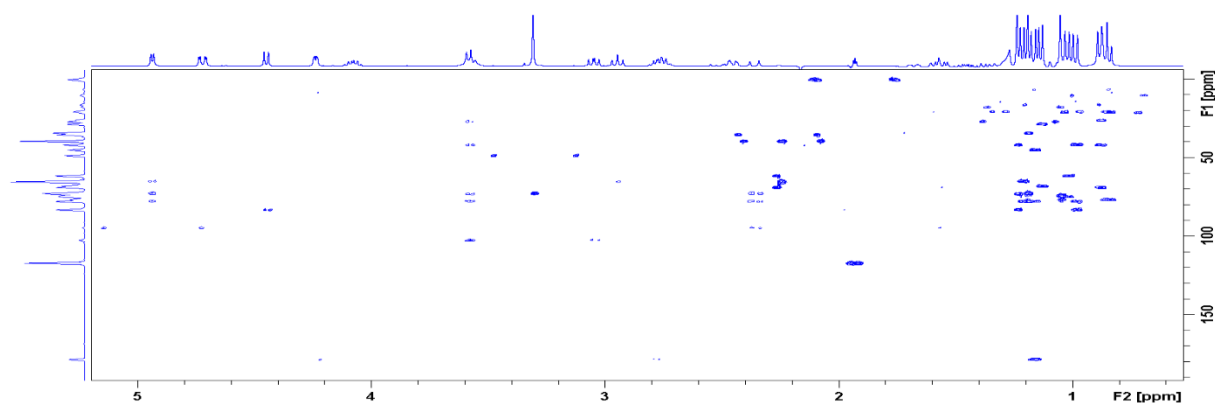
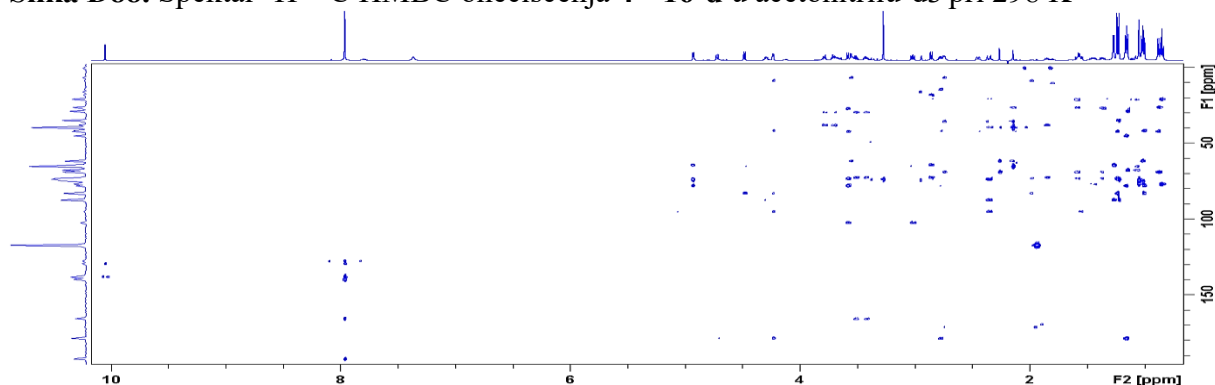
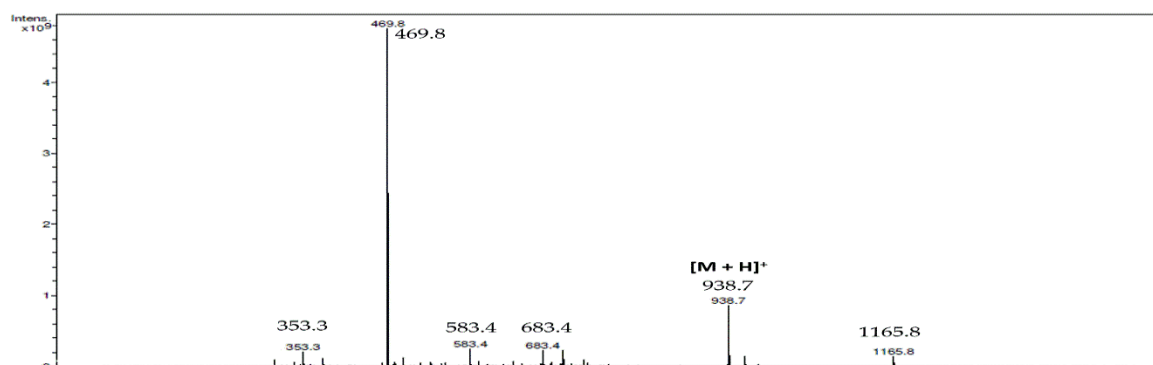
Slika D84. Spektar ESI-MS makrozona 4''-16 snimljen uz pozitivnu ionizaciju



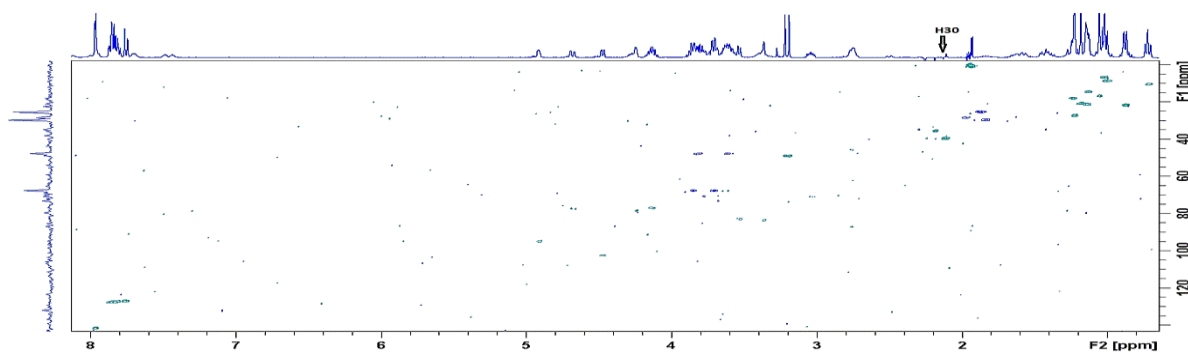
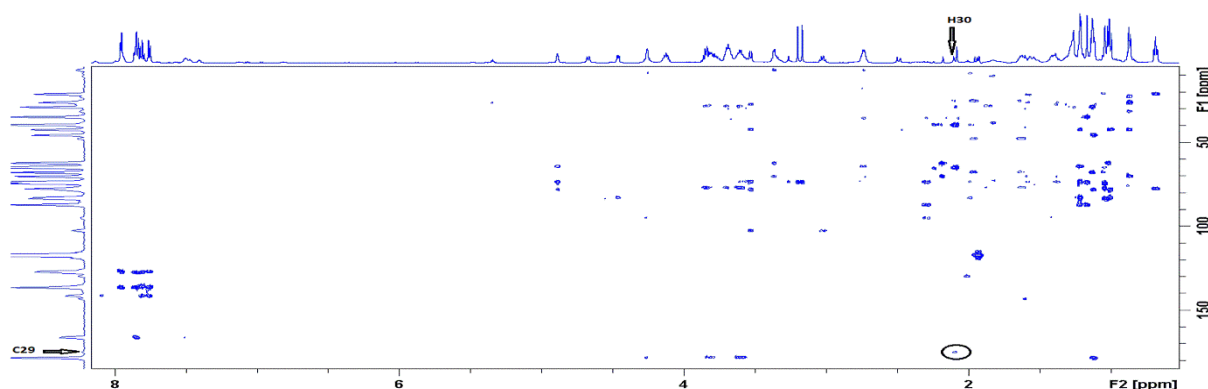
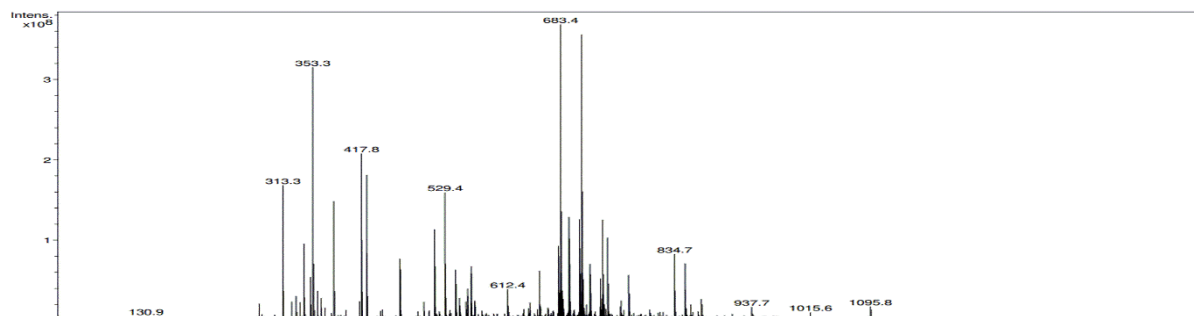
Slika D85. Spektar ESI-MS onečišćenja 4''-16-b u pozitivnom ionizacijskom modu



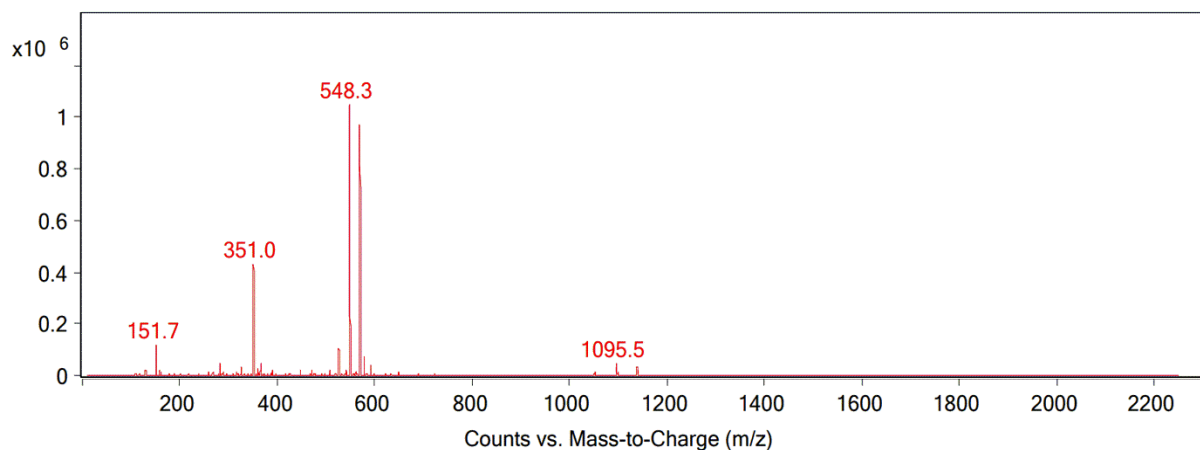
Slika D86. Spektar COSY onečišćenja 4''-16-d u acetonitrilu-d3 pri 298 K

Slika D87. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja 4''-16-d u acetonitrilu-d₃ pri 298 KSlika D88. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja 4''-16-d u acetonitrilu-d₃ pri 298 KSlika D89. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja 4''-16-e u acetonitrilu-d₃ pri 298 K

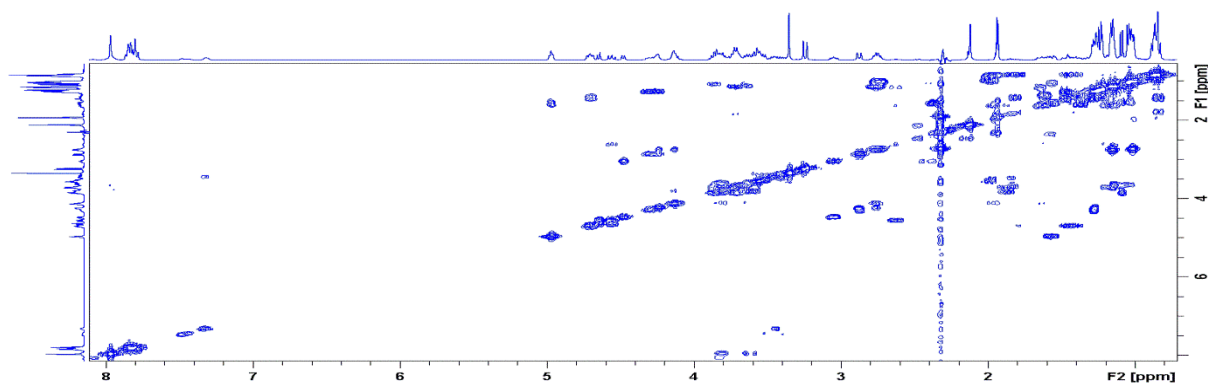
Slika D90. Spektar ESI-MS onečišćenja 4''-16-e snimljen uz pozitivnu ionizaciju

Slika D91. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja 4''-16-g u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D92. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja 4''-16-g u acetonitrilu-d3 pri 298 K

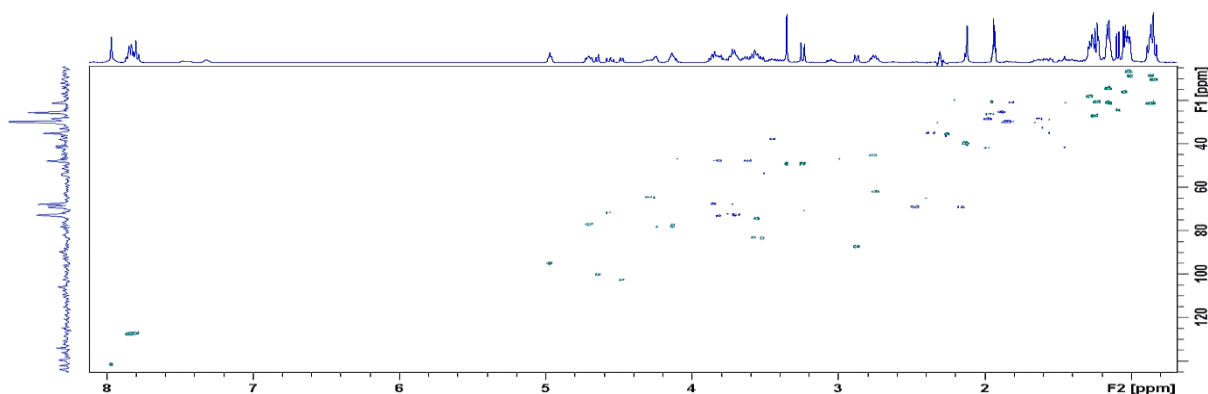
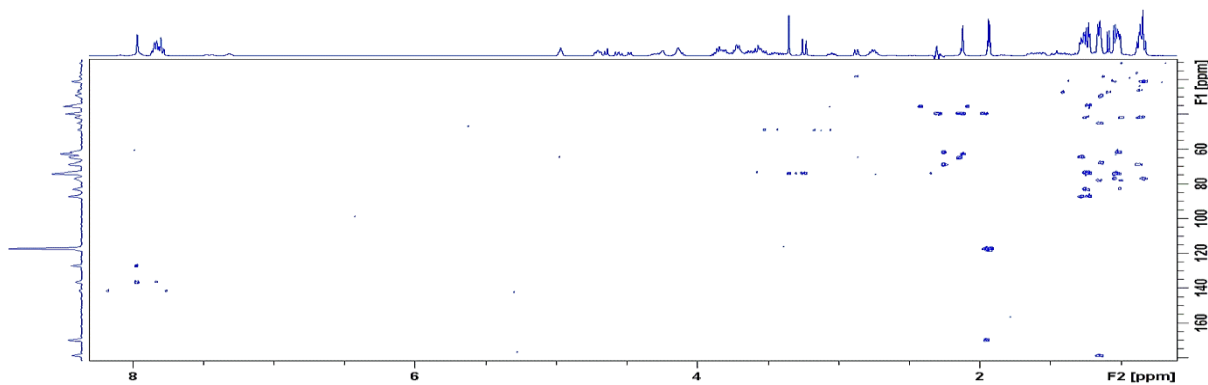
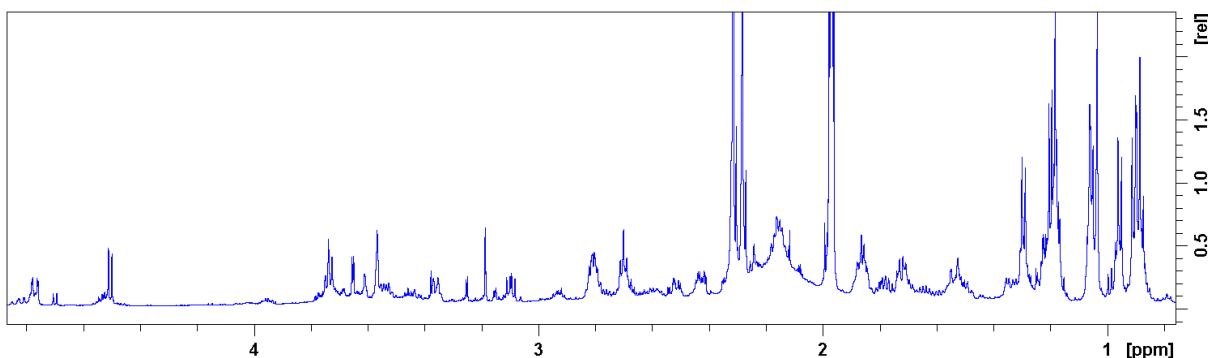
Slika D93. Spektar ESI-MS onečišćenja 4''-16-c snimljen uz pozitivnu ionizaciju

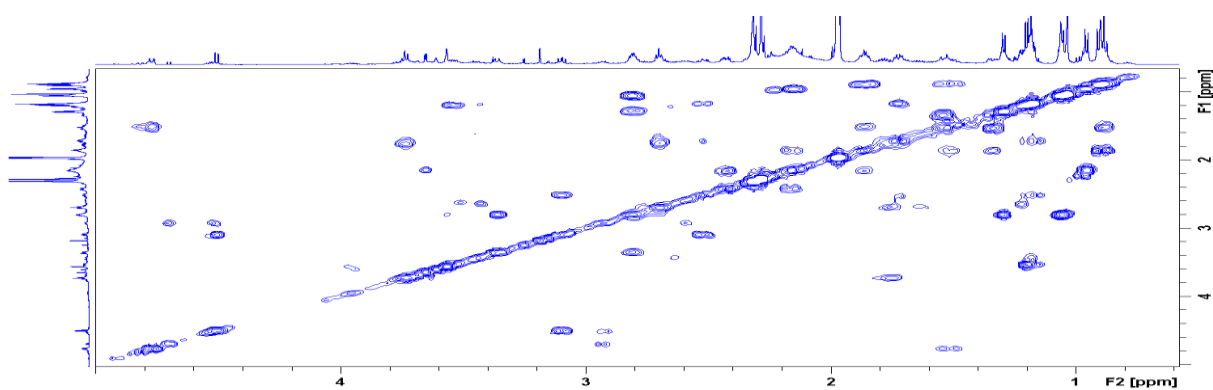


Slika D94. Spektar ESI-MS onečišćenja 4''-16-f snimljen uz pozitivnu ionizaciju

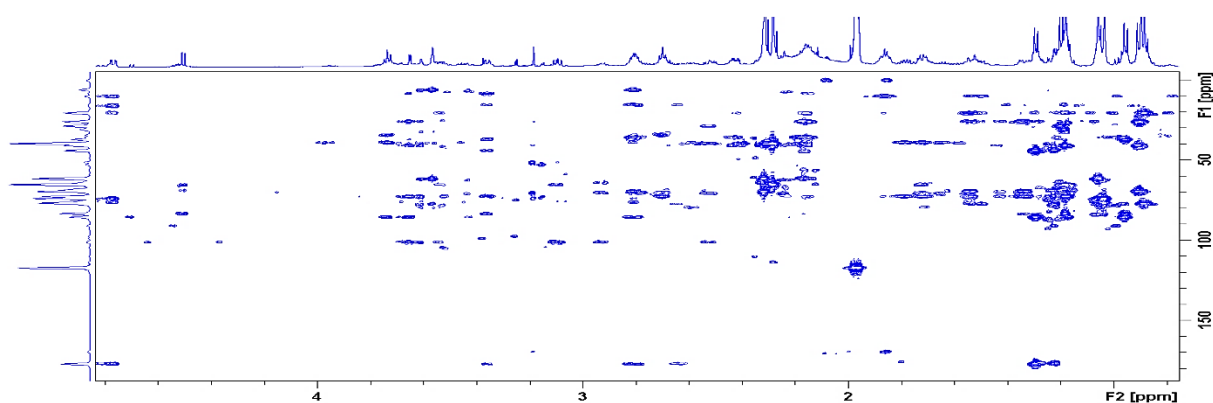


Slika D95. Spektar COSY onečišćenja 4''-16-f u acetonitrilu-d3 pri 298 K

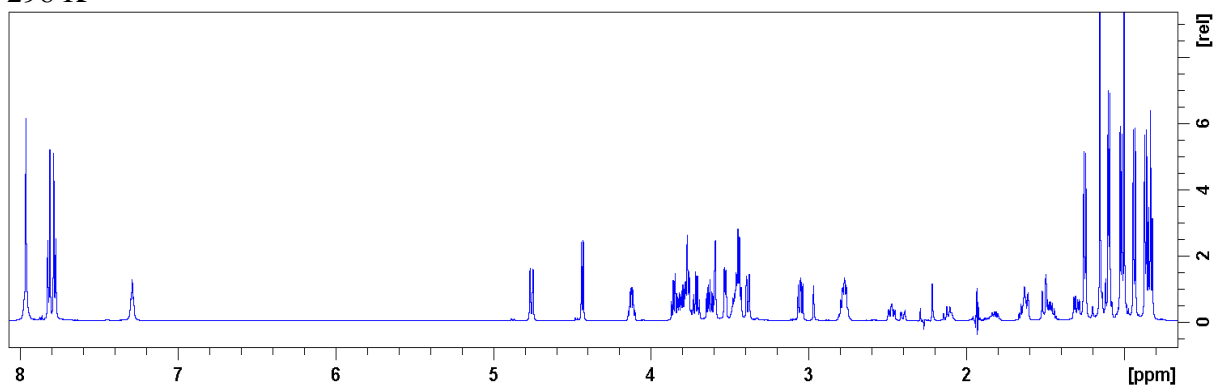
Slika D96. Spektar ¹H-¹³C HSQC onečišćenja 4''-16-f u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D97. Spektar ¹H-¹³C HMBC onečišćenja 4''-16-f u acetonitrilu-d3 pri 298 KSlika D98. Spektar ¹H NMR spoja 3-(γ -aminopropil) azitromicin u acetonitrilu-d3 pri 298 K



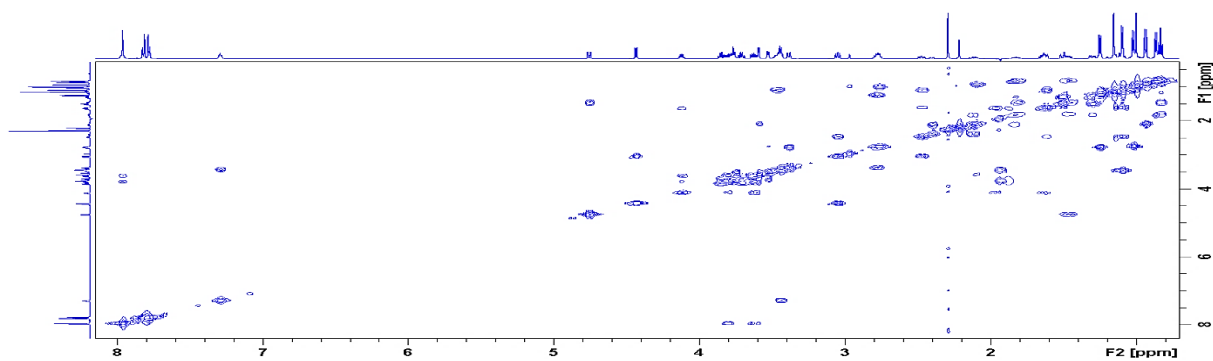
Slika D99. Spektar COSY spoja 3-(γ -aminopropil) azitromicin u acetonitrilu-d3 pri 298 K



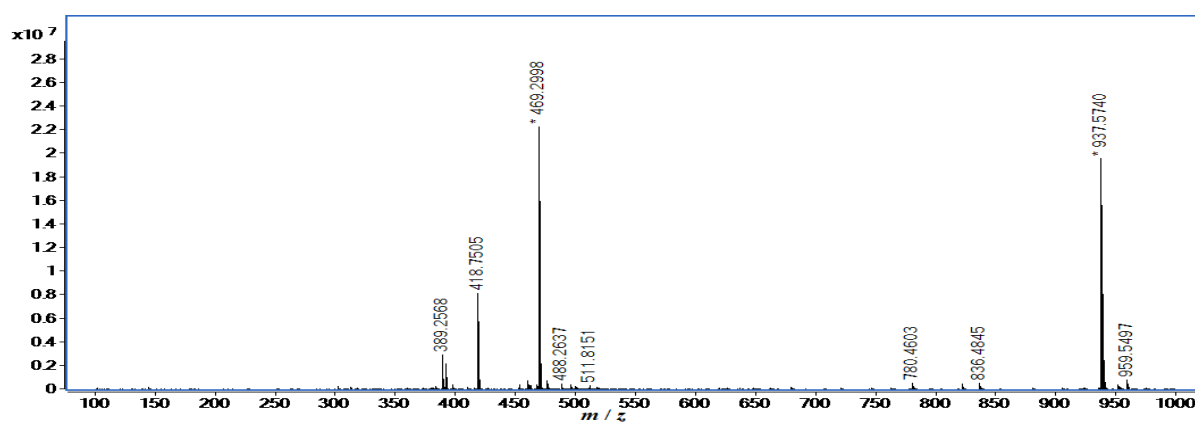
Slika D100. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC spoja 3-(γ -aminopropil) azitromicin u acetonitrilu-d3 pri 298 K



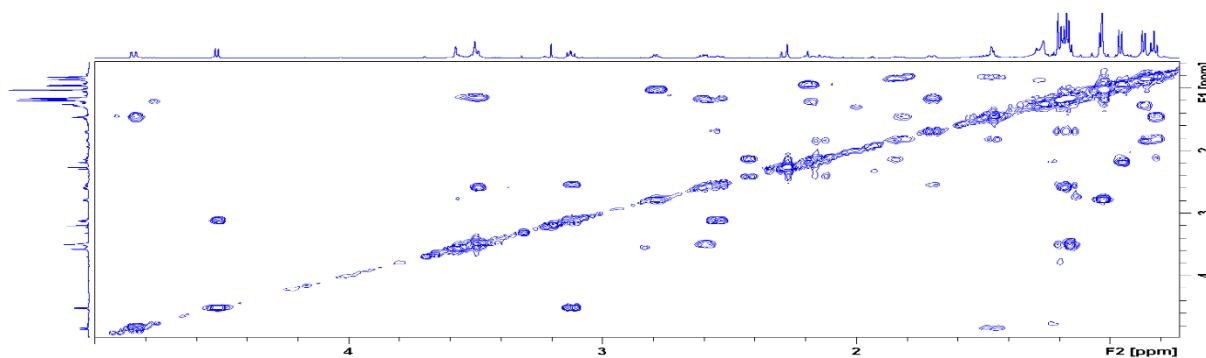
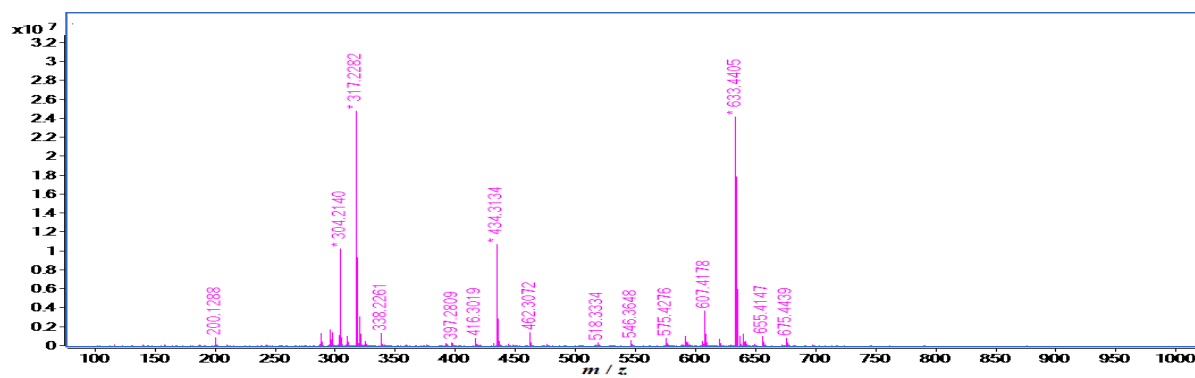
Slika D101. Spektar ^1H NMR makrozona 3-16 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



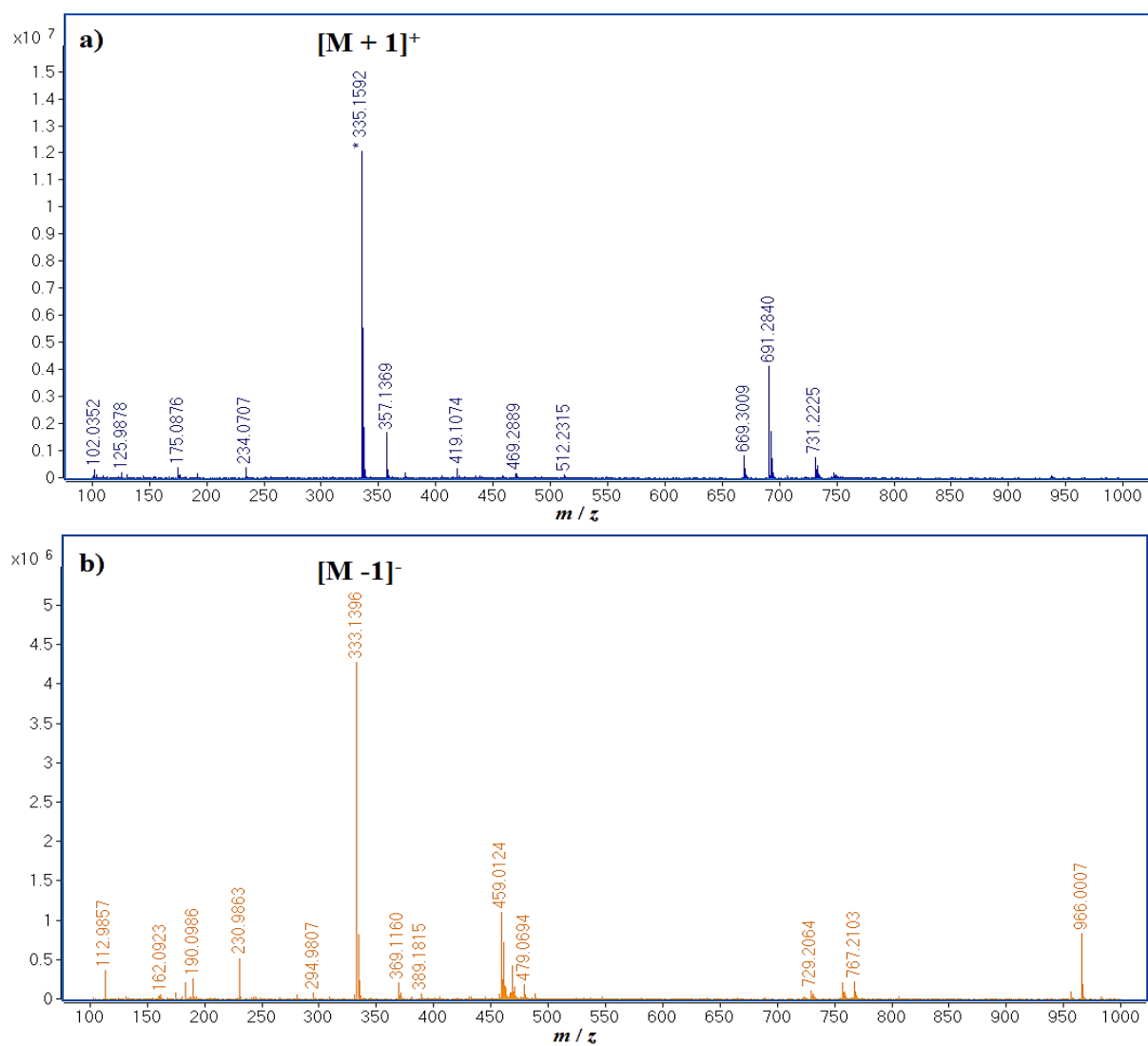
Slika D102. Spektar COSY makrozona 3-16 u acetonitrilu-d3 pri 298 K



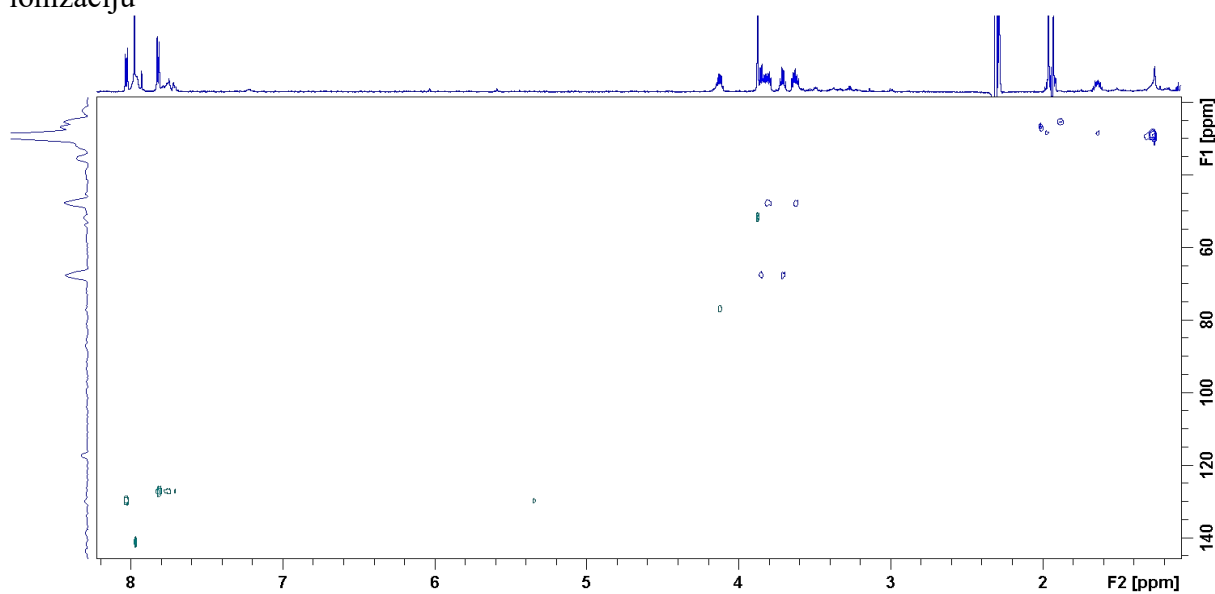
Slika D103. Spektar ESI-MS makrozona 3-16 snimljen uz pozitivnu ionizaciju

Slika D104. Spektar COSY onečišćenja 3-16-a u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

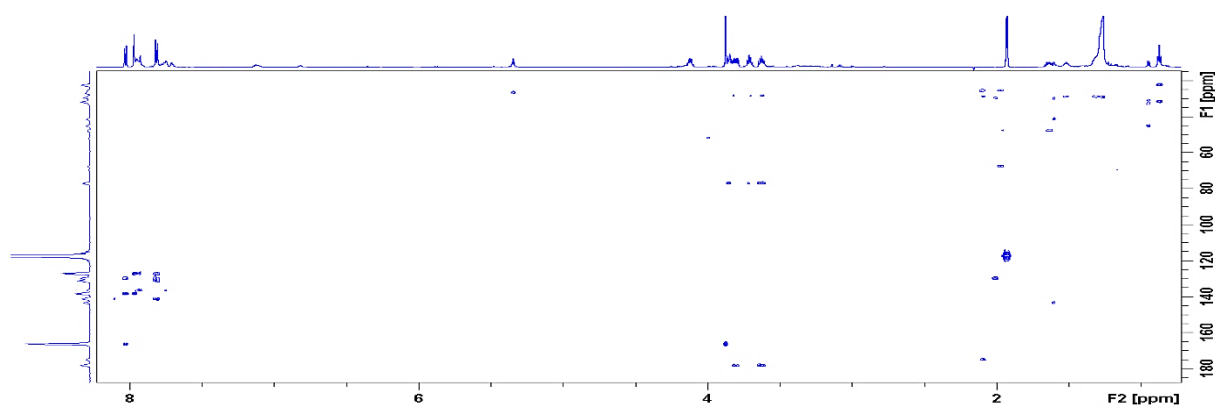
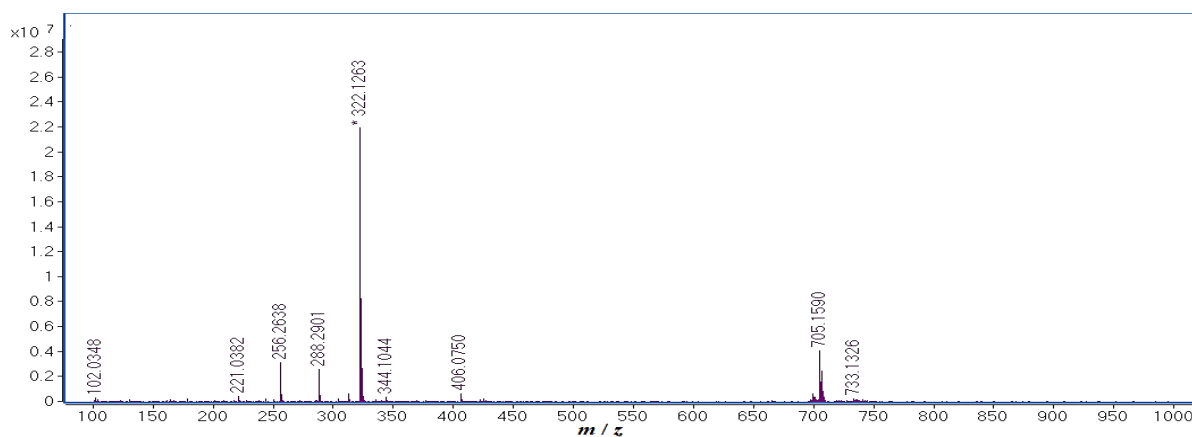
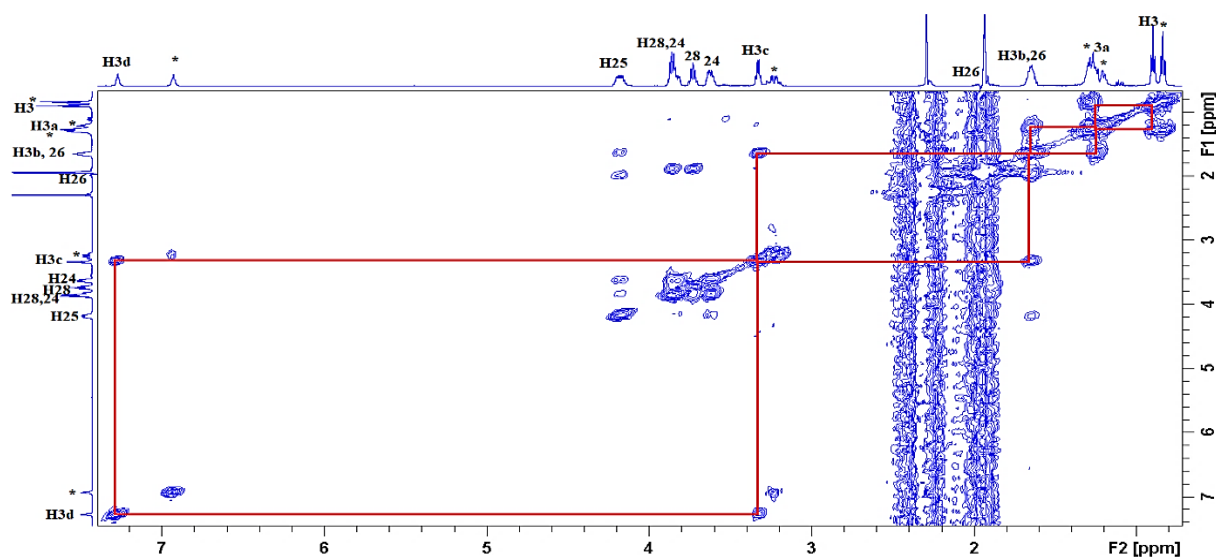
Slika D105. Spektar ESI-MS onečišćenja 3-16-a snimljen uz pozitivnu ionizaciju

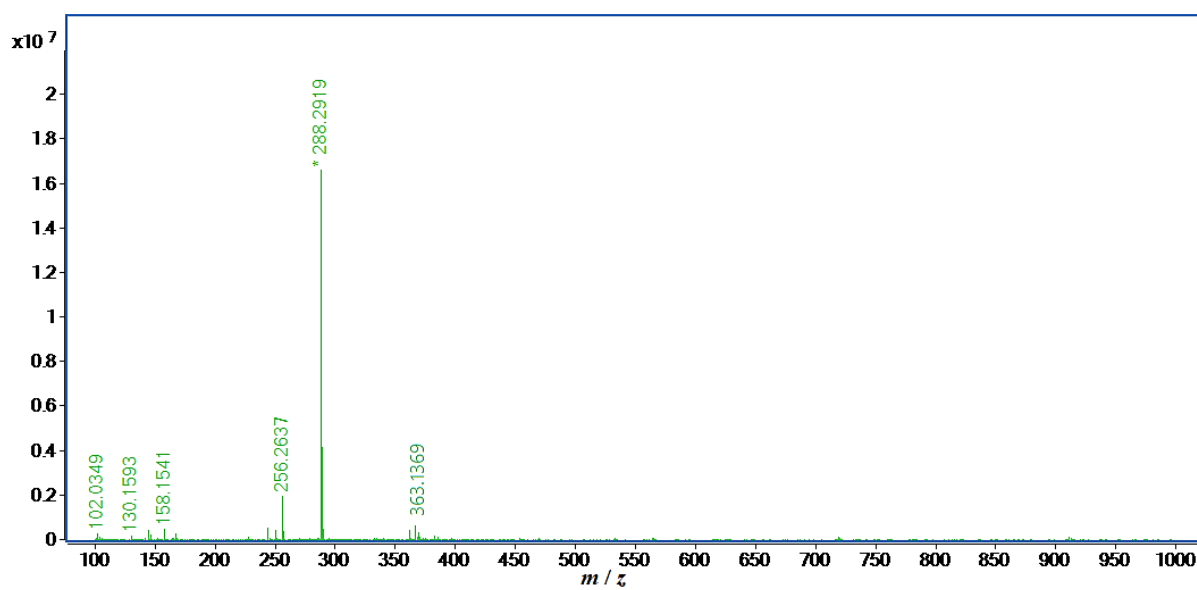
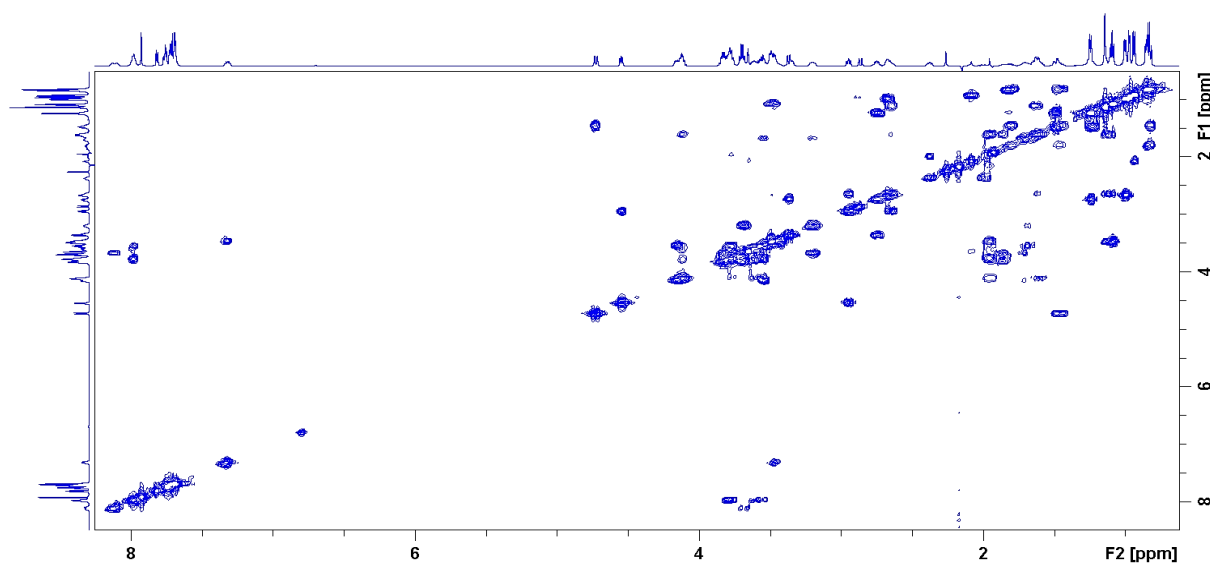


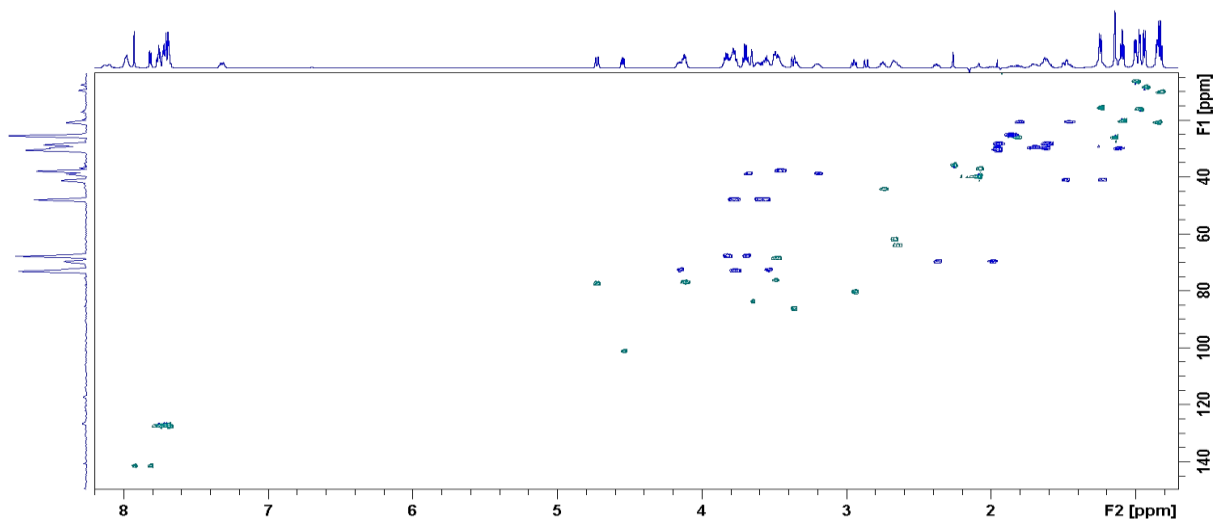
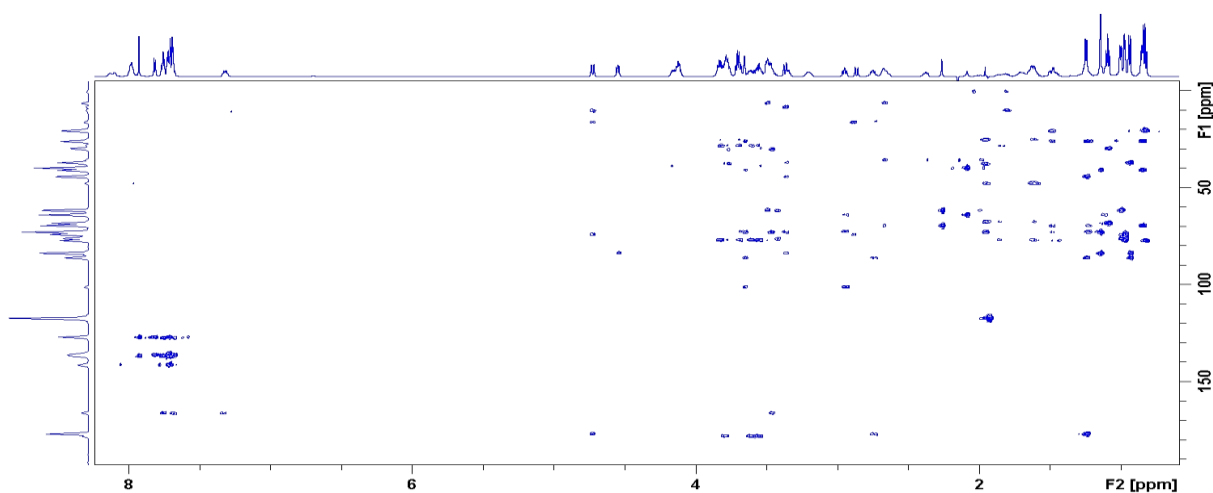
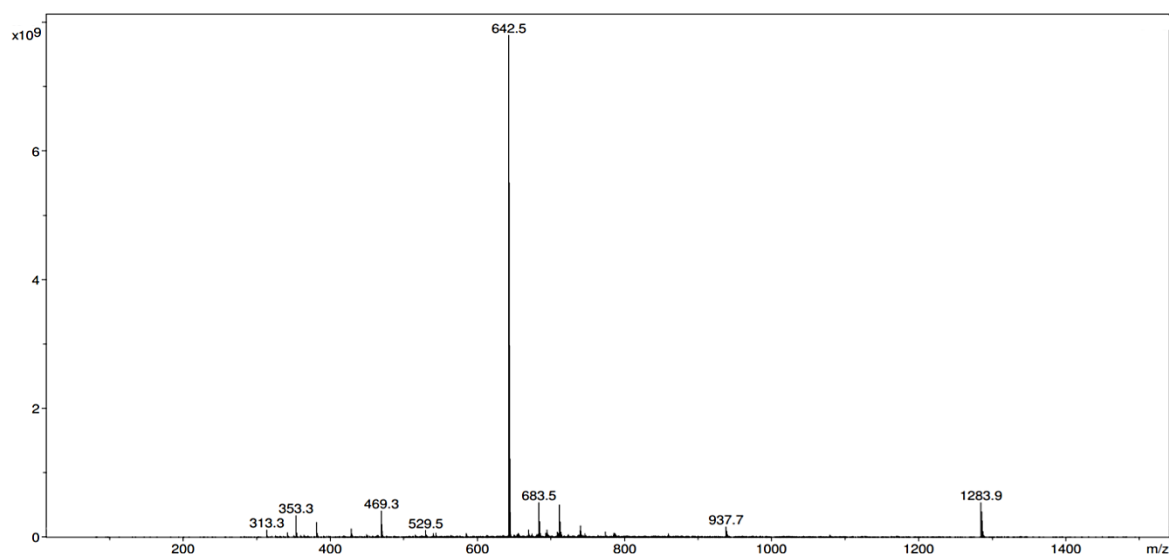
Slika D106. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-16-b** snimljen uz: a) pozitivnu i b) negativnu ionizaciju

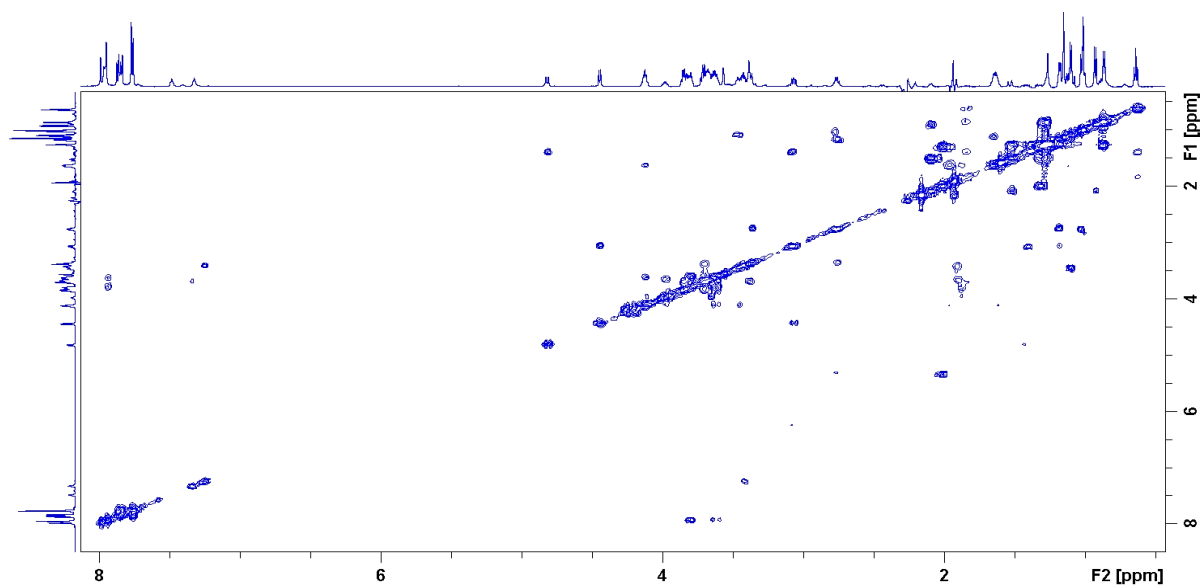


Slika D107. Spektar ¹H-¹³C HSQC onečišćenja **3-16-c** u acetonitrilu-d₃ pri 298 K

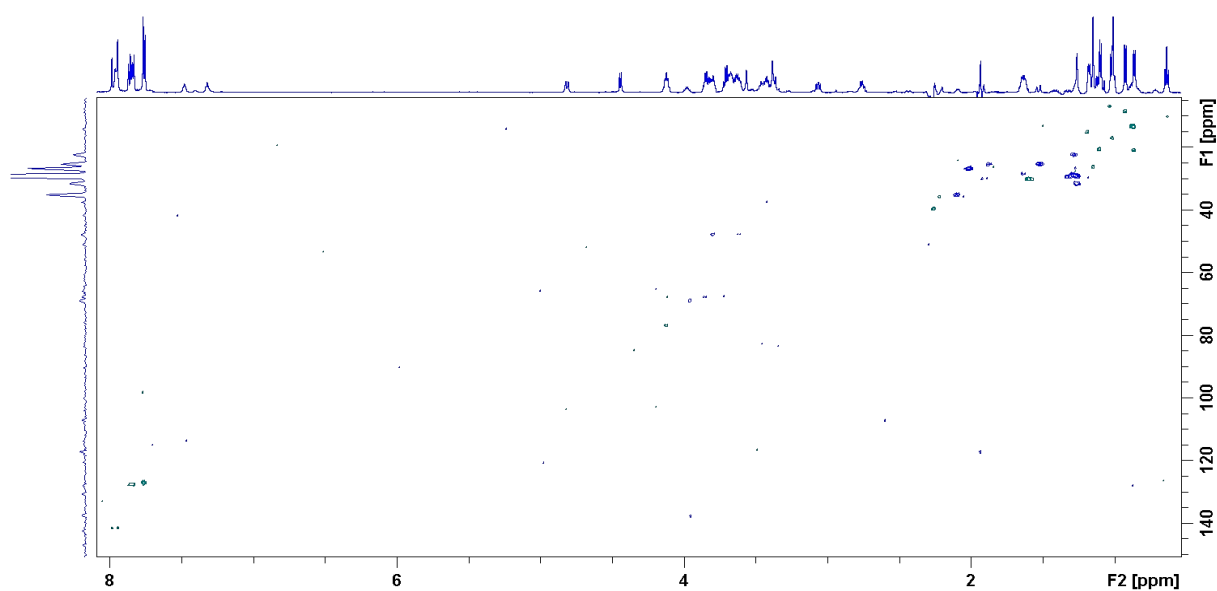
Slika D108. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **3-16-c** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D109. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-16-c** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D110. Spektar COSY onečišćenja **3-16-d** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

Slika D111. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-16-d** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D112. Spektar COSY onečišćenja **3-16-e** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

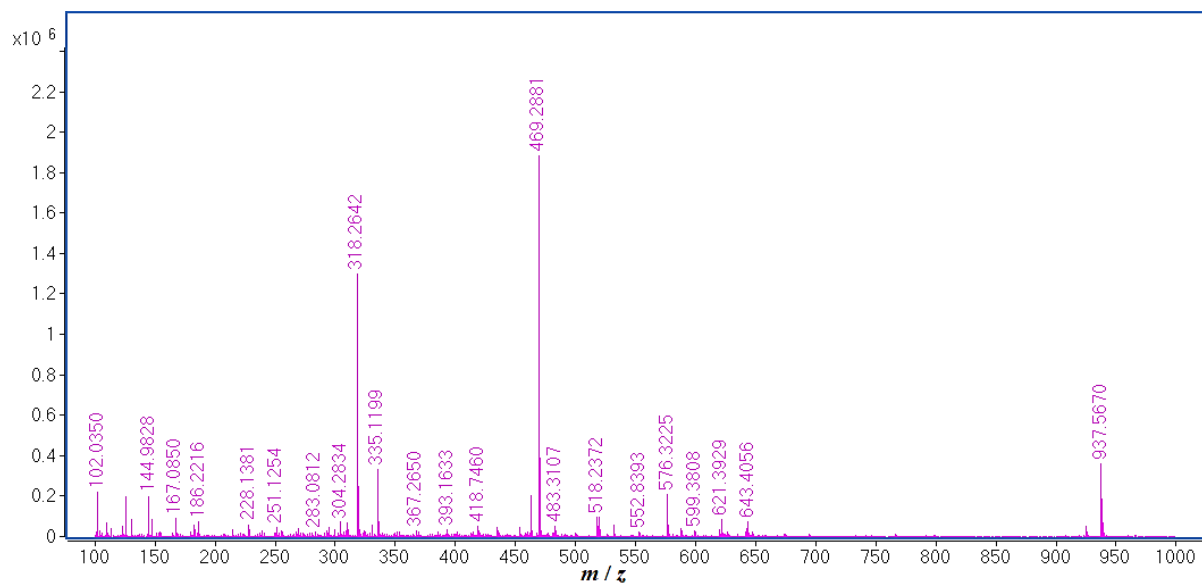
Slika D113. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **3-16-e** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D114. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **3-16-e** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D115. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-16-e** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



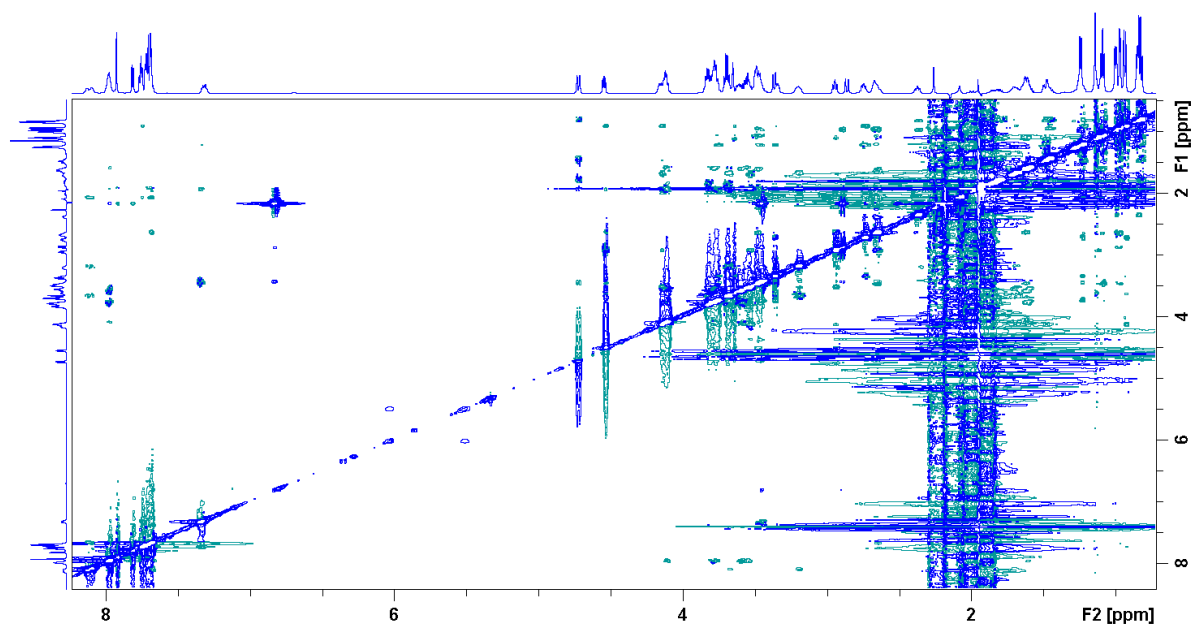
Slika D116. Spektar COSY onečišćenja **3-16-f** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



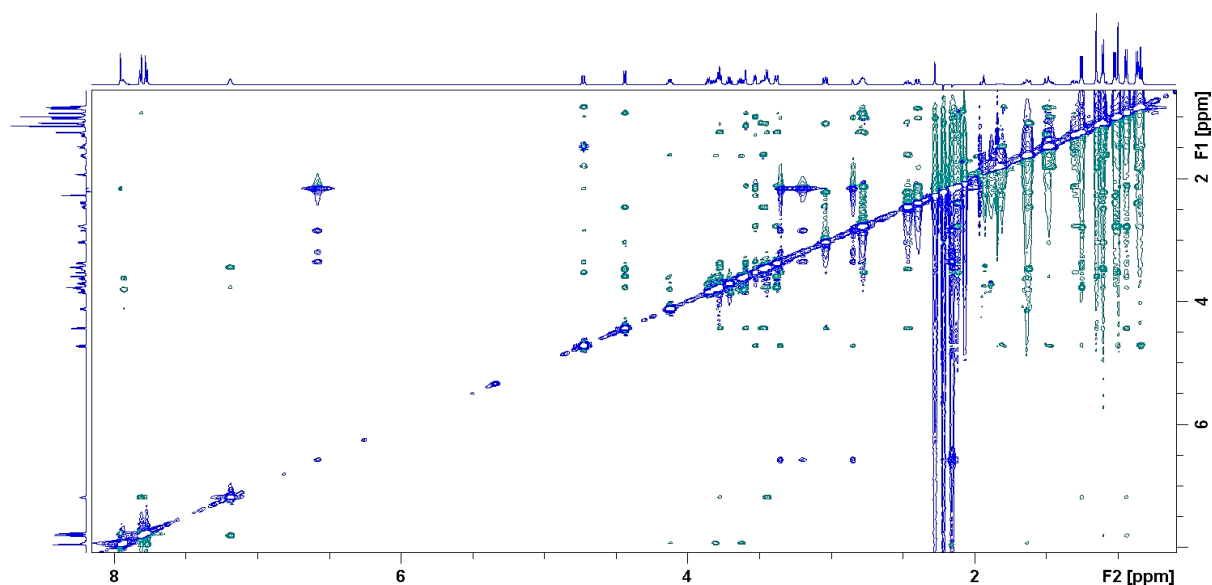
Slika D117. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **3-16-f** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



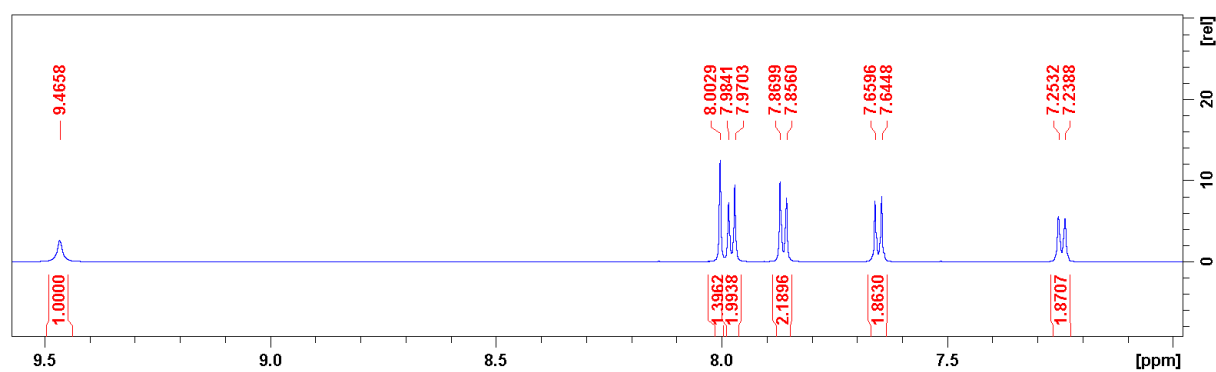
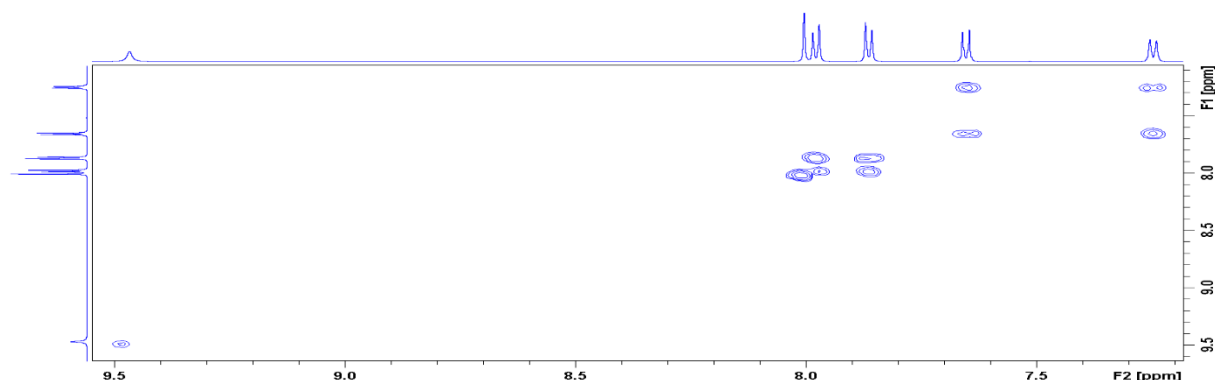
Slika D118. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-16-f** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



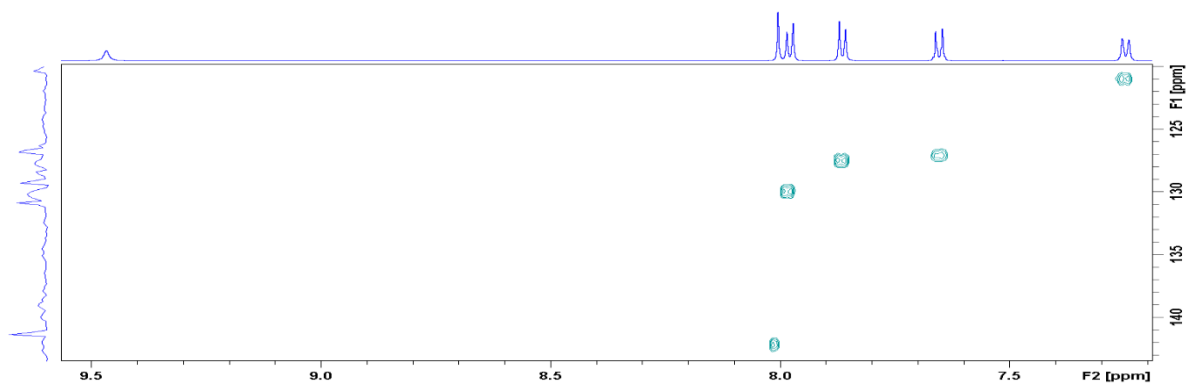
Slika D119. Spektar NOESY onečišćenja **3-16-e** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



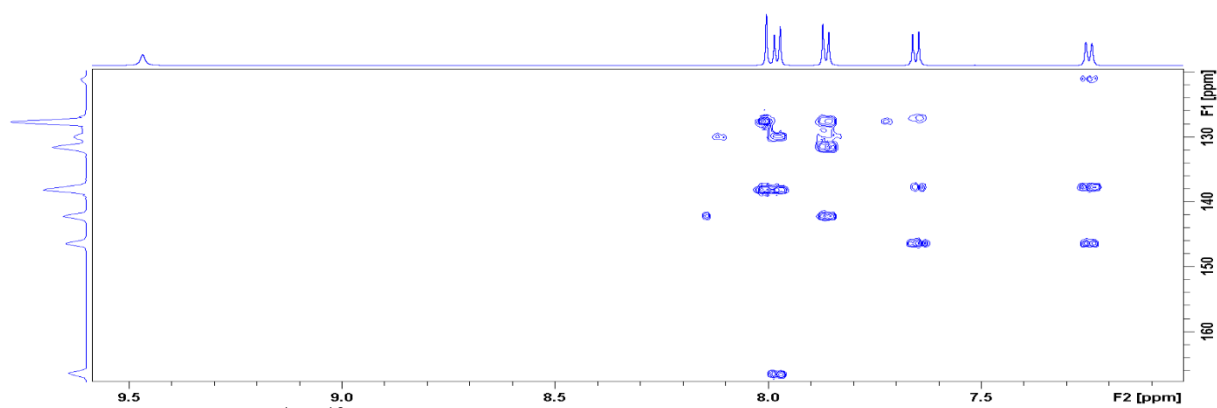
Slika D120. Spektar NOESY makrozona 3-16 u acetonitrilu-d3 pri 298 K

Slika D121. Spektar ^1H NMR trifluorometoksifenil tiosemikarbazida u acetonitrilu-d3 pri 298 K

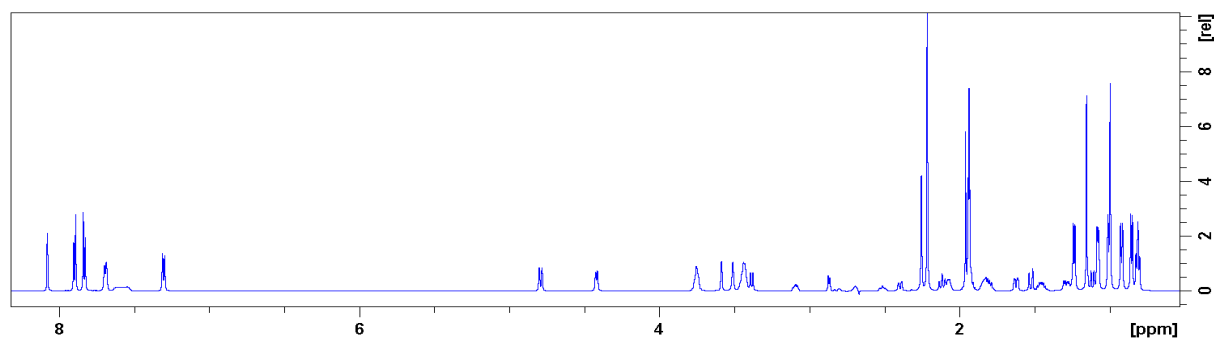
Slika D122. Spektar COSY trifluorometoksifenil tiosemikarbazida u acetonitrilu-d3 pri 298 K



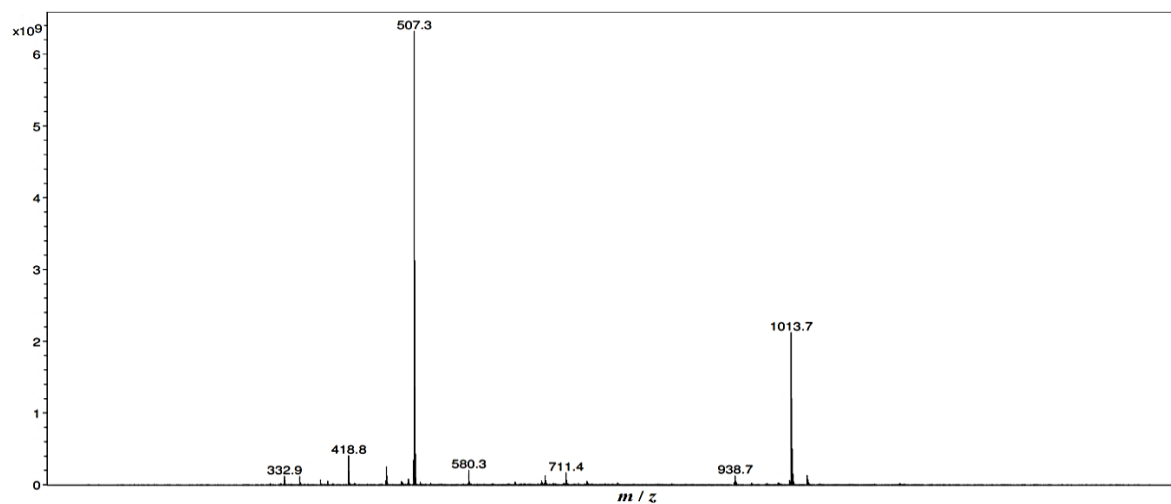
Slika D123. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC trifluormetoksifenil tiosemikarbazida u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



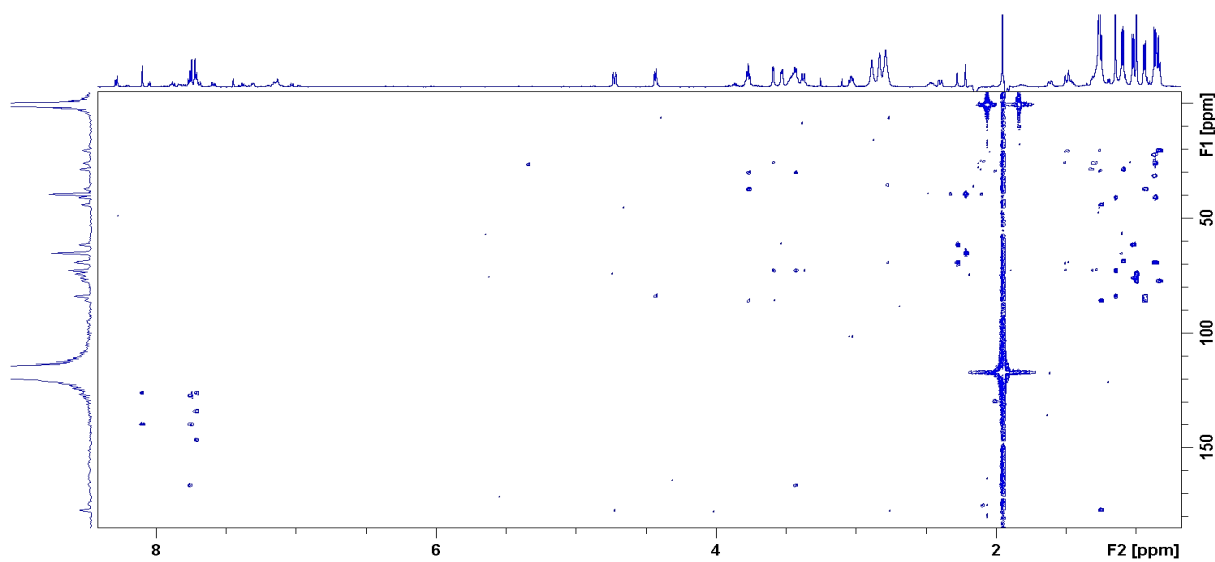
Slika D124. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC trifluormetoksifenil tiosemikarbazida u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



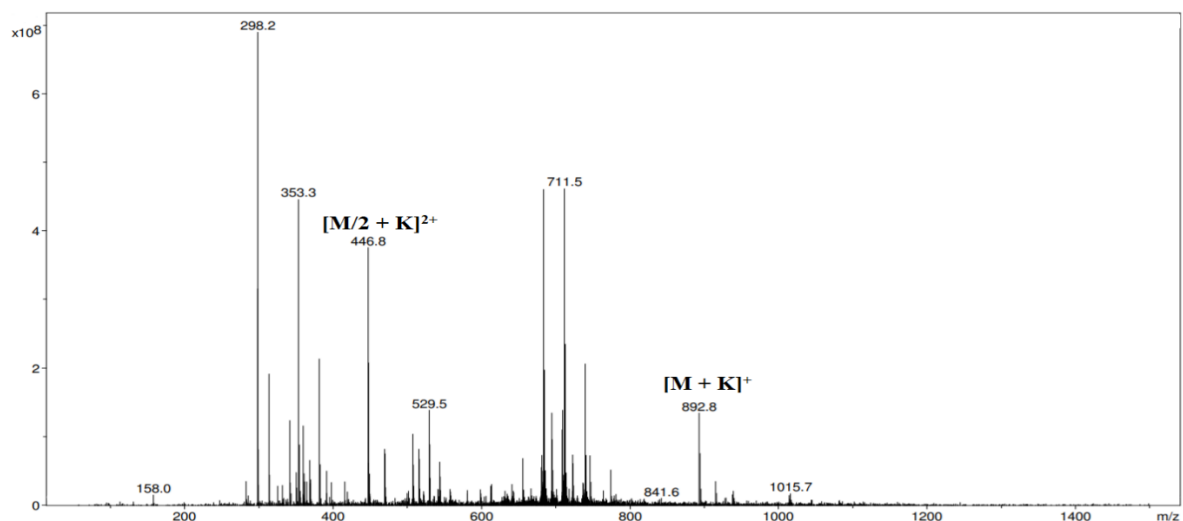
Slika D125. Spektar ^1H NMR makrozona 3-8 u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



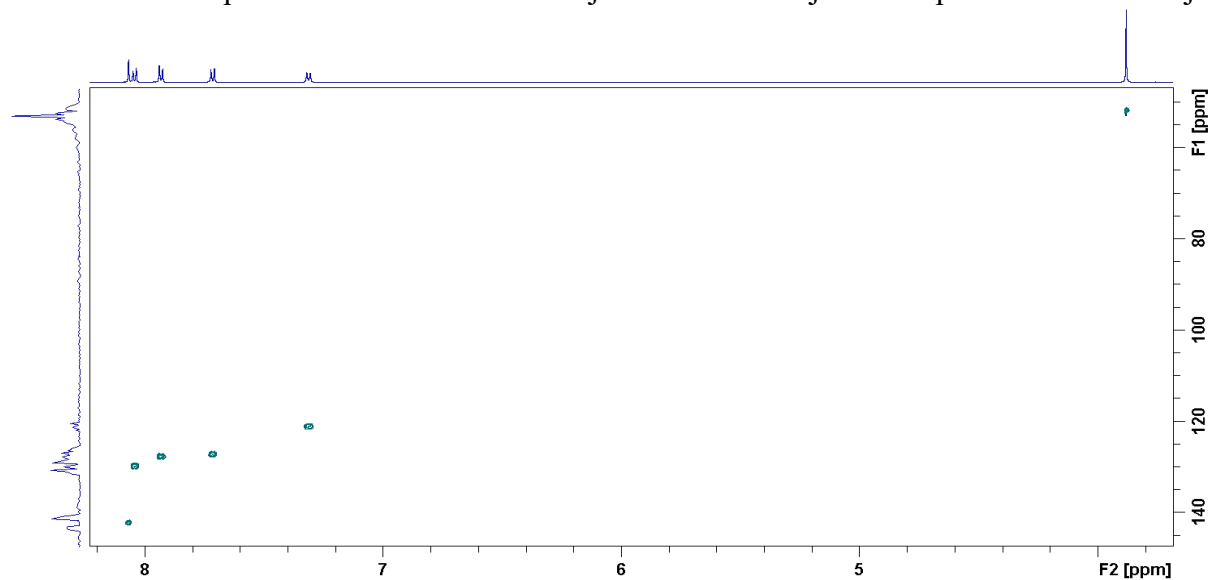
Slika D126. Spektar ESI-MS makrozona **3-8** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



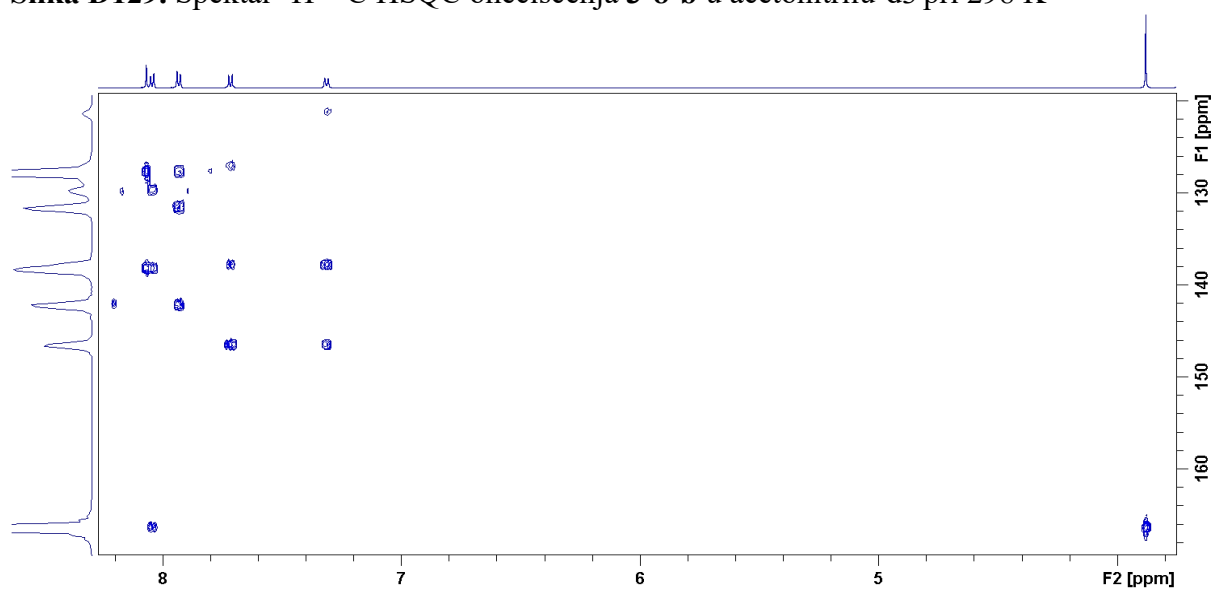
Slika D127. Spektar ¹H-¹³C HMBC onečišćenja **3-8-a** u acetonitrilu-d₃ pri 298 K



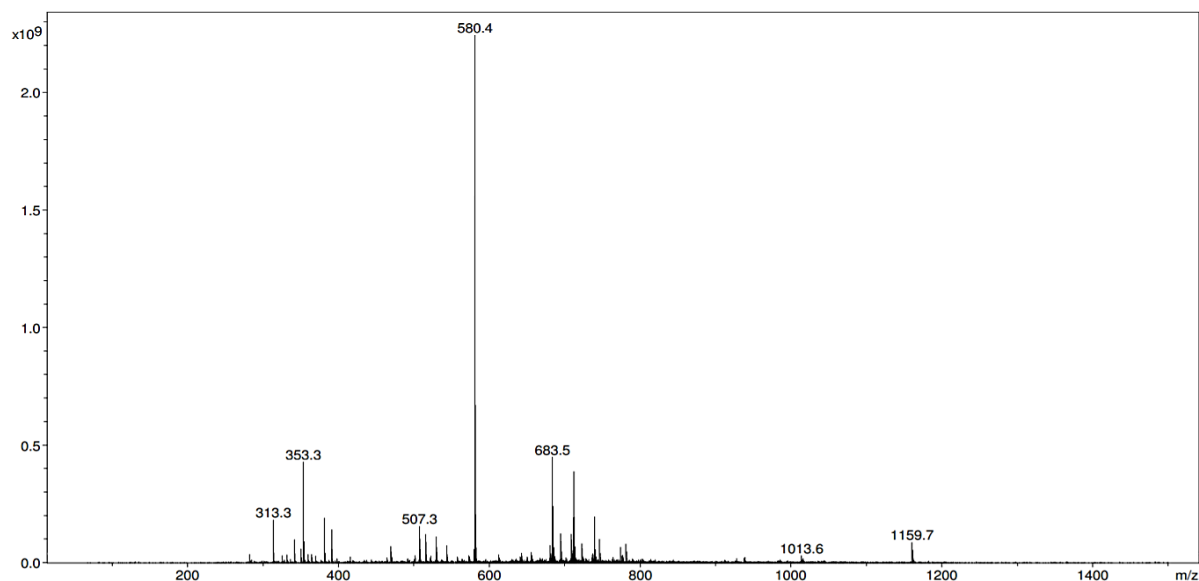
Slika D128. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-8-a** snimljen uz pozitivnu ionizaciju



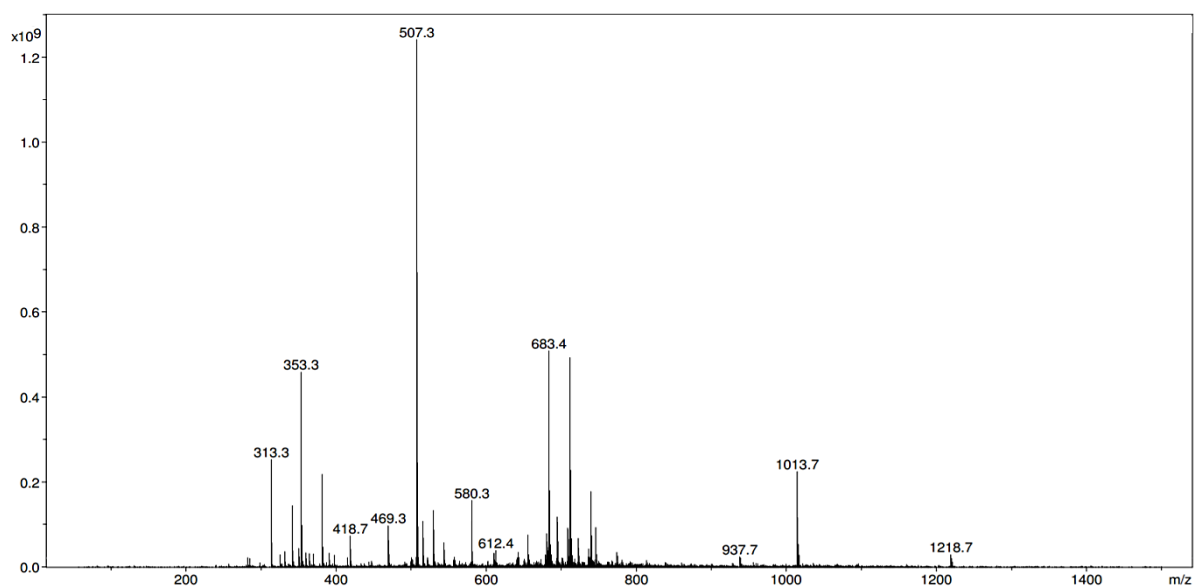
Slika D129. Spektar ¹H-¹³C HSQC onečišćenja **3-8-b** u acetonitrilu-d₃ pri 298 K



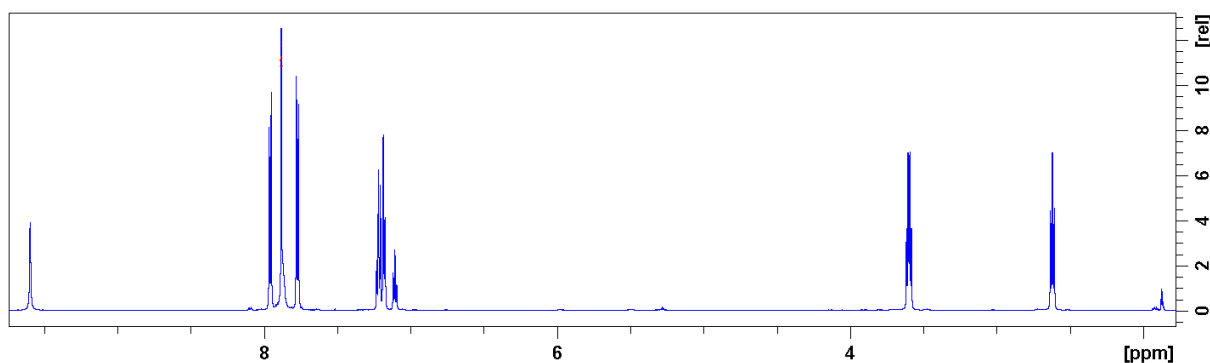
Slika D130. Spektar ¹H-¹³C HMBC onečišćenja **3-8-b** u acetonitrilu-d₃ pri 298 K

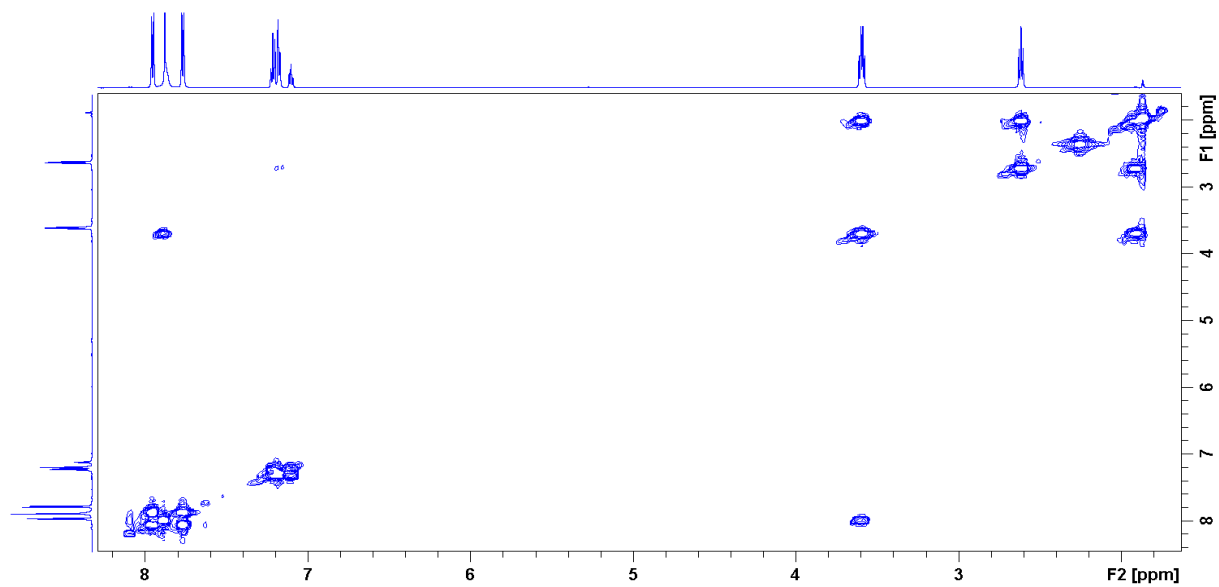


Slika D131. Spektar ESI-MS onečišćenja 3-8-e snimljen uz pozitivnu ionizaciju

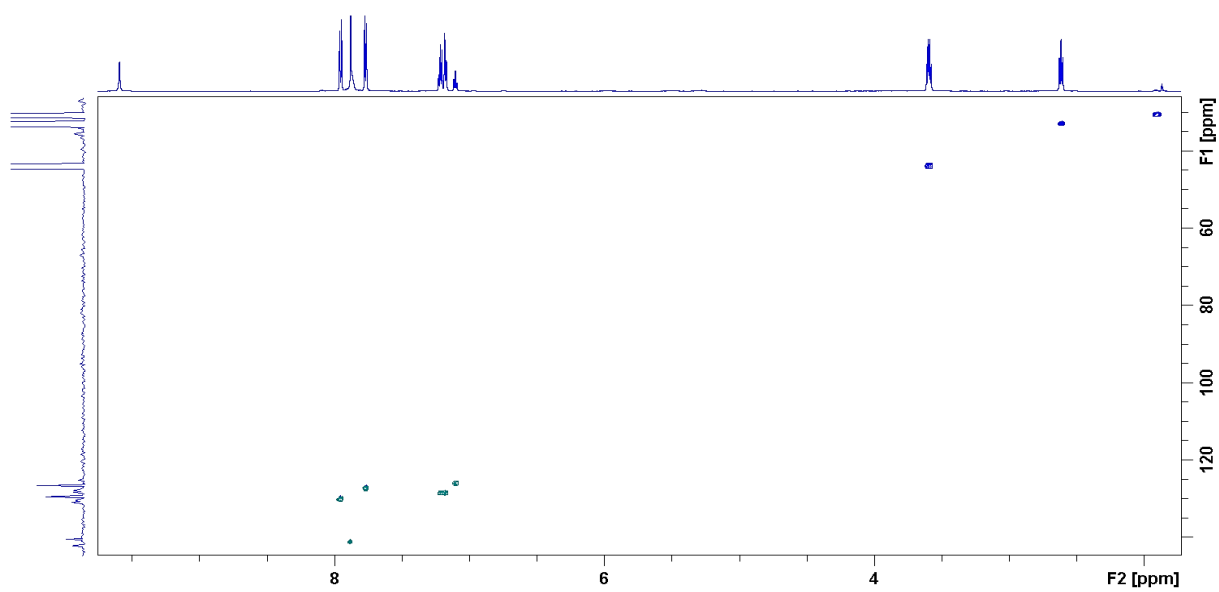


Slika D132. Spektar ESI-MS onečišćenja 3-8-f snimljen uz pozitivnu ionizaciju

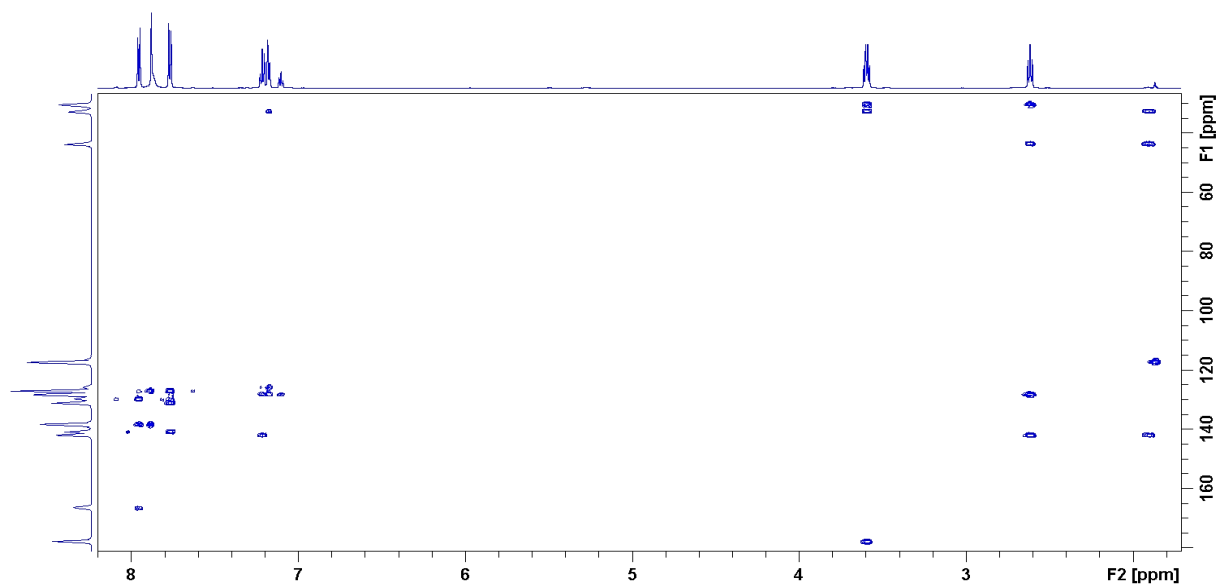
Slika D133. Spektar ¹H NMR 3-fenilpropil-tiosemikarbazida u acetonitrilu-d₃ pri 298 K



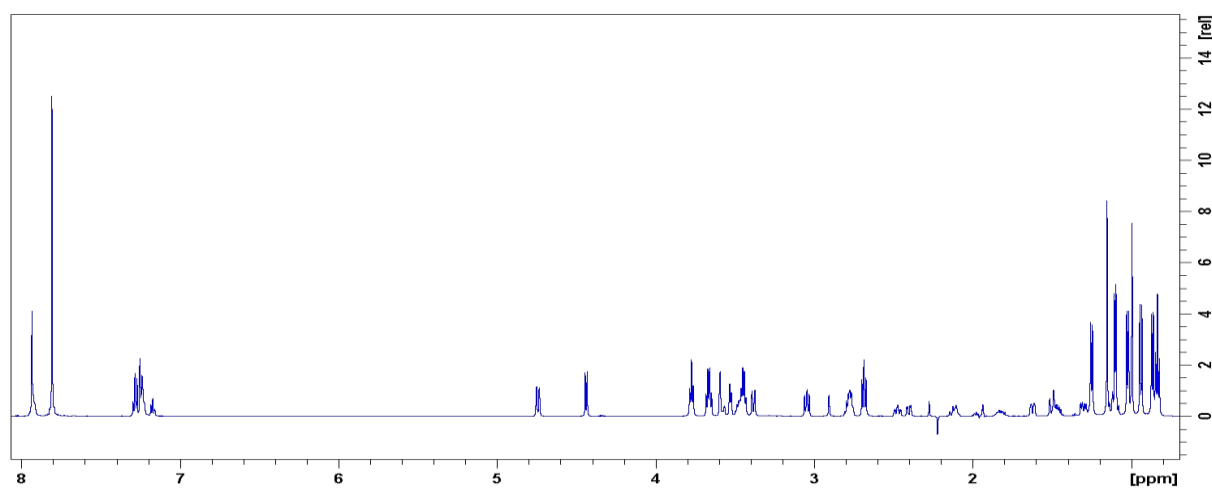
Slika D134. Spektar COSY 3-fenilpropil-tiosemikarbazida u acetonitrilu-d3 pri 298 K



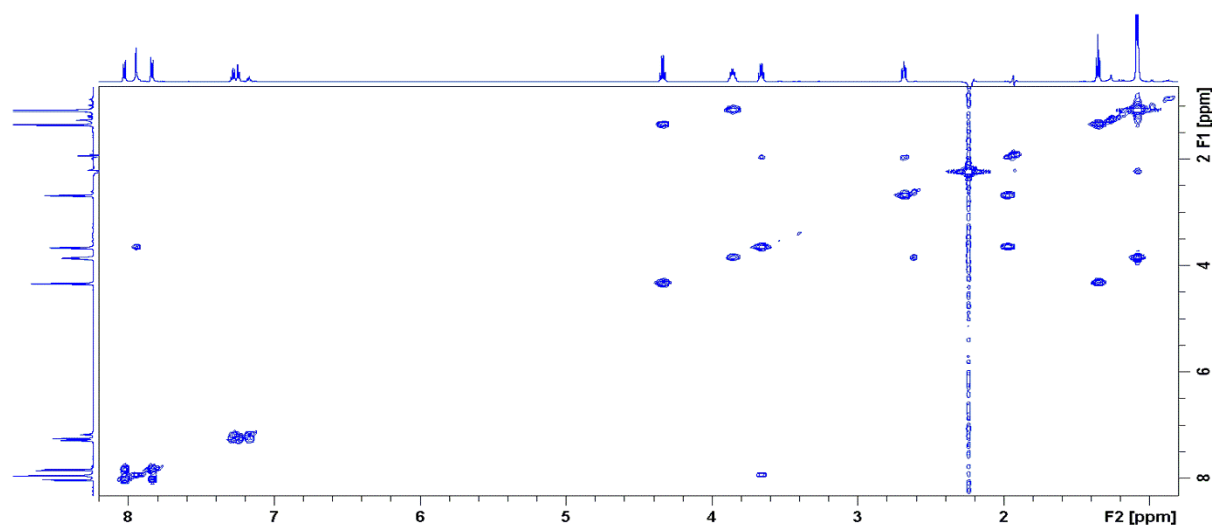
Slika D135. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC 3-fenilpropil-tiosemikarbazida u acetonitrilu-d3 pri 298 K



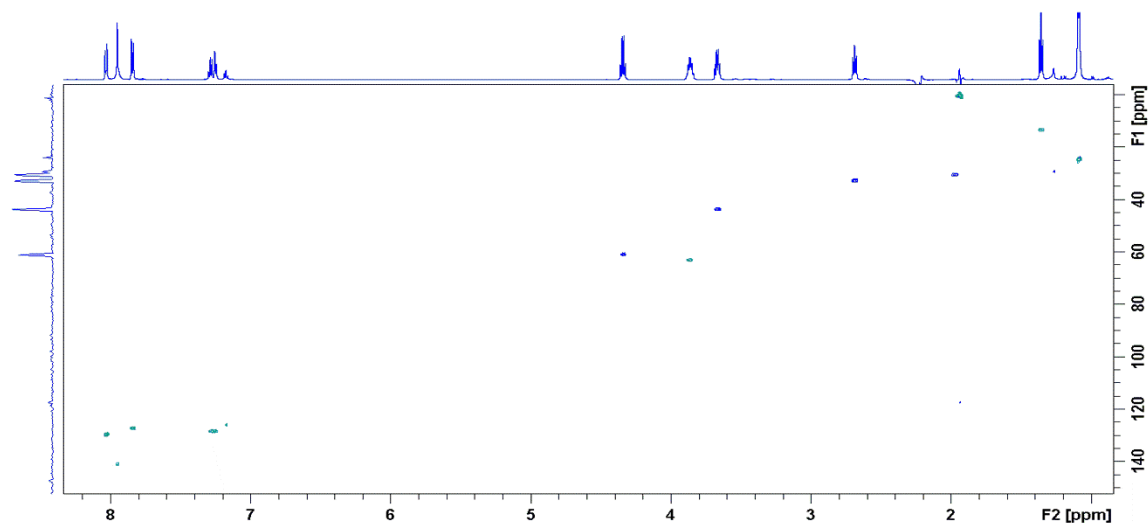
Slika D136. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC 3-fenilpropil-tiosemikarbazida u acetonitrilu-d3 pri 298 K



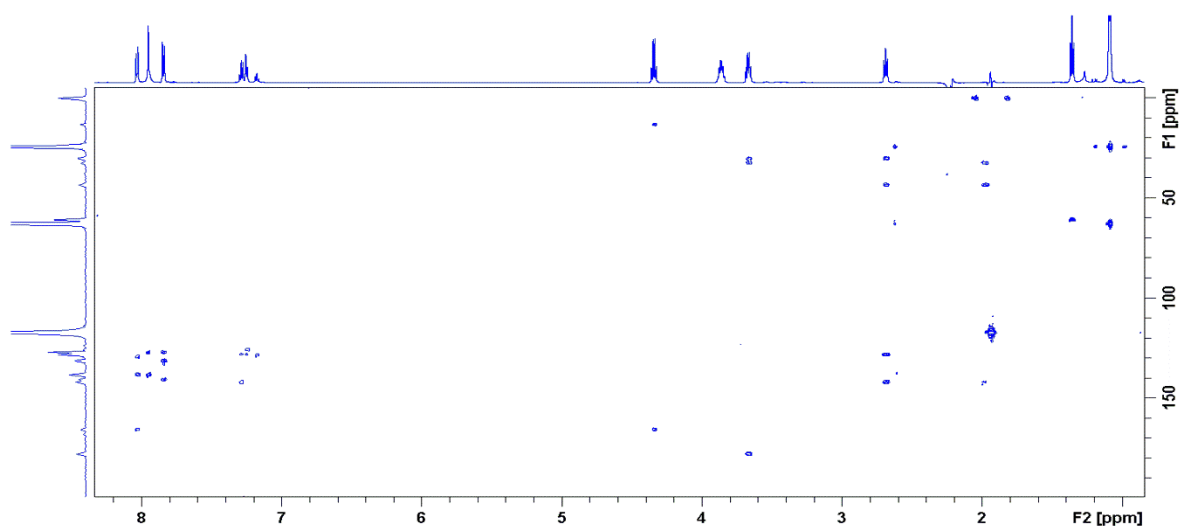
Slika D137. Spektar ^1H NMR makrozona **3-9** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



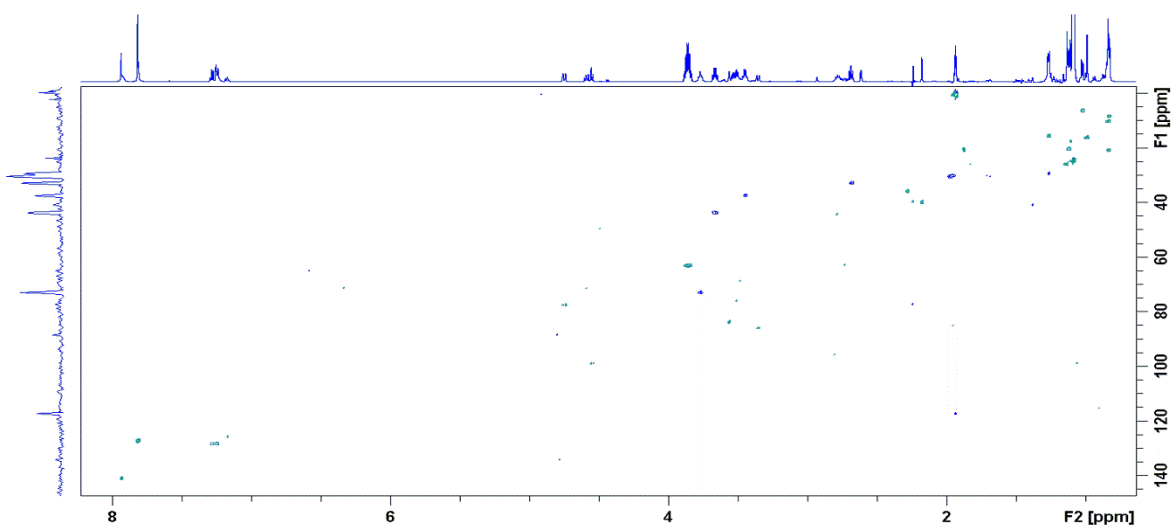
Slika D138. Spektar COSY onečišćenja **3-9-a** u acetonitrilu-d3 pri 298 K



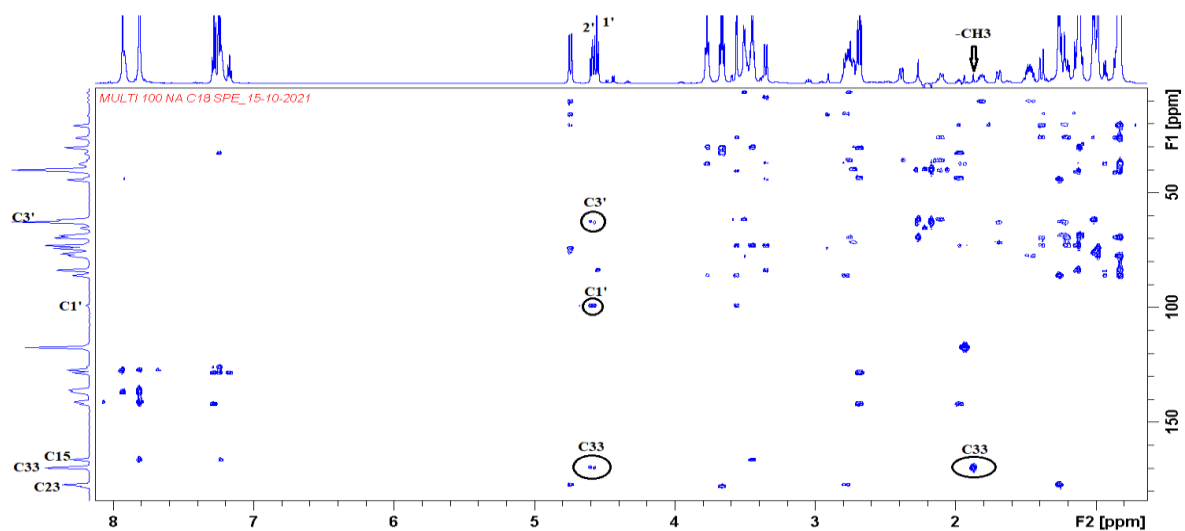
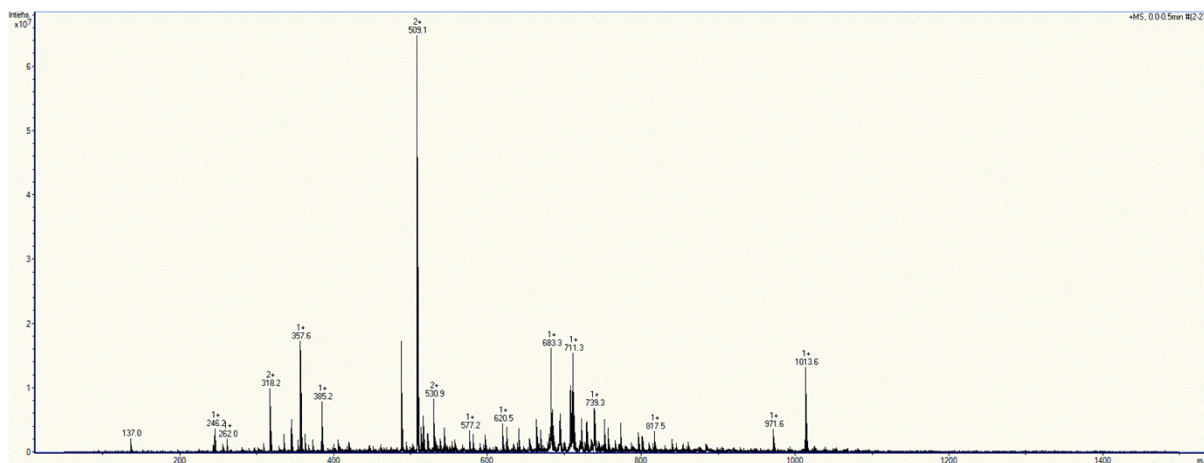
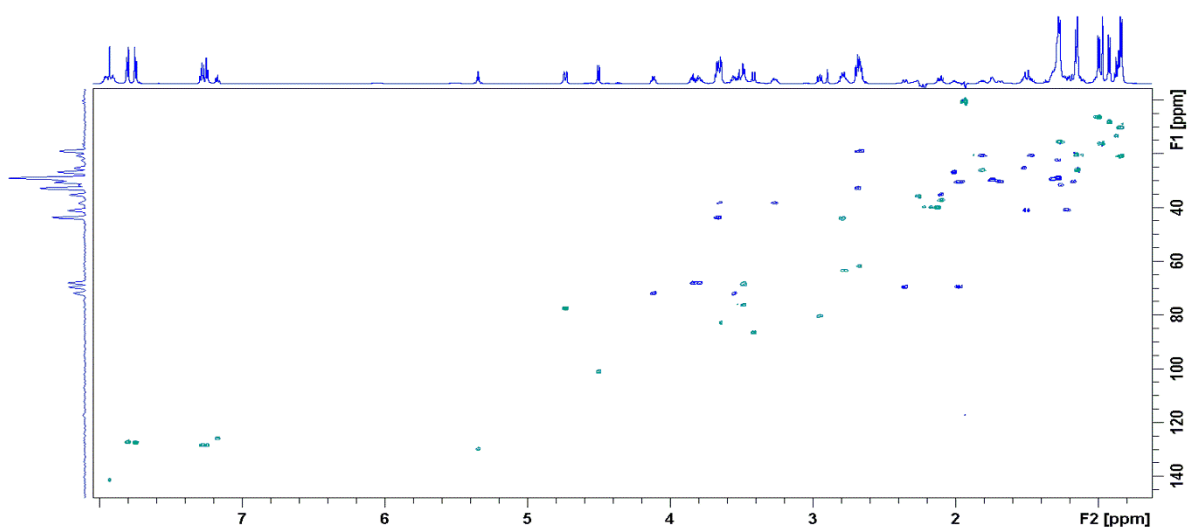
Slika D139. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **3-9-a** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

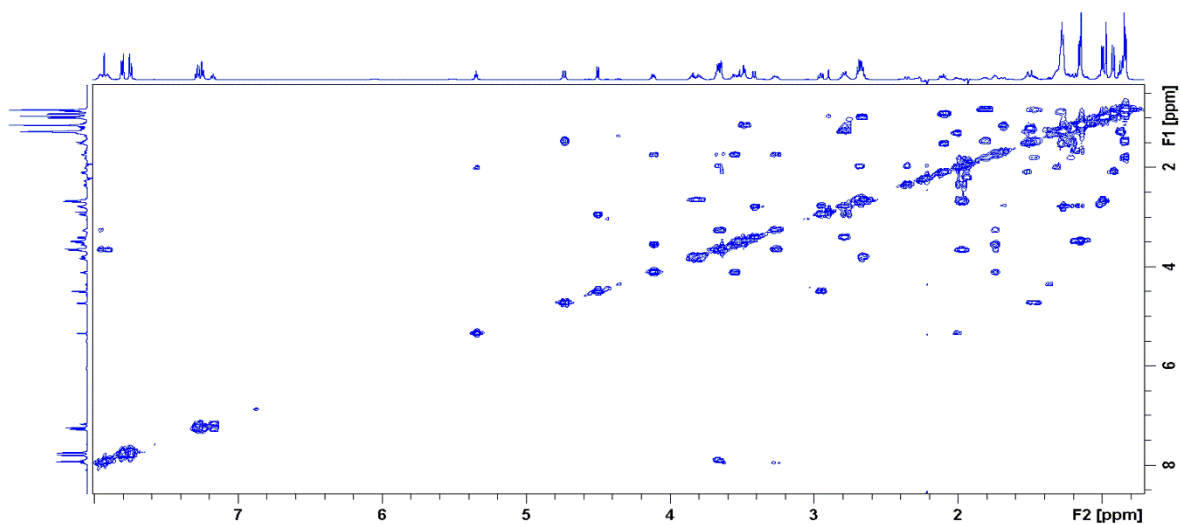


Slika D140. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **3-9-a** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

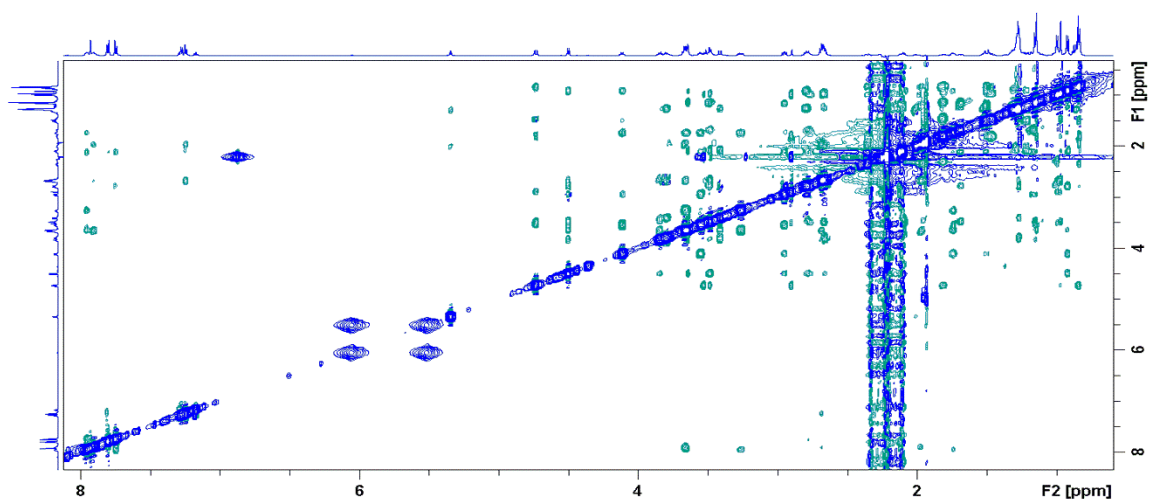


Slika D141. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **3-9-b** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

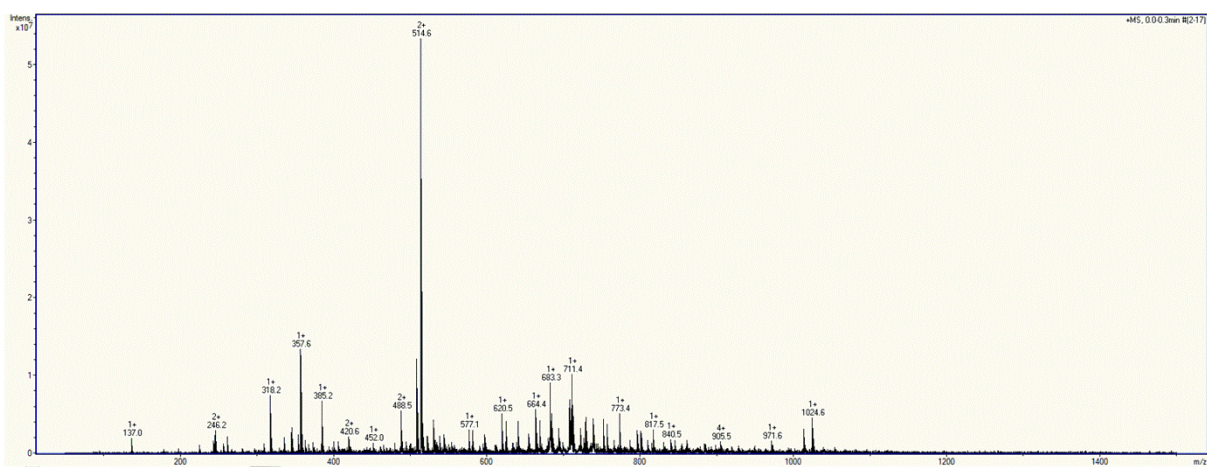
Slika D142. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **3-9-b** u acetonitrilu- d_3 pri 298 KSlika D143. Spektar ESI-MS onečišćenja **3-9-b** snimljen uz pozitivnu ionizacijuSlika D144. Spektar ^1H - ^{13}C HSQC onečišćenja **3-9-c** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K



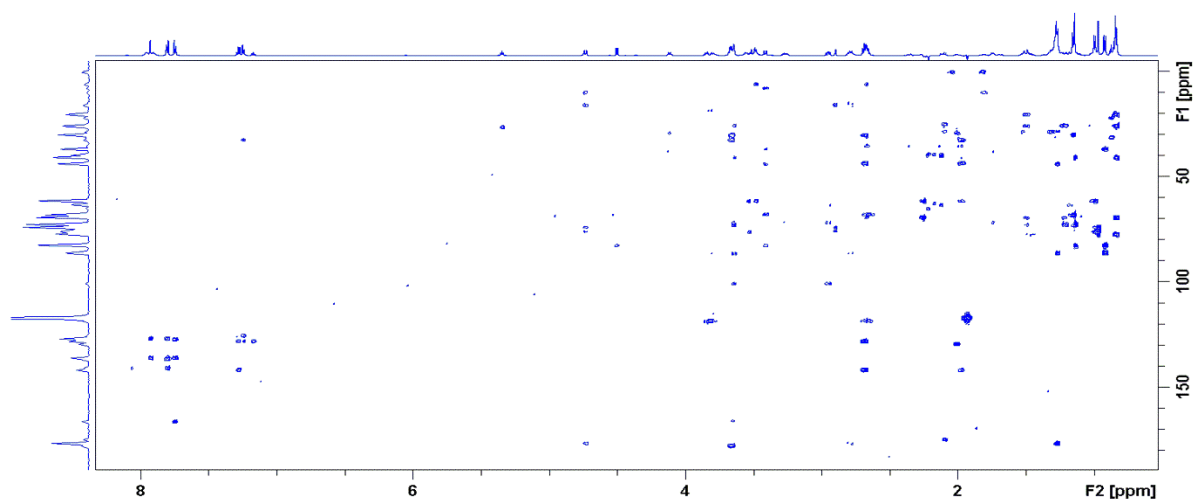
Slika D145. Spektar COSY onečišćenja 3-9-c u acetonitrilu-d3 pri 298 K



Slika D146. Spektar NOESY onečišćenja 3-9-c u acetonitrilu-d3 pri 298 K



Slika D147. Spektar ESI-MS onečišćenja 3-9-c snimljen uz pozitivnu ionizaciju



Slika 148. Spektar ^1H - ^{13}C HMBC onečišćenja **3-9-c** u acetonitrilu- d_3 pri 298 K

§ 9. ŽIVOTOPIS

Iva Habinovec rođena je 7. listopada 1990. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala je u Posavskim Bregima, a opću gimnaziju u Srednjoj školi Ivan Švear u Ivanić-Gradu. Godine 2009. upisala je Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Titulu prvostupnika kemije stekla je 2012. godine. Iste godine upisala je Diplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer analitička kemija i biokemija. Diplomirala je 2014. godine s temom "*Analiza triazinskih i fenilurea-herbicida u tlu mikrovalnom ekstrakcijom i tekućinskom kromatografijom*" pod mentorstvom dr. sc. Vlaste Drevenkar, nasl. red. prof.

Od 2. veljače 2015. godine zaposlena je kao stručni suradnik u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U akademskoj godini 2015. / 2016. upisala je Poslijediplomski studij na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, polje Kemija, grana Analitička kemija.

U znanstvenom i stručnom radu bavi se razvojem, validacijom i primjenom kromatografskih metoda te vezanim sustavom tekućinske kromatografije, ekstrakcije na čvrstoj fazi i spektroskopije NMR (LC-SPE-NMR). Do sada je objavila 9 znanstvenih radova. Sudjelovala je na brojnim znanstvenim i stručnim skupovima s ukupno 24 kongresna priopćenja od kojih su 2 pozvana predavanja. Dobitnica je stipendije CEEPUS u akademskoj godini 2015. / 2016. za jednomjesečni boravak na Karlovom sveučilištu u Pragu. Tamo je boravila u Laboratoriju za fizikalnu i makromolekularnu kemiju radi stručnog usavršavanja u području tekućinske kromatografije. Tijekom boravka na Karlovom sveučilištu bavila se odjeljivanjem kiralnih spojeva tekućinskom kromatografijom. Godine 2019. pohađala je tečaj za rad na uređaju LC-SPE-NMR-MS u tvrtki Bruker, Rheinstetten, Njemačka,. Bila je suradnica na projektima Makrozoni (2018. – 2023.) i Met4Pharm (2015. – 2016.) te na dvama bilateralnim projektima između Kemijskog odsjeka PMF-a i Instituta za kemiju Sveučilišta u Grazu. Neposredna je voditeljica 6 diplomskih radova i jednog rada nagrađenog Rektorovom nagradom u akademskoj godini 2020. / 2021.

Sudjeluje u izvođenju praktikumske nastave iz kolegija Zavoda za analitičku kemiju na Preddiplomskom i Diplomskom sveučilišnom studiju kemije te na Integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju biologija i kemija; kemija i biologija.

Sudjelovala je aktivno u popularizaciji znanosti na Kemijskom odsjeku PMF-a u sklopu manifestacija Otvoreni dan kemije te Dan i noć na PMF-u. Članica je Hrvatskog kemijskog društva od 2014. godine.