

Spregnuti sustavi u analizi lijekova i aktivnih biomolekula

Smetko, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

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:217:191385>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Katarina Smetko

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Spregnuti sustavi u analizi lijekova i aktivnih biomolekula

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2023. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

13. srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Analiza bioloških uzoraka	1
1.2. Analiza nečistoća u lijekovima.....	1
1.3. Metode analize lijekova	2
§ 2. LC–SPE–NMR	3
2.1. Tekućinska kromatografija (LC).....	3
2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE).....	4
2.3. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR).....	4
§ 3. PRIMJENA	6
3.1. Produkti degradacije i nečistoće u lijekovima.....	6
3.2. Biološki metaboliti.....	8
§ 4. ZAKLJUČAK	10
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	11

§ Sažetak

Zbog sve veće prisutnosti lijekova u svakodnevnom životu, održavanje kvalitete lijekova i razvoj novih lijekova za tržište velik je izazov u farmaceutskoj industriji. Kako bi se odredili nusprodukti, produkti degradacije i onečišćenja potrebna je primjena suvremenih analitičkih metoda. Metode određivanja kvalitete lijekova određene su različitim zakonskim regulativama i međunarodno usuglašenim preporukama koje se neprekidno revidiraju kako bi se osigurala efikasnost i sigurnost farmaceutskih produkata. Analiza prirodnih uzoraka i bioloških ekstrakata može dovesti do novih spoznaja u razvoju lijekova. Primjena spregnutog sustava LC–SPE–NMR pokazala se izrazito korisno u detekciji, identifikaciji i razjašnjavanju strukture nepoznatih spojeva s potencijalnim (pozitivnim ili negativnim) farmakološkim djelovanjem.

§ 1. UVOD

1.1. Analiza bioloških uzoraka

Kemijska raznolikost i raznovrsnost biološki aktivnih metabolita iz prirodnih proizvoda pronalazi svoju primjenu ne samo u farmaceutskoj industriji, već i prehrambenoj industriji i kozmetici. Međutim, prije njihove primjene, potrebna je izolacija i identifikacija spojeva od interesa. Kemijska istraživanja metabolita prirodnih proizvoda zahtijevaju učinkovite tehnike odvajanja i određivanja strukture zbog kompleksnosti sastava bioloških ekstrakata, ali i osjetljivosti istih na promjene uvjeta okoline.¹

1.2. Analiza nečistoća u lijekovima

U farmaceutskoj industriji postoji potreba za analizom čistoće, a s time i kvalitete lijekova, tj. farmakološki aktivnih tvari (eng. Active pharmaceutical ingredients), kao i pomoćnih tvari i onečišćenja koja se mogu naći u lijekovima.² Farmakološki aktivne tvari su spojevi koji uzrokuju željeni učinak lijeka, te neki lijekovi mogu sadržavati i više aktivnih tvari s različitim djelovanjem.³ Prilikom formulacije ili degradacije farmakološki aktivnih tvari i ostalih produkata lijekova može doći do nastajanja tzv. farmaceutskih onečišćenja koja utječu na kvalitetu.² Razvojem selektivnijih i osjetljivijih analitičkih metoda omogućeno je detaljnije određivanje nečistoća u prirodnim i sintetskim proizvodima.

Prema smjernicama Međunarodne konferencije o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu kod ljudi (eng. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, skraćeno ICH) onečišćenja se profiliraju opisom identificiranih i neidentificiranih supstanci prisutnih u novoj ljekovitoj tvari.⁴ Profiliranje nečistoća je skupni naziv za analitičke aktivnosti potrebne za detekciju, identifikaciju i određivanje strukture, te kvantitativno određivanje organskih i anorganskih onečišćenja u lijekovima.⁵ Prema aktualnim procesima farmaceutskog razvoja, nečistoće u farmakološki aktivnim tvarima imaju identifikacijski prag od 0,10% i kvalifikacijski prag od 0,15% za dnevnu dozu aktivne tvari od 2 g. Kvalifikacijski prag se definira kao minimalna količina tvari potrebna za sakupljanje podataka i procjenu biološke sigurnosti određenog onečišćenja. Za dnevne doze farmakološki aktivne tvari manje od 2 g određeni su identifikacijski i kvalifikacijski prag od 0,05% za onečišćenja.⁴ Kako bi se dobila

pouzdana procjena čistoće lijekova u skladu s ovim strogim standardima potrebno je koristiti najsvremenije validirane analitičke metode.

1.3. Metode analize lijekova

Profiliranje nečistoća započinje identifikacijom i određivanjem strukture, a zatim slijedi odabir selektivnih metoda za njihovo kvantitativno određivanje. Kod profiliranja nečistoća moguće je koristiti separacijske metode ili metode koje ne zahtijevaju separaciju, međutim njihova simultana primjena daje veću učinkovitost.⁵ Za takvu simultanu primjenu sprežu se analitičke metode za separaciju različitih prisutnih sastojaka, te metode za detekciju i kvantifikaciju odvojenih sastojaka. Najšire primijenjena separacijska metoda kod profiliranja je tekućinska kromatografija na stupcu (LC), međutim poznate su i primjene plinske kromatografije (GC), tankoslojne kromatografije (TLC), kapilarne elektroforeze (CE) i drugih metoda. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i spektrometrija masa (MS) pokazale su se kao izrazito korisne metode identifikacije nečistoća kod uzoraka kompleksnog sastava.² Spektrometrija masa je analitička tehnika koja se temelji na ionizaciji i fragmentaciji uzorka, te mjerenju omjera mase i naboja pojedinih fragmenata.⁶ Primjenom spektrometrije masa mogu se dobiti korisne informacije o strukturi organskih spojeva, čak i u izrazito malim količinama. Međutim, ako od ranije nisu poznate informacije o molekulskom kosturu i ako se onečišćenje znatno razlikuje od ljekovite tvari u građi, identifikacija onečišćenja u lijekovima je otežana.²

U nastavku ovog rada detaljnije će se razraditi spregnuti sustav analize LC–SPE–NMR, prednosti njegovog korištenja u detekciji i identifikaciji poznatih i nepoznatih spojeva u lijekovima.

§ 2. LC–SPE–NMR

2.1. Tekućinska kromatografija (LC)

Spregnute tehnike analize kombiniraju tehnike odvajanja s tehnologijom spektroskopske detekcije on-line kako bi se iskoristile prednosti obje metode.⁷ Već ranije spomenuta kromatografija je tehnika odvajanja spojeva na temelju različitih brzina kojima ih mobilna faza prenosi kroz stacionarnu fazu.⁸ Podjela kromatografskih metoda s obzirom na agregacijsko stanje korištene mobilne i stacionarne faze može se pronaći u tablici 1.

Tablica 1. Podjela kromatografskih metoda prema agregacijskom stanju faza.

Skraćeni naziv metode	Mobilna faza	Stacionarna faza
LSC	Tekućina	Krutina
GSC	Plin	Krutina
LLC	Tekućina	Tekućina
GLC	Plin	Tekućina

Kada se spomene pojam tekućinske kromatografije, to se odnosi na agregacijsko stanje mobilne faze. Kako otapalo, zajedno sa smjesom, prolazi kroz stacionarnu fazu, različite komponente smjese različito interagiraju sa stacionarom fazom, što dovodi do odvajanja. Prema izvedbi se kromatografija može podijeliti na kromatografiju na stupcu i planarnu kromatografiju. U planarnoj kromatografiji se stacionarna faza nalazi na ravnoj površini, a mobilna faza uzorak prenosi kapilarnim djelovanjem ili pod utjecajem gravitacije. Planarna kromatografija je jedino moguća kada je mobilna faza tekućina. Kod kromatografije na stupcu je stacionarna faza u uskoj cijevi.

Kod analize lijekova je česta primjena kromatografije obrnutih faza (RP–LC, Reverse–Phase Liquid Chromatography), pri kojoj je stacionarna faza nepolarna, a pokretna polarna. U slučaju kromatografije normalnih faza vrijedi suprotno.

U sustavima on-line često se primjenjuje tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, High–Performance Liquid Chromatography) kod koje se koriste punila vrlo sitnih zrna i tlačna pumpa kako bi se kromatografija odvijala pri tlakovima do 400 bara. Metoda UPLC (Ultra–Performance Liquid Chromatography) zahtijeva tlakove iznad 1000 bara. Korištenjem

punila sa sitnim česticama i visokog tlaka omogućeno je brže i efikasnije odvajanje spojeva iz malog volumena smjese.⁸

2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je metoda odjeljivanja spojeva koja kao čvrstu ekstrakcijsku fazu koristi hidrofobne organske spojeve obložene ili kemijski vezane na prah silicijeva dioksida. Tijekom ekstrakcije uzorka funkcijske skupine organskih molekula se vežu na čvrstu fazu, dok otapalo prolazi kroz uložak ili kolonu. Time dolazi do selektivnog zadržavanja spojeva od interesa, dok se neželjeno otapalo uklanja. Spojevi vezani na čvrstu fazu mogu se koncentrirati, a zatim isprati željenim otapalom. To je pogotovo korisno kod sustava LC–SPE–NMR jer se velika količina deuteriranog otapala, koje je potrebno za NMR, ne mora trošiti tijekom kromatografije, već se željene ekstrahirane tvari otapaju u deuteriranom otapalu netom prije spektroskopskog mjerenja. Koncentriranje željenih spojeva također je vrlo korisno kod spektroskopije ¹³C NMR zbog prirodno male zastupljenosti izotopa ugljika-13 u odnosu na izotop ugljika-12 u organskim uzorcima.⁸

2.3. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije je apsorpcijska spektroskopska tehnika kojom se proučavaju jezgre s nuklearnim spinom različitim od nule kako bi se odredila struktura molekule. Neke od jezgara koje se mogu promatrati spektroskopijom NMR su ¹H, ¹¹B, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁹F, ³¹P, ³³S.⁹

Osnovno načelo spektroskopije NMR temelji se na promatranju interakcije jezgri, koje precesiraju pod utjecajem vanjskog magnetskog polja, i radiofrekvencijskog zračenja. NMR aktivne jezgre pod utjecajem vanjskog magnetskog polja precesiraju oko osi magnetskog polja pri čemu dolazi do podjele spinskih energetske stanja. Primjenom radiofrekvencijskih pulseva čija je frekvencija jednaka frekvenciji precesiranja jezgri dolazi do rezonancije. Time jezgra prelazi u više spinsko energetske stanje nakon čega slijedi relaksacija, što se detektira kao NMR signal. Energija potrebna za rezonanciju je specifična za svaki tip jezgre i ovisi o kemijskom okruženju jezgre unutar molekule. Signali NMR koje generiraju jezgre promatranog spoja pružaju informacije o identitetu, čistoći i strukturnim značajkama.^{6,9-11} Kod promatranja jezgara ¹H koriste se otapala u kojima su svi vodici (¹H, procij) zamijenjeni deuterijem (²H), koji je aktivan na drugoj frekvenciji, kako bi se analizirali signali uzorka bez smetnji otapala.⁶

Spektrometar NMR, se sastoji od supravodljivog magneta koji generira intenzivno, homogeno, stabilno magnetsko polje, sonde koja koristi zavojnice za pobuđivanje i detekciju signala, radiofrekvencijskog odašiljača velike snage, prijammika za pojačavanje signala, analogno-digitalnog pretvarača, pulsnog programatora koji upravlja svim funkcijama spektrometra i računala za obradu podataka. Supravodljiv magnet građen je u obliku zavojnice čiji otpor pri niskim temperaturama (ispod 6 K) pada na nulu. Kako bi se magnet održao u supravodljivom stanju, zavojnica je uronjena u tekući helij. Spremnik tekućeg helija je okružen tekućim dušikom kako bi se smanjilo zagrijavanje helija.^{6,10}

Spektroskopija NMR ima svojih prednosti kao što je široka primjena, nedestruktivna priroda, te jednostavna priprema uzorka. Dobiveni spektri su vrlo specifični, pa se analizom mogu dobiti bitne informacije za identifikaciju, detaljnu strukturnu analizu i razjašnjavanje stereokemije poznatih i nepoznatih spojeva u njihovim smjesama, pod uvjetom da su signali dovoljno odvojeni. Neki od nedostataka su visoka cijena opreme i relativno niska osjetljivost detekcije u usporedbi s spektrometrijom masa. Osjetljivost detekcije se može poboljšati povećanjem broja skeniranja i korištenjem magnetskog polja veće jakosti te primjenom tzv. krio-tehnologije.^{2,6}

Primjenom više spregnutih sustava analize zajedno s LC–SPE–NMR ili sprezanjem LC–SPE–NMR s još nekom metodom detekcije, npr. spektrometrijom mase, također se mogu poboljšati rezultati analize.

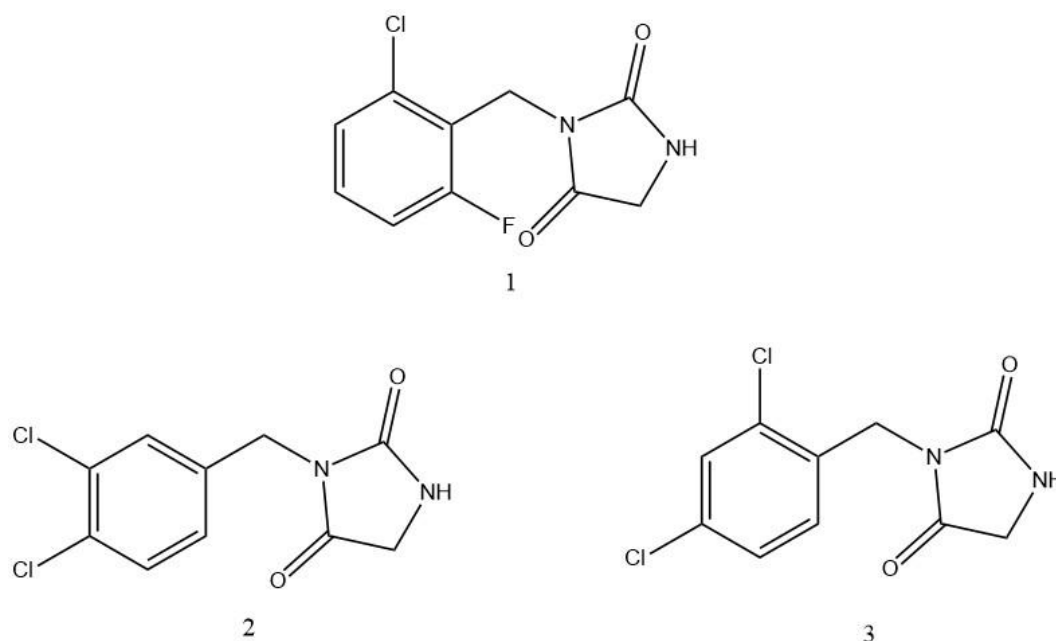
§ 3. PRIMJENA

3.1. Produkti degradacije i nečistoće u lijekovima

Koristeći sustav LC–SPE–NMR identificirana su dva produkta degradacije za eksperimentalni lijek BMS-753493.¹² BMS-753493 je potencijalni lijek u liječenju raka koji djeluje na način da inhibira folatne receptore na površini stanica koji su izrazito eksprimirani u tumorskim tkivima. Do produkata razgradnje se došlo analizirajući modelni spoj BMS-748285 koji je sadržavao kemijski značajne fragmente lijeka, te su rezultati ekstrapolirani na BMS-753493. Utvrđivanjem struktura produkata degradacije određeni su i mehanizmi degradacije.¹²

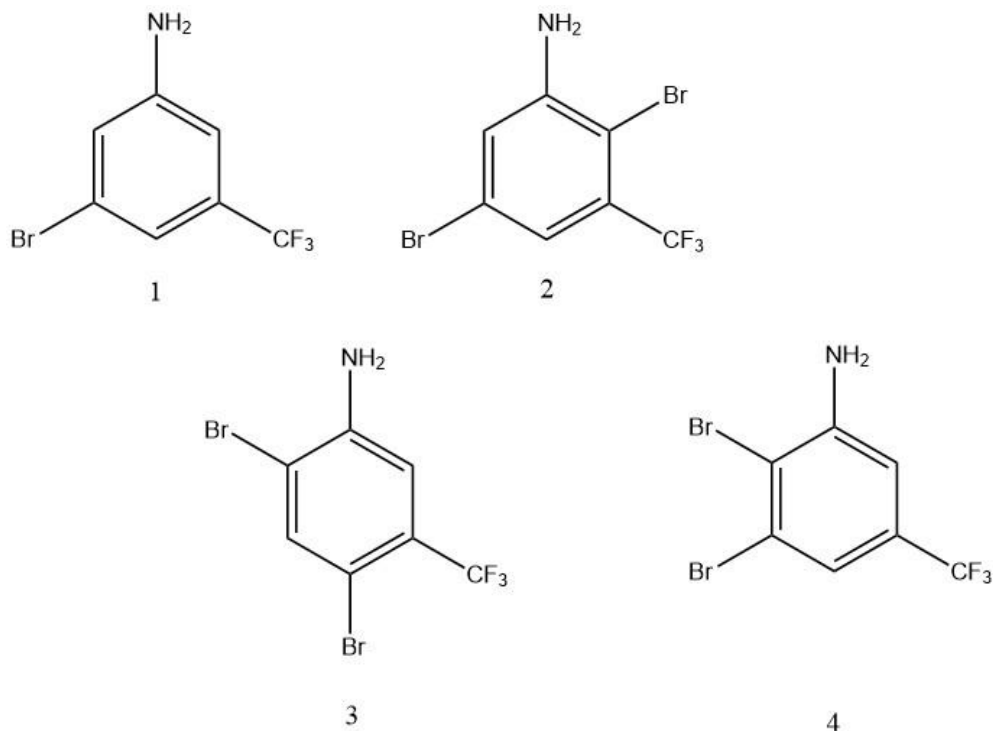
Kombinacijom LC–SPE/krio NMR i tandemске spektrometrije masa (MS/MS) određene su strukture 7 biološki aktivnih popratnih spojeva koji nastaju tijekom sinteze konjugata azitromicina. Azitromicin je makrolidni antibiotik širokog spektra antibiotskog djelovanja. Konjugati azitromicina, kao i dobiveni produkti degradacije pokazali su se kao potencijalni lijekovi kod bakterija otpornih na azitromicin.¹³

Detektirane i identificirane su dvije primjese kod sintetskog agonista za α_2 adrenergički receptor (adrenoceptor), Girsupan, tj. LPSF-PT-31 (slika 1). Agonisti α_2 adrenoceptora su spojevi koji se koriste kao pomoćni lijekovi za poboljšanje terapijske učinkovitosti i trajanja djelovanja analgetika (lijekova protiv bolova).¹⁴



Slika 1. Kemijske strukture Girsupana (1) i pronađenih primjesa (2,3)

3-bromo-(trifluorometil)anilin je jedan od mogućih prekursora za dobivanje farmakološki aktivnih tvari. Zbog utjecaja fluora na svojstva molekula, moguće ga je pronaći u mnogim lijekovima. Primjenom spregnutog sustava strukturno su okarakterizirana tri spoja (slika 2) koji se mogu pronaći kao onečišćenja uz 3-bromo-(trifluorometil)anilin.¹⁵



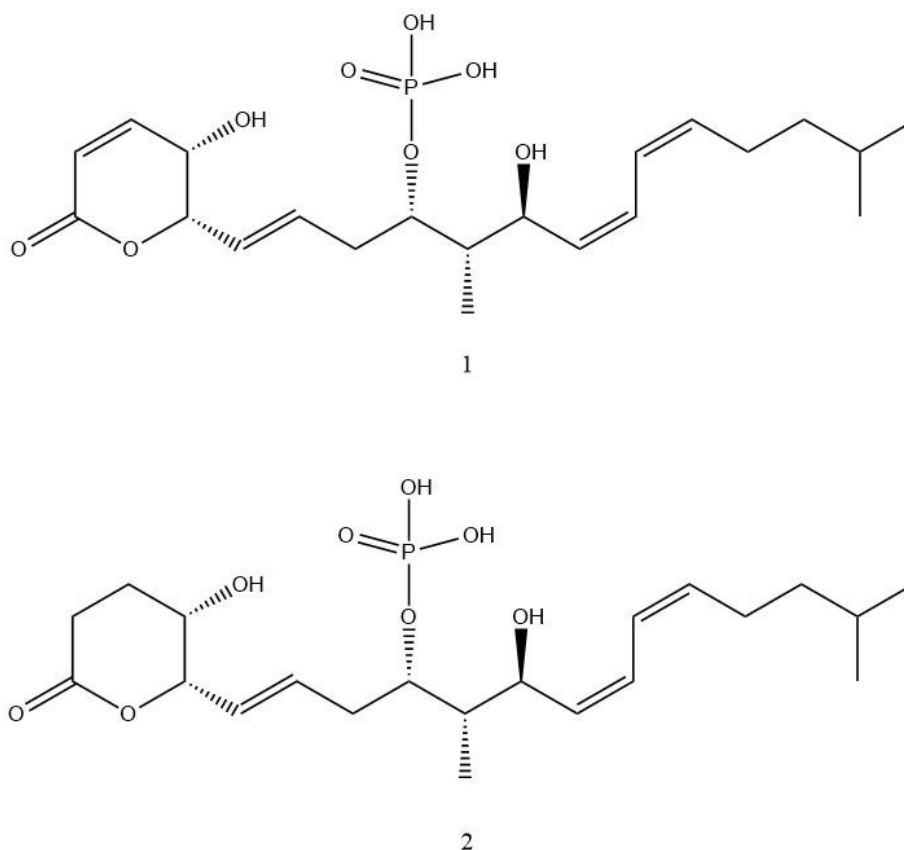
Slika 2. Kemijske strukture 3-bromo-(trifluorometil)anilina (1) i primjesa koje su pronađene u uzorku 3-bromo-(trifluorometil)anilina (2–4)

Hidroksiklorokin sulfat (HCQ) se koristi pri liječenju malarije i autoimunih bolesti, te kao antivirusni lijek. Spoj je korišten i kao eksperimentalni lijek u liječenju bolesti COVID-19. Korištenjem sustava LC–SPE–NMR i UPLC–MS/MS pronađeno je i identificirano 9 primjesa. Usporedbom s poznatim strukturama spojeva, pretpostavljeni su i mehanizmi nastajanja primjesa.¹⁶

Učinkovitost primjene sustava LC–SPE–NMR pokazana je i na primjeru analize etodolaka.¹⁷ Etodolak je nesteroidni protuupalni lijek koji se koristi kod snižavanja povišene tjelesne temperature i kod ublažavanja bolova. Analizom uzorka polazne sirovine za sintezu lijeka, 7-etiltriptofola, određene su strukture 13 različitih onečišćenja.¹⁷

3.2. Biološki metaboliti

Iz bakterije roda *Streptomyces* fermentacijom su dobivena dva metabolita koji spadaju u skupinu poliketida. Dobiveni spojevi, phosdiecin A i phosdiecin B (slika 3), su potencijalne farmakološki aktivne tvari s antitumorskim i antibiotskim djelovanjem. Njihova struktura je objašnjena koristeći spektroskopiju NMR.¹⁸



Slika 3. Kemijske strukture phosdiecina A (1) i phosdiecina B (2)

Promatranjem biljnog ekstrakta *Stryphnodendron polyphyllum*, koji se koristi kao prirodni lijek u Brazilu, te njegovog vezanja na protein albumin, identificirane su strukture četiri spoja, miricetin-3-O-ramnopiranozid, kvercetin-3-O-glukopiranozid, kvercetin-3-O-ksilopiranozid i kvercetin-3-O-ramnopiranozid. Prikupljene strukturne informacije o pronađenim spojevima pružaju nove spoznaje u razvoju novih lijekova i inhibitora za protein albumin.¹⁹

Primjenom sustava UPLC-MS i LC-SPE-NMR na ekstraktu biljke *Ipomoea aquatica* određene su kemijske strukture bioaktivnih metabolita. Lišće i stabljike biljke *Ipomoea aquatica* pokazuje sposobnost vezanja arsena, kadmija i olova, te prema istraživanjima inhibira

intestinalni unos teških metala. Među bioaktivnim metabolitima pronađeni su pentozidni i rutinozidni spojevi čija prisutnost do tad nije bila poznata.²⁰

§ 4. ZAKLJUČAK

Primjena spregnutih sustava u farmaceutskoj industriji je izrazito koristan alat u rješavanju kompleksnih analitičkih problema, pri čemu se sustav LC–SPE–NMR pokazao kao korisna analitička metoda za detekciju i identifikaciji onečišćenja, produkata degradacija i bioloških metabolita u lijekovima i prirodnim ekstraktima. Primjenom metode su pronađene mnoge potencijalne farmakološki aktivne tvari koje otvaraju vrata dizajnu novih lijekova. Također, omogućeno je poboljšanje sigurnosti i efikasnosti postojećih farmaceutskih proizvoda profiliranjem prisutnih onečišćenja. Korištenje spektroskopije NMR pokazalo se kao najprikladnija tehnika za identifikaciju i kvalitativnu analizu nepoznatih spojeva. Primjenom jakih magnetskih polja, te sprezanjem sustava sa spektrometrijom masa može se značajno povećati osjetljivost metode.² Najveći nedostatak metode, koji zasad nema konkretnog rješenja, je visoka cijena instrumenata.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. T. K. T. Do, F. Hadji-Minaglou, S. Antoniotti, X. Fernandez, Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography), *J. Chromatogr. A* **1325** (2014) 256–260
2. R.M. Maggio, N.L. Calvo, S.E. Vignaduzzo, T.S. Kaufman, Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 102–122
3. *Active pharmaceutical ingredient*, *National Institute of Health*, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/active-pharmaceutical-ingredient> (datum pristupa: 27. lipnja 2023.)
4. Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu kod ljudi, *Impurities in new drug substances Q3A(R2)*, International Conference on Harmonisation, Međunarodni savez farmaceutskih proizvođača i udruga, Ženeva, Švicarska, 2006.
5. S. Görög, Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade, *Trends Anal. Chem.* **101** (2018) 2–16
6. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara, Varaždin, 2013, str. 8–89.
7. *Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy*, *National Institute of Health*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658024/> (datum pristupa: 28. lipnja 2023.)
8. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Cengage Learning, Boston, 2014, str. 857–921.
9. *NMR active nuclei for biological and biomedical applications*, *Open Medscience*, <https://openmedscience.com/nmr-active-nuclei-for-biological-and-biomedical-applications/> (datum pristupa: 7. srpnja 2023.)
10. J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York, 2010, str. 5–72.
11. S. Gummadi, D. S. Siyyadri, Nuclear magnetic resonance and hyphenations – a review, *Int J Pharm Sci & Res* **11** (2020) 5932–5950.

12. M. Gokhale, A. Thakur, F. Rinaldi, Degradation of BMS-753493, a novel epothilone folate conjugate anticancer agent, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **39** (2013) 1315–1327
13. I. Habinovec, I. Mikulandra, P. Pranjić, S. Kazazić, H. Č. Paljetak, A. Barišić, A. B. Bertoša, M. Bukvić, P. Novak, Screening of Novel Antimicrobial Diastereomers of Azithromycin–Thiosemicarbazone Conjugates: A Combined LC-SPE/Cryo NMR, MS/MS and Molecular Modeling Approach, *Antibiotics* **11** (2022)
14. J. O. Cardoso, S. S. Thomasi, T. Venâncio, I. R. Pitta, M. C. A. de Lima, R. V. Oliveira, Preparative Separation and Structural Identification of Impurities of a New α_2 -Adrenoceptor Agonist Using Stacking Injection, LC-MSⁿ and LC-SPE-NMR, *J. Braz. Chem. Soc.* **28** (2017) 1038–1047
15. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan, P. Novak, Rapid Identification of Unknown Impurities in 3-Bromo-5-(trifluoromethyl)aniline by LC-SPE/NMR, *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 543–547
16. D. Xu, F. Pan, H. Ruan, N. Sun, A study of impurities in the repurposed COVID-19 drug hydroxychloroquine sulfate using ultra-high-performanceliquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **36** (2022)
17. K. Janeš, *Analiza onečišćenja 7-etilriptofola pomoću sustava LC-SPE/krio NMR*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017
18. S. S. Thomasi, C. Ladeira, D. Ferreira, R. da Fontoura Sprenger, A. C. Badino, A. G. Ferreira, T. Venâncio, Identification of Two New Phosphorylated Polyketides from a Brazilian Streptomyces sp. Through the Use of LC-SPE/NMR, *Helv. Chim. Acta* **99** (2016) 281–285
19. S. A. K. Tanoli, N. U. Tanoli, T. M. Bondancia, S. Usmani, Z. Ul-Haq, J. B. Fernandes, S. S. Thomasi, A. G. Ferreira, Human serum albumin-specific recognition of the natural herbal extract of Stryphnodendron polyphyllum through STD NMR, hyphenations and docking simulation studies, *RSC Advances* **30** (2015) 23431–23442
20. M. Hefny Gad Hussein, E. Tuenter, N. El-Sawi, S. Younes, E-M. El-Ghadban, K. Demeyer, L. Pieters, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, Identification of some Bioactive Metabolites in a Fractionated Methanol Extract from Ipomoea aquatica (Aerial Parts) through TLC, HPLC, UPLC-ESI-QTOF-MS and LC-SPE-NMR Fingerprints Analyses. *Phytochemical Analysis* **29** (2018) 5–15