

Izolacija i strukturna karakterizacija komponenata reakcijske smjese 9a-(2-feniletil) makrozona primjenom sustava LC-SPE/NMR

Benčić, Noelle

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:265560>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Noelle Benčić

**IZOLACIJA I STRUKTURNA
KARAKTERIZACIJA KOMPONENATA
REAKCIJSKE SMJESE
9a-(2-FENILETIL)MAKROZONA
PRIMJENOM SUSTAVA LC-SPE/NMR**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Ive Habinovec.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije (šifra projekta: IP-2018-01.8098).

Zahvale

Najiskrenije zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici, pomoći, prijedlozima, povjerenju i stečenom iskustvu koje ću pamtiti.

Hvala neposrednoj voditeljici mag. chem. Ivi Habinovec na velikom strpljenju, susretljivosti, trudu, nesebičnoj pomoći, ohrabrivanju i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada.

Hvala mag. chem. Ivani Mikulandri na pomoći pri asignaciji spektara NMR.

Zahvaljujem Ivanu Grgičeviću i Mirjani Bukvić (Fidelta d.o.o.) na savjetima i ispitivanjima provedenima na sintetiziranome spoju.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković i dr. sc. Željki Car na pomoći kod sinteze i nomenklature.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Željki Soldin na ukazanom trudu pri lektoriranju ovog rada.

Hvala svim dragim prijateljima i kolegama koji su me podržavali, hrabрили i motivirali tijekom studiranja.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji, najviše roditeljima i nonićima, bez čije velike podrške, ljubavi i odricanja danas ne bih bila ovdje gdje jesam.

Sadržaj

SAŽETAK	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Makrolidni antibiotici	3
2.2. Azalidi	6
2.2.1. Azitromicin	6
2.3. Tiosemikarbazoni	11
2.4. Onečišćenja u lijekovima	13
2.4.1. Istraživanje profila čistoće (engl. <i>impurity profiling</i>)	15
2.5. Spregnuti sustav LC-SPE/NMR	15
2.5.1. LC-NMR	15
2.5.2. LC-SPE-NMR	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
PanReac AppliChem (SAD)	25
3.1. Radni uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography, HPLC</i>)	25
3.1.1. Priprava pokretne faze za analizu HPLC	26
3.1.2. Priprava standardnih otopina	26
3.1.3. Priprava uzorka za analizu HPLC	26
3.2. Radni uvjeti ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. <i>Solid Phase Extraction, SPE</i>)	27
3.3. Snimanje spektara NMR	27
3.3.1. Priprava uzorka za snimanje spektara NMR	27
3.3.2. ¹ H NMR	28
3.3.3. Homonuklearni i heteronuklearni 2D spektri NMR	28
3.4. Spektrometrija masa (engl. <i>Mass Spectrometry, MS</i>)	31
3.5. Pročišćavanje reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona kolonskom kromatografijom	31
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Tekućinskokromatografska analiza reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona	32
4.2. Istraživanje učinkovitosti ekstrakcije spojeva na SPE-nosače	35
4.3. Analiza reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona tehnikom LC-SPE/NMR	38
4.3.1. Analiza glavne komponente	38

4.3.2. <i>Izolacija i identifikacija nepoznatih onečišćenja iz reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona</i>	41
§ 5. ZAKLJUČAK	48
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	49
§ 7. LITERATURNI IZVORI	51
§ 8. DODATAK	VIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Izolacija i strukturna karakterizacija komponenata reakcijske smjese
9a-(2-feniletil)makrozona primjenom sustava LC-SPE/NMR

Noelle Benčić

Makrozoni su novi konjugati azitromicina i derivata tiosemikarbazida koji pokazuju zadovoljavajuće antibakterijsko djelovanje *in vitro* na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Zbog sve učestalije pojave bakterija rezistentnih na makrolide, nastavljaju se istraživanja s ciljem razvoja novih oblika makrolidnih antibiotika koji će biti djelotvorni na otporne bakterijske sojeve. Izolacija i određivanje strukture komponenata reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona u ovome radu postignuta je primjenom vezanog sustava LC-SPE/NMR. Istraženi su uvjeti za uspješnu izolaciju i zadržavanje analita na SPE-nosačima. Makrozon je pokazao dobro zadržavanje na nepolarnoj nepokretnoj fazi SPE-nosača baziranoj na silika-materijalu, dok se veći broj polarnih onečišćenja zadržao bolje na divinilbenzenskim polimernim SPE-nosačima. Uz to, većina polarnih onečišćenja uspješno je ekstrahirana koristeći pritom veći dodatni protok vodene pokretne faze. Na temelju snimljenih jedno- i dvodimenzijjskih spektara NMR, te analizom spektara MS, predložene su strukture izoliranih komponenata.

(54 stranica, 69 slika, 11 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: azitromicin, LC-SPE/NMR, makrolidni antibiotici, makrozoni, profil onečišćenja, tiosemikarbazoni, vezani sustavi

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Neposredni voditelj: mag. chem. Iva Habinovec

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Datum diplomskog ispita: 20. prosinca 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Isolation and structural characterization of 9a-(2-phenylethyl)macrozone reaction mixture components using the LC-SPE/NMR

Noelle Benčić

Macrozones are new conjugates of azithromycin analogues, 9a-(γ -aminopropyl) derivatives, and thiosemicarbazides which show good *in vitro* activity against selected Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. Due to the increasing number of macrolide-resistant bacteria, a search for new antibiotics continues, aimed at discovery of more effective antimicrobial agents. In this work, isolation and determination of the 9a-(2-phenylethyl)macrozone reaction mixture components was achieved using the LC-SPE/NMR system. Several parameters for successful separation and extraction of analytes were optimised. It was found that silica-bonded phase gave satisfactory results for the main compound, macrozone, however, for more polar compounds divinylbenzene polymer phase was better. Additionally, extraction efficiency for more polar impurities was obtained by using higher make-up flow. Structures of the isolated components were proposed on the basis of the recorded one- and two-dimensional NMR spectra and the MS spectra, respectively.

(54 pages, 69 figures, 11 tables, 56 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: azithromycin, hyphenated systems, impurity profiling, LC-SPE/NMR, macrolide antibiotics, macrozones, thiosemicarbazone

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Assistant mentor: mag. chem. Iva Habinovec

Reviewers:

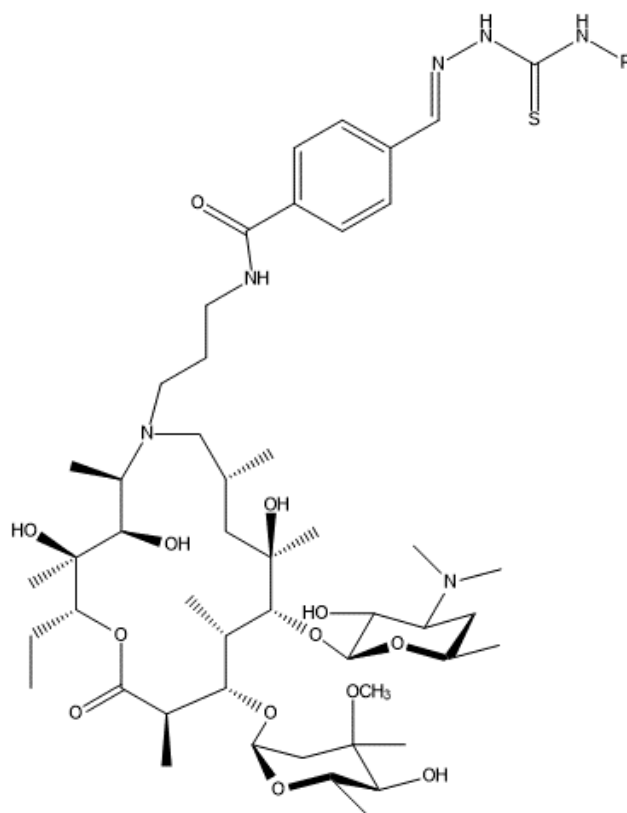
1. Dr. sc. Predrag Novak, Professor
 2. Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, Professor
 3. Dr. sc. Željka Soldin, Professor
- Substitute: Dr. sc. Branimir Bertoša, Professor

Date of exam: 20th December 2019

§ 1. UVOD

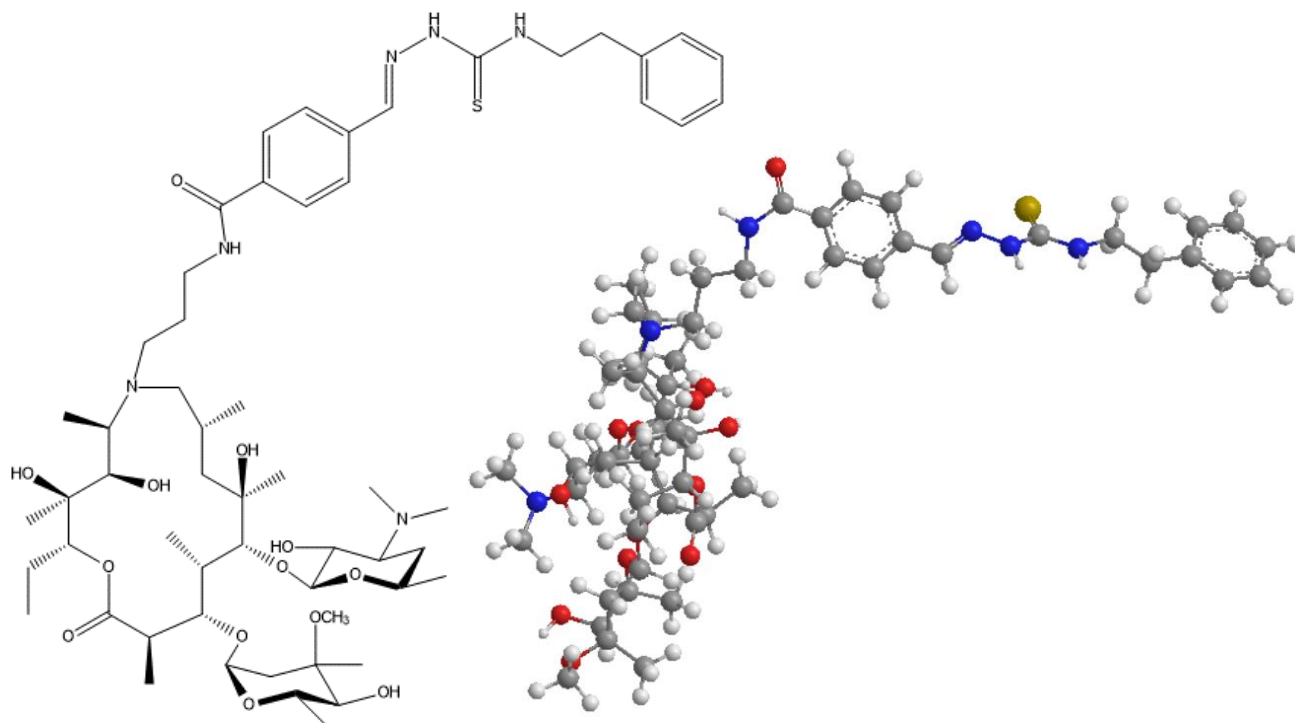
Tehnika LC-SPE-NMR predstavlja suvremen spregnuti analitički sustav koji u posljednjih dvadeset godina sve više pronalazi svoju primjenu u analizi farmaceutika, metabolita, prirodnih spojeva, razgradnih produkata te onečišćenja.^{1,2} Sprega tekućinske kromatografije (engl. *Liquid Chromatography*, LC) s ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) omogućuje učinkovito odjeljivanje komponenata smjese na kromatografskoj koloni, zatim izolaciju i ukoncentriravanje svakog pojedinog analita na SPE-nosaču (engl. *SPE-cartridge*), nakon čega slijedi identifikacija i određivanje strukture izoliranog spoja spektroskopijom NMR.

Makrozoni su novi konjugati azitromicina i derivata tiosemikarbazida koji pokazuju zadovoljavajuće antibakterijsko djelovanje *in vitro* na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (Slika 1.1).^{3,4}



Slika 1.1. Opća kemijska struktura makrozona.⁵

Konjugacijom derivata azitromicina, 9a-(γ -aminopropila), i 2-feniletil tiosemikarbazida sintetiziran je novi 9a-(2-feniletil)makrozon^{6,7} (Slika 1.2.).



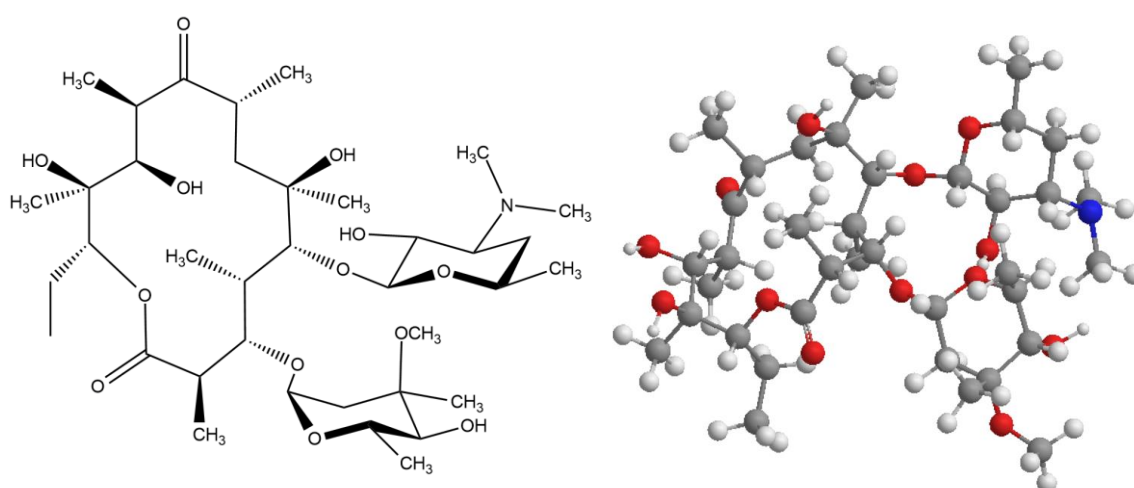
Slika 1.2. 2D i 3D strukture 9a-(2-feniletil)makrozona.

Cilj ovog diplomskog rada jest izolacija, identifikacija i određivanje strukture komponenata reakcijske smjese nastalih u sintezi 9a-(2-feniletil)makrozona primjenom vezanog sustava LC-SPE/NMR. Predložit će se metoda HPLC za učinkovito kromatografsko odjeljivanje sastojaka reakcijske smjese. Istražit će se uvjeti za uspješnu izolaciju i zadržavanje analita na SPE-nosačima (odabir nepokretne faze SPE-nosača i dodatni protok pokretne faze, tzv. *make-up* protok). Na temelju snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR odredit će se strukture uspješno izoliranih komponenata. Provedeno istraživanje dati će uvid u strukture onečišćenja na brži i učinkovitiji način od standardnih metoda *off-line*, koristeći pritom znatno manje količine uzorka i otapala.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Makrolidni antibiotici

Otkriće penicilina 1928. godine označilo je revoluciju u liječenju bolesti dišnog sustava i mnogih infekcija. Međutim, nakon nekog vremena, došlo je do pojave rezistencije kod mnogih pacijenata. Time se povećala potražnja za otkrićem novih i učinkovitijih nadomjestnih antibiotika. Jedan od najuspješnijih i najjeftinijih nadomjestaka penicilina jest prvi makrolidni antibiotik, eritromicin A, ErA (Slika 2.1.). Izoliran je 1950. kao produkt fermentacije kulture *Saccharopolyspora erythraea*, a u kliničkoj je praksi od 1952. godine. Karakteriziraju ga 14-eročlani laktonski prsten i dva vezana šećera (kladinoza i desozamin).^{8,9}

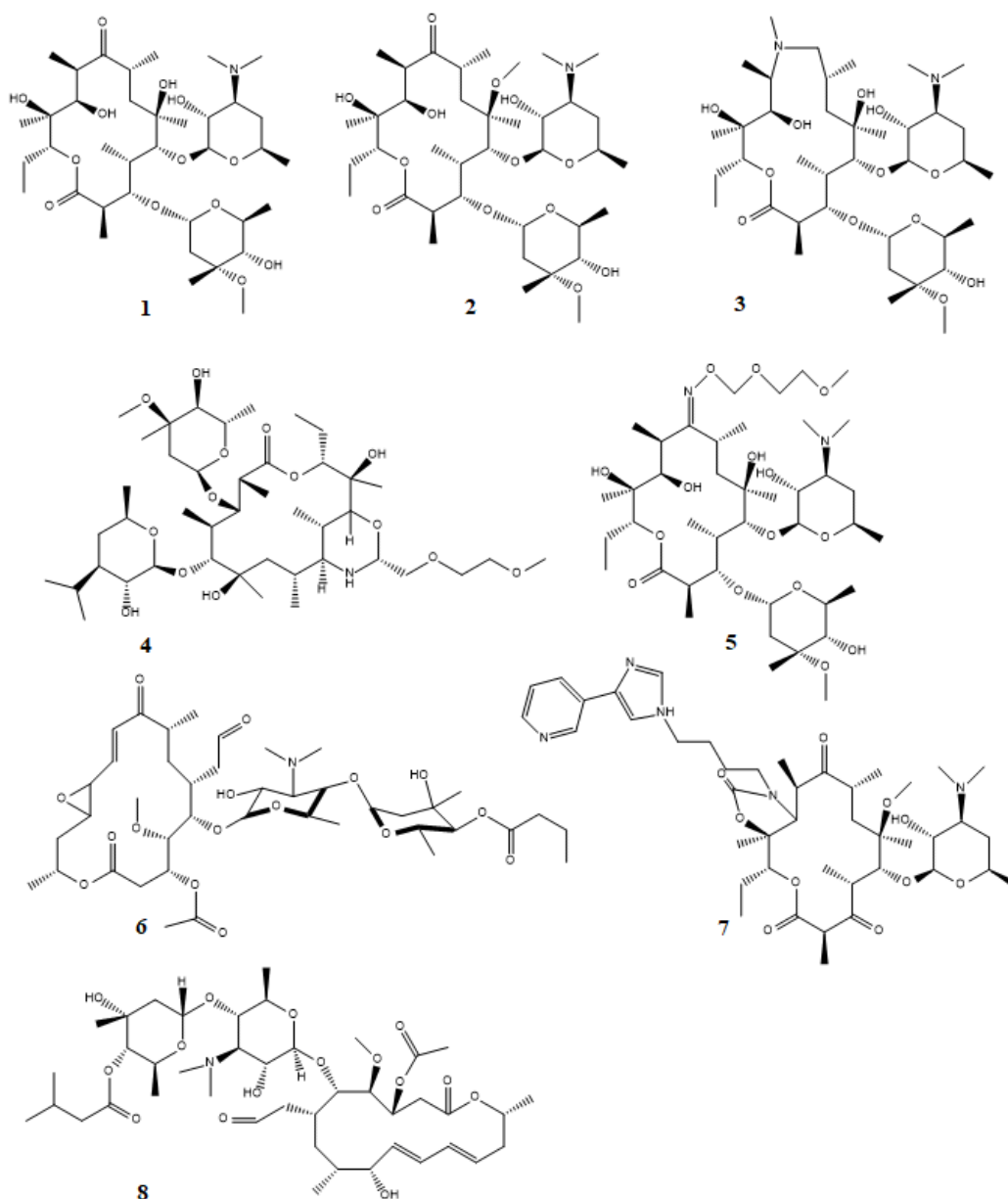


Slika 2.1. 2D i 3D strukture eritromicina A.

Nestabilnost u kiselj sredini, loša bioraspoloživost te gastrointestinalne nuspojave ograničile su njegovu upotrebu. Posljedično su 1990-tih počeli pokušaji poboljšanja makrolidnih farmakokinetičkih svojstava. Sintetiziran je niz polusintetskih derivata među kojima su se izdvojili makrolidi druge generacije: azitromicin (*Sumamed*[®], *Zithromax*[®]) i klaritromicin (*Biaxin*[®]).¹⁰ Ta dva antibiotika karakterizirana su širokim spektrom antibakterijske aktivnosti, poboljšanim farmakokinetičkim svojstvima, te neznatnim nuspojavama u odnosu na eritromicin A. Krajem 1980-tih godina, razvijena je treća generacija

makrolida, nazvana ketolidi, kako bi se nadjačala sve više prisutna rezistencija bakterija koje uzrokuju infekcije dišnih puteva.¹¹

Za opisivanje ove klase spojeva Woodwad je predložio termin "makrolidi" inspiriran samom stukturom makrolidnih antibiotika koja se sastoji od makrocikličkog laktonskog prstena s 12, 14, 15 ili 16 ugljikovih atoma, na koji je glikozidno vezan jedan ili više amino- i/ili neutralnih šećera.^{10,11} Strukture nekih poznatijih makrolida prikazane su na slici 2.2.



Slika 2.2. Strukture nekih makrolidnih antibiotika: eritromicin A (1), klaritromicin (2), azitromicin (3), diritromicin (4), roksitromicin (5), karbomicin A (6), telitromicin (7) i josamicin (8).

Makrolidni antibiotici upotrebljavaju se u terapiji raznih bakterijskih infekcija već više od 60 godina. Pokazuju djelotvornost na aerobne Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes*), anaerobne bakterije, neke Gram-negativne bakterije (*Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertusis* i *Haemophilus influenzae*) te na *Mycoplasma* i *Chlamydia*.¹¹

Biološku aktivnost ostvaruju vezanjem na podjedinicu 50S bakterijskog ribosoma, u ranoj fazi procesa translacije, pri čemu bakterijski ribosom predstavlja "makromolekulski stroj" gdje se genski kod translatira u proteine, a makrolidi se vežu na ribosomsku 23S rRNA u domeni V u blizini centra peptidil-transferaze i na taj način blokiraju izlazni tunel kroz koji primarni peptidi napuštaju ribosom.^{4,8}

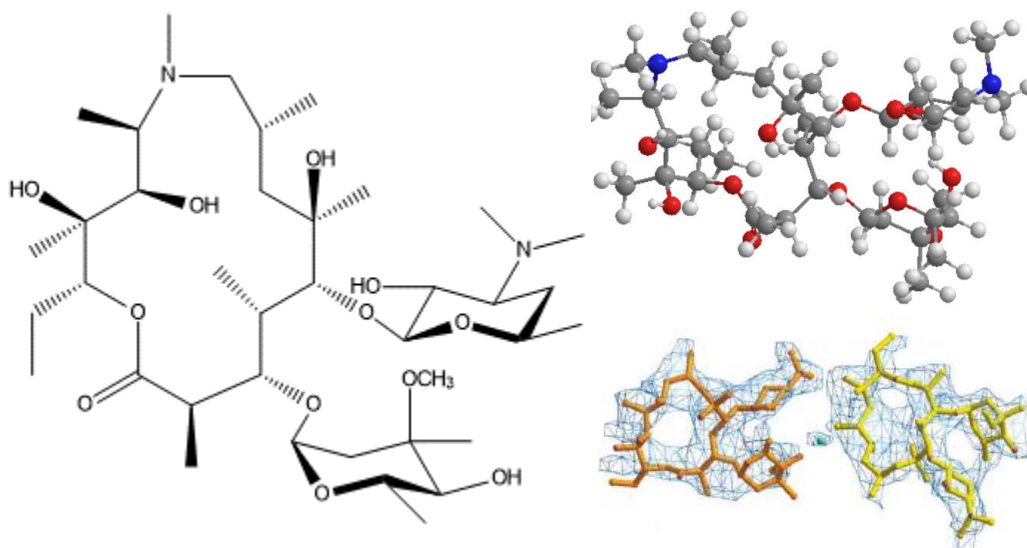
Usprkos velikom broju postojećih antibiotika, sve je veća i učestalija pojava bakterija rezistentnih na makrolide. Stoga se nastavljaju istraživanja s ciljem razvoja novih oblika makrolidnih antibiotika koji će biti djelotvorni na otporne bakterijske sojeve. Posljednja istraživanja pokazala su da postoje četiri mehanizma bakterijske rezistencije na makrolidne antibiotike, a to su: modifikacija na ciljanom mjestu ribosoma, ukljanjanje makrolida iz stanice pomoću tzv. "efluks pumpi", inaktivacija spoja i mutacije u 23S rRNA podjedinici te proteinima L4 i L22.⁴

Prema izvješću tvrtke za istraživanje tržišta *Zion* iz srpnja 2018. godine, globalno tržište makrolidnih antibiotika procijenjeno je na oko 6,14 milijardi američkih dolara u 2017. godini, a očekuje se da će do kraja 2024. ostvariti prihod od oko 7,66 milijardi američkih dolara. Predviđa se i porast kumulativne godišnje stope rasta (engl. *Compound Annual Growth Rate*, CAGR) od oko 3,2 %., od 2018. do 2024. Godine. Interesantan podatak je da se većina toga iznosa generira od prodaje azitromicina.¹² Novi spojevi i antibiotici obično se razvijaju kao odgovor na rezistenciju i trenutačne medicinske potrebe te prepoznavanje različitih potreba i želja kupaca, a samim time i povećanje prodaje i tržišnog udjela pojedinih tvrtki. Velika i dugogodišnja učinkovitost makrolida kod liječenja bakterijskih infekcija, neštetno, i nadasve sigurno djelovanje, potaknulo je mnoge znanstvenike, farmaceutske, biotehnološke i druge ustanove na nastavak istraživanja i potragu za novim oblicima derivata makrolida.¹¹

2.2. Azalidi

Naziv azalidi prvi je put upotrijebljen 1988. godine, sedam godina nakon otkrića azitromicina, u znanstvenom radu "Synthesis *in vitro* and *in vivo* activity of novel 9-deoxy-9a-aza-9a homoerythromycin A derivatives; A new class of macrolide antibiotics, the azalides" objavljenom u časopisu *The Journal of Antibiotics*. To je klasa makrolidnih antibiotika koji u laktoskom prstenu sadrže atom dušika. Prvi i glavni predstavnik azalida jest azitromicin. Njega karakterizira 15-eročlani laktoski prsten koji sadrži atom dušika supstituiran metilom na položaju 9a unutar eritromicinskog prstena.^{11,13}

2.2.1. Azitromicin



Slika 2.3. 2D i 3D strukture azitromicina.

Jedan od najuspješnijih antibiotika na svjetskoj razini s iznimnim terapijskim djelovanjem jest azitromicin (Slika 2.3.). Na razvoju makrolidnih antibiotika radio je istraživački tim farmaceutske tvrtke PLIVA od 1970. godine. Dugogodišnje iskustvo i predani rad doveli su 1981. godine do otkrića novog spoja tako što su S. Đokić, G. Kobrehel, Z. Tamburašev i G. Radobolja-Lazarevski sintetizirali antibiotik pod nazivom azitromicin. Novi spoj, azitromicin dihidrat, pokazao je superiorna i bolja svojstva u odnosu na svog prethodnika – eritromicin A. Pokazao se kao iznimno učinkovit antibiotik s povećanom antimikrobnom

aktivnošću, višom koncentracijom i produljenim zadržavanjem u tkivima, kao i niskom učestalosti gastrointestinalnih nuspojava u usporedbi s ostalim antibioticima. PLIVA je 1981. godine prijavila patent za azitromicin te je 1988. godine registriran pod zaštićenim imenom *Sumamed*[®] (Slike 2.4. i 2.5.). Godine 1986. američka farmaceutska tvrtka *Pfizer* dobila je ekskluzivna prava za prodaju azitromicina u SAD-u te Zapadnoj Europi pod tržišnim imenom *Zithromax*[®]. Zanimljiva činjenica je ta da je, unaprijed predviđajući njegov uspjeh, ime *Sumamed* kao izvedenicu od izraza "suma medicine", dao dr. sc. S. Đokić.¹⁴

United States Patent [19]	[11]	4,328,334
Kobrehel et al.	[45]	May 4, 1982

[54] 11-AZA-10-DEOXO-10-DIHYDROERYTHROMYCIN A AND DERIVATIVES THEREOF AS WELL AS A PROCESS FOR THEIR PREPARATION	[52] U.S. Cl.	536/7.4; 424/180
[75] Inventors: Gabrijela Kobrehel; Gordana Radobolja; Zrinka Tamburasev; Slobodan Djokic, all of Zagreb, Yugoslavia	[58] Field of Search	536/9
[73] Assignee: PLIVA Pharmaceutical and Chemical Works, Zagreb, Yugoslavia	[56] References Cited	
[21] Appl. No.: 134,816	U.S. PATENT DOCUMENTS	
[22] Filed: Mar. 28, 1980	3,478,014 11/1969 Djokic et al.	536/9
[30] Foreign Application Priority Data	3,574,185 4/1971 Tamburasev et al.	536/9
Apr. 2, 1979 [YU] Yugoslavia	3,652,537 3/1972 Massey et al.	536/9
[51] Int. Cl. ³	<i>Primary Examiner</i> —Johnnie R. Brown	
A61K 31/71; C07H 17/08	<i>Attorney, Agent, or Firm</i> —Pollock, Vande Sande & Priddy	
	[57] ABSTRACT	
	11-aza-10-deoxo-10-dihydroerythromycin A and derivatives thereof, and process for preparation thereof.	
	24 Claims, No Drawings	

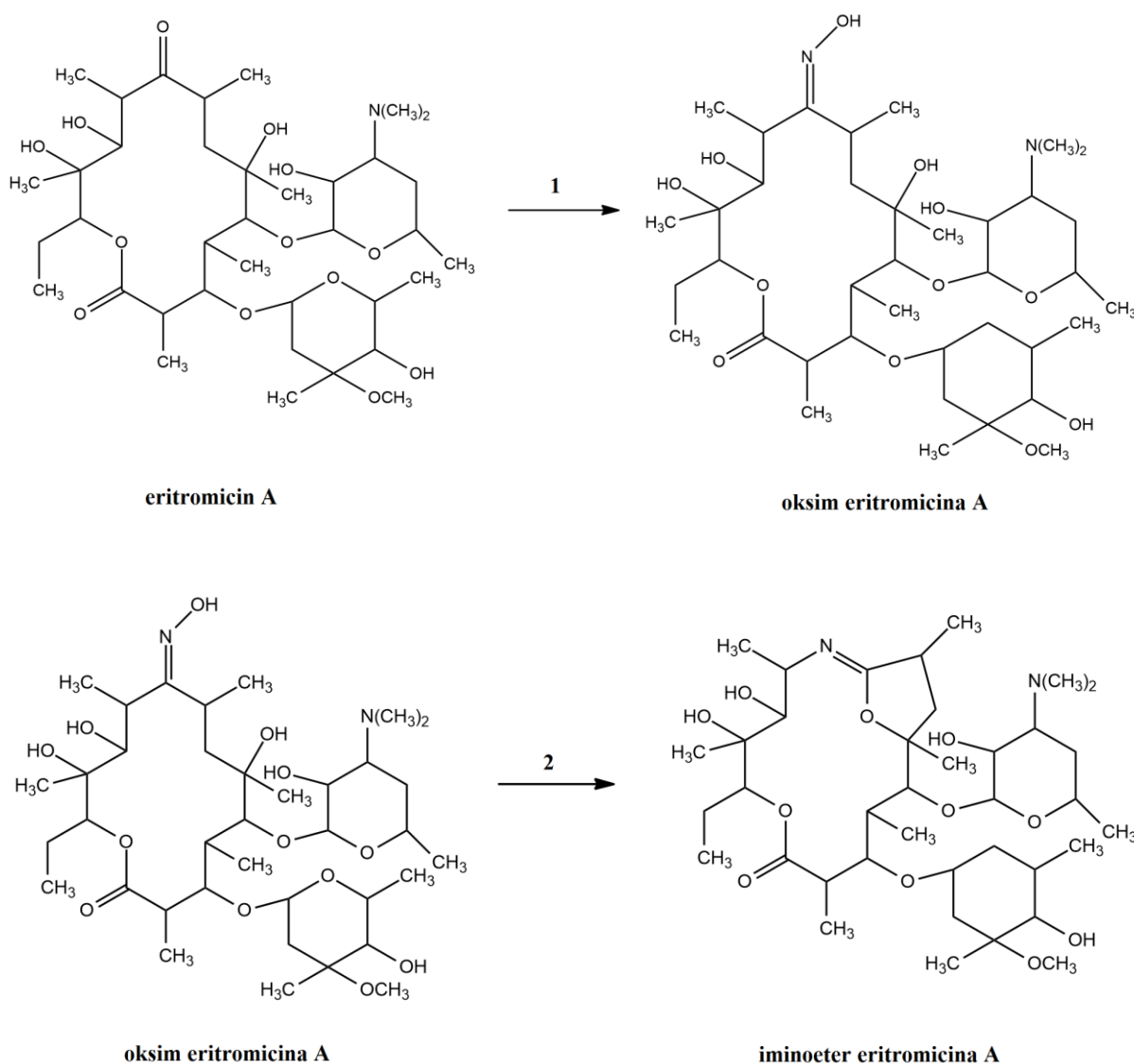
Slika. 2.4. Patentna prijava za Beckmannovu pregradnju.¹⁵

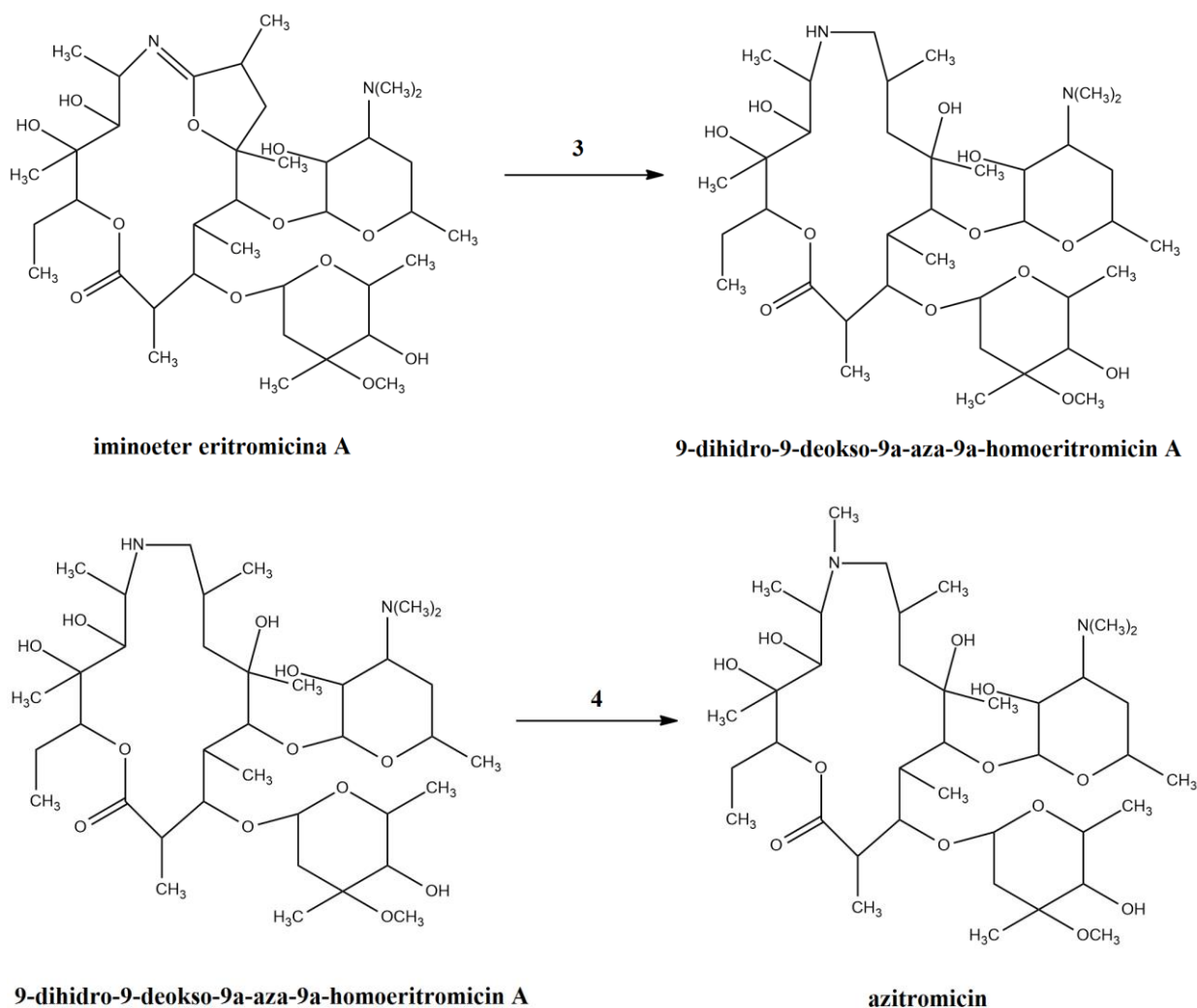
United States Patent [19]	[11]	Patent Number: 4,517,359
Kobrehel et al.	[45]	Date of Patent: May 14, 1985

[54] 11-METHYL-11-AZA-4-0-CLADINOSYL-6-0-DEOSAMINYL-15-ETHYL-7,13,14-TRIHYDROXY-3,5,7,9,12,14-HEXAMETHYLOXACYCLOPENTADECANE-2-ONE AND DERIVATIVES THEREOF	[58] Field of Search	536/9, 7.4
[75] Inventors: Gabrijela Kobrehel; Slobodan Djokic, both of Zagreb, Yugoslavia	[56] References Cited	
[73] Assignee: Sour Pliva farmaceutska, kemijska prehrambena i kozmeticka industrija, n.sol.o., Zagreb, Yugoslavia	U.S. PATENT DOCUMENTS	
[21] Appl. No.: 304,481	4,283,527 8/1981 Sciavolino	536/7.4
[22] Filed: Sep. 22, 1981	4,328,334 5/1982 Kobrehel et al.	536/7.4
[30] Foreign Application Priority Data	<i>Primary Examiner</i> —Nicky Chan	
Mar. 6, 1981 [YU] Yugoslavia	<i>Attorney, Agent, or Firm</i> —Pollock, Vande Sande & Priddy	
[51] Int. Cl. ³	[57] ABSTRACT	
[52] U.S. Cl.	11-Methyl-11-aza-4-0-cladinosyl-6-0-desosaminyl-15-ethyl-7,13,14-trihydroxy-3,5,7,9,12,14-hexamethyl-oxacyclopentadecane-2-one and derivatives thereof, such as the 13,14-carbonate and C ₁ –C ₃ -alkanoyl derivatives thereof. The compounds exhibit antibacterial activity.	
C07H 17/08	1 Claim, No Drawings	
536/7.4		

Slika. 2.5. Patentna prijava za azitromicin.¹⁶

Sinteza azitromicina publicirana je 1988. godine u časopisu *Journal of Chemical Research*.¹⁷ Dobiva se polusintetski iz eritromicina A u nekoliko koraka: oksimacijom eritromicina A, Beckmannovom pregradnjom dobivena oksima eritromicina A s aromatskim sulfokloridima, zatim katalitičkim hidrogeniranjem iminoetera eritromicina A uz platinu kao katalizator te, na kraju, Eischweiler-Clarkeovim metiliranjem. Uobičajeno kemijsko ime za azitromicin jest 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A. Gore opisan sintetski put prikazan je na slici 2.6.





Slika 2.6. Shema sinteze azitromicina gdje je **1** = H_2NOH (oksimacija), **2** = RSO_2Cl , lužnato (Beckmannova pregradnja), **3** = H_2/Pt (katalitičko hidrogeniranje) i **4** = $\text{HCO}_2\text{H}/\text{HCHO}$ (Eschweiler-Clarkeovo metiliranje).

Azitromicin se ponaša kao slaba baza i, zahvaljujući tome, lako prolazi kroz staničnu membranu, prodire u tkiva i zadržava se u stanicama. Isto tako, stabilan je u kiselom, dobro se apsorbira te bolje djeluje na Gram-negativne bakterije.¹⁸

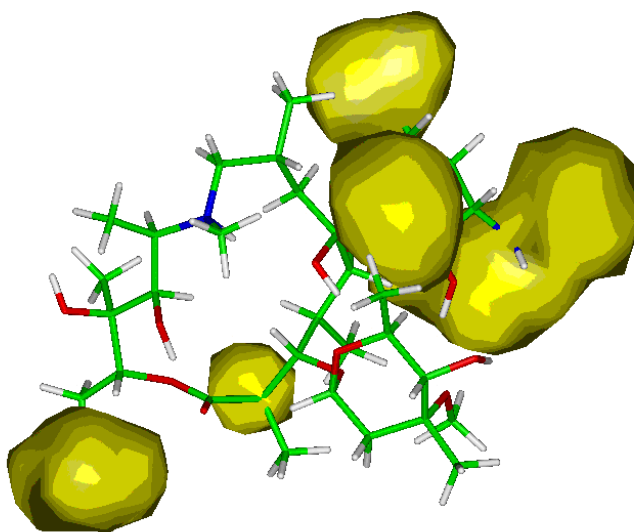
Azitromicin inhibira sintezu bakterijskih proteina. Naime, prenosi se fagocitnim stanicama (polimorfonuklearnim leukocitima, monocitima) do mjesta infekcije i veže se na podjedinicu 50S bakterijskog ribosoma sterički blokirajući sintezu bakterijskih proteina, čime onemogućava daljni rast i razmnožavanje bakterije.¹⁹

Farmakokinetički gledano, nakon apsorpcije i distribucije, azitromicin postiže visoku i postojanu koncentraciju u tkivima koja rezultira dugotrajnom antimikrobnom aktivnošću.

Karakteristično je i svojstvo kumulacije koja raste s protokom vremena, što omogućuje primjenu u jednokratnoj dozi ili primjenu tijekom 3 dana uz pouzdan terapijski učinak koji traje i do 10 dana. Zbog mogućnosti jednodnevnog doziranja, visokih tkivnih i staničnih koncentracija koje postiže, mogućnosti primjene u trudnoći i kod djece, azitromicin je jedan od najprodavanijih i najpopularnijih lijekova u svijetu.^{18,20}

Taj generički antibiotik, širokog spektra djelovanja, primjenjuje se kod infekcija gornjih i donjih dišnih puteva: kroničnog bronhitisa, upale pluća uzrokovane bakterijama *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* i *Streptococcus pneumoniae*, kod infekcije uha te upale ždrijela i tonzila uzrokovane bakterijom *Streptococcus pyogenes*. Propisuje se i kod nekompliciranih infekcija kože i mekih tkiva uzrokovanih vrstama *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus agalactiae*, kod spolno prenosivih bolesti, infekcija uretre i grlića maternice bakterijama *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Haemophilus ducreyi*, te kao profilaksa protiv malarije.¹¹

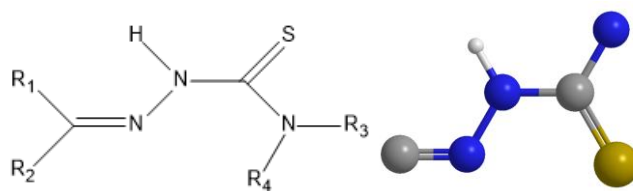
Ključni korak u otkrivanju novih spojeva i derivata azitromicina za prevladavanje bakterijske otpornosti jest razumijevanje temeljnog principa stupanja makrolida u interakciju sa svojim makromolekulskim metama.^{21,22} Uz pomoć metode NMR koja se temelji na razlici prijenosa zasićenja (engl. *Saturation Transfer Difference*, STD), odnosno na prijenosu magnetizacije zasićenjem signala proteina, dobivene su potrebne informacije o skupinama molekule liganda koje su u kontaktu s njenom metom, omogućavajući određivanje epitopa za vezanje kao što je prikazano na Slici 2.7. Protoni liganda prostorno najbliži protonima makromolekule najviše se zasićuju, te daju najjače signale u spektrima STD-NMR, dok su udaljeniji prostorni ligandi manje zasićeni te, sukladno tome, daju slabiji signal. Posljedično, stupanj zasićenosti protona liganda ovisi o njegovoj prostornoj udaljenosti što se može iskoristiti za određivanje dijelova liganda koji su u izravnom kontaktu s aktivnim mjestom makromolekule, tzv. mapiranje epitopa.²³



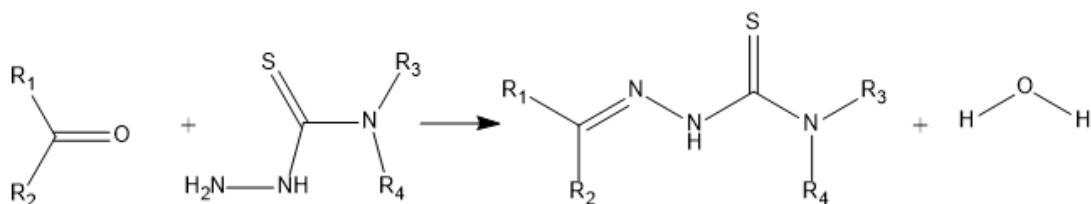
Slika 2.7. Vezujući epitopi azitromicina određeni tehnikom STD-NMR.⁸

2.3. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni (Slika 2.8.) su zanimljiva vrsta spojeva koja pripada velikoj grupi inovativnih tioureinih derivata, a dobivaju se kondenzacijom tiosemikarbazida (hidrazinkarbotioamida) te odgovarajućih aldehida i ketona²⁴ (Slika 2.9.).

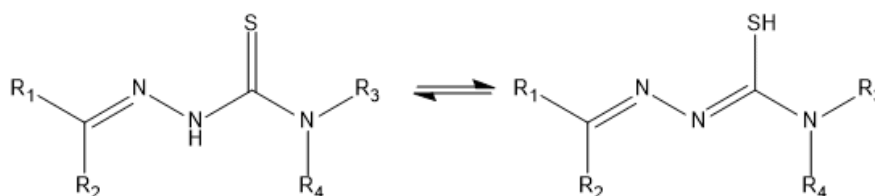


Slika 2.8. 2D i 3D strukture tiosemikarbazona gdje je R₁, R₂, R₃, R₄ = vodik, alkilna, arilna ili heterociklička skupina.



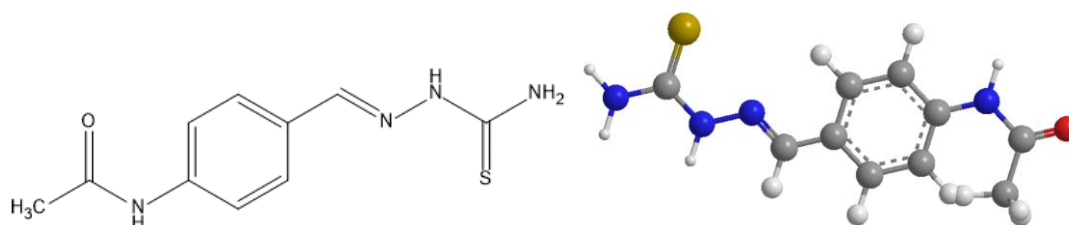
Slika 2.9. Shematski prikaz reakcije dobivanja tiosemikarbazona gdje su R_1 , R_2 , R_3 i R_4 vodik, alkilna, arilna ili heterociklička skupina.

Spadaju u Schiffove baze, opće formule $R_1R_2C=N-NH-(C=S)-NR_3R_4$. Općenito se dijele na monotiosemikarbazone i bistiosemikarbazone, a zbog intramolekulskog prijenosa protona mogu postojati u dva tautomerna oblika (Slika 2.10.). Tiosemikarbazone karakteriziraju amidne, iminske i tionske skupine koje ih čine polidentatnim ligandima, a svojstvo keliranja prijelaznih metala, odnosno svojstvo koordinacije na metalni centar *in vitro* uzrok je korisne biološke aktivnosti tiosemikarbazona.²⁵



Slika 2.10. Tautomerni oblici tiosemikarbazona, tionski (lijevo) i tiolni (desno).

Prvi klinički lijek ove klase spojeva, odobren i uveden u kliničku praksu 1940-tih, jest tioacetazon prikazan na Slici 2.11. Zanimljivo je da se još uvijek koristi za liječenje nekih oblika tuberkuloze.²⁶



Slika 2.11. 2D i 3D strukture tioacetazona.

Danas tiosemikarbazoni i njihovi metalni kompleksi imaju široku primjenu koja se proteže od analitičke kemije, preko farmakologije sve do nuklearne medicine. Poznati su kao dobri terapeutici, a privukli su pažnju mnogih zbog toga što su pokazali široki spektar dobrih osobina među kojima se ističu zavidna antibakterijska, antigljivična, antivirusna, protuupalna te antikancerogena svojstva.²⁵⁻²⁹ Nedavno su dizajnirani i klinički testirani novi multifunkcijski oblici tiosemikarbazona za liječenje malarije, tuberkuloze te Alzheimerove bolesti.^{30,31} Među tiosemikarbazonomima koji pokazuju antitumorsko djelovanje ističu se derivati α -N-heterocikličkih tiosemikarbazona gdje je tiosemikarbazonski lanac u α -položaju u odnosu na heterociklički dušik. Oni su se pokazali kao djelotvorni inhibitori ribonukleotid reduktaze (RR) kod širokog spektra tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo*, a slično svojstvo primjećuje se još kod snažnih lijekova protiv raka kao što su triapin i metisazon.^{25, 32-34}

2.4. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenje je svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar, odnosno, svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u proizvodu. Sastavni dio svih modernih industrijskih procesa, što uključuje sve farmaceutske industrije, jest kontrola kvalitete. Zakonska regulativa donosi sve strože zahtjeve o kontroli onečišćenja u lijekovima zbog toga što onečišćenja mogu imati toksična svojstva, uzrokovati neželjene farmakološke učinke, i razne nuspojave, mijenjati aktivnost i stabilnost same ljekovite tvari te učinkovitost i bioraspoloživost lijeka. Također, treba napomenuti da ne postoji tvar koja je 100 % čista. Onečišćenje može nastati u proizvodnom postupku, tijekom izrade ljekovitog oblika ili zaostati za vrijeme postupka skladištenja gotovoga lijeka ili same djelatne tvari.³⁵

Podrijetlo onečišćenja u lijekovima prema Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji³⁶ (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) mogu biti polazne sirovine, međuproducti ili nusproducti, usput ekstrahirane tvari (prirodni producti), razgradni producti koji nastaju djelovanjem svjetla, temperature, prisutnosti vode, producti nastali zbog promjene pH te producti reakcija djelatne tvari s pomoćnim tvarima ili s primarnim spremnikom te interakcije djelatnih tvari u višekomponentnim dozirnim oblicima.³⁶ Moguće vrste onečišćenja prikazane su u Tablici 2.1. Prema smjernicama ICH zahtjevi kakvoće lijeka definiraju prihvatljive granice za onečišćenja koja se dopuštaju u roku valjanosti lijeka (Tablica 2.2.).

Tablica 2.1. Vrste onečišćenja u lijekovima prema smjernicama ICH.³⁶

<i>Vrste onečišćenja</i>	
<i>Organska</i>	početne sirovine, nusprodukti, međuprodukti, razgradni produkti, reagensi, ligandi i katalizatori
<i>Anorganska</i>	anorganski katalizatori, reagensi, ligandi, anorganske soli, drveni ugljen, dijatomejske zemlje, silika gel, celuloza, teški metali i drugi zaostali metali
<i>Ostatna otapala</i>	zaostale, hlapljive, organske kemijske tvari

Tablica 2.2. Propisane granice izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije onečišćenja u novim ljekovitim tvarima prema smjernicama ICH.³⁶

<i>Maksimalna dnevna doza</i>	<i>Granica izvještavanja¹</i>	<i>Granica identifikacije²</i>	<i>Granica kvalifikacije³</i>
≤ 2 g/dan	0,05 %	0,10% ili 1,0 mg/dan (niža vrijednost)	0,15% ili 1,0 mg/dan (niža vrijednost)
> 2 g	0,03%	0,05%	0,05%

¹ pragovi iznad kojih je potrebna izjava o točnom postotku onečišćenja te metoda analize

² pragovi iznad kojih je potrebna strukturna karakterizacija

³ pragovi iznad kojih je potrebna procjena biološke sigurnosti

Prema Europskoj farmakopeji onečišćenja se mogu podijeliti na specificirana onečišćenja (engl. *specified impurities*) i ostala onečišćenja koja se mogu dokazati (engl. *other*

detectable impurities). Specificirana onečišćenja se dalje dijele na identificirana i neidentificirana. Identificirana onečišćenja su ona koja imaju kemijsku strukturu koja je karakterizirana. S druge strane, neidentificirana onečišćenja su ona određena isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima (npr. kromatografsko vrijeme zadržavanja) i njih ne smije biti prisutno više od 0,1% za doze ljekovite tvari manje od 2 g.^{35,36}

2.4.1. Istraživanje profila čistoće (engl. *impurity profiling*)

U današnje vrijeme, provodi se stroga kontrola kakvoće lijekova, od strane proizvođača i regulatornih tijela, jer prisutnost vrlo malih količina onečišćenja može utjecati na sigurnost primjene lijeka i naposljetku zaštitu pacijenata.^{33,34} Zbog toga je ključni dio svake analize lijekova profil čistoće. Istraživanje profila čistoće (engl. *impurity profiling*) lijeka skup je analitičkih postupaka kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija te kvantitativno određivanje organskih i anorganskih onečišćenja, kao i ostalih otapala, u ljekovitoj tvari i farmaceutskom pripravku. Kako bi se zadovoljile potrebe regulatornih tijela i industrije, a pacijenti osigurali sigurnim lijekovima, razvijaju se nove analitičke metode za određivanje onečišćenja u lijekovima i njegove kakvoće.^{37,38} Teži se k pronalaženju optimalnog odnosa čistoće lijeka i cijene gotovog proizvoda kako bi se, uz mali utrošak te dobre metode analize, dobili još bolji rezultati.

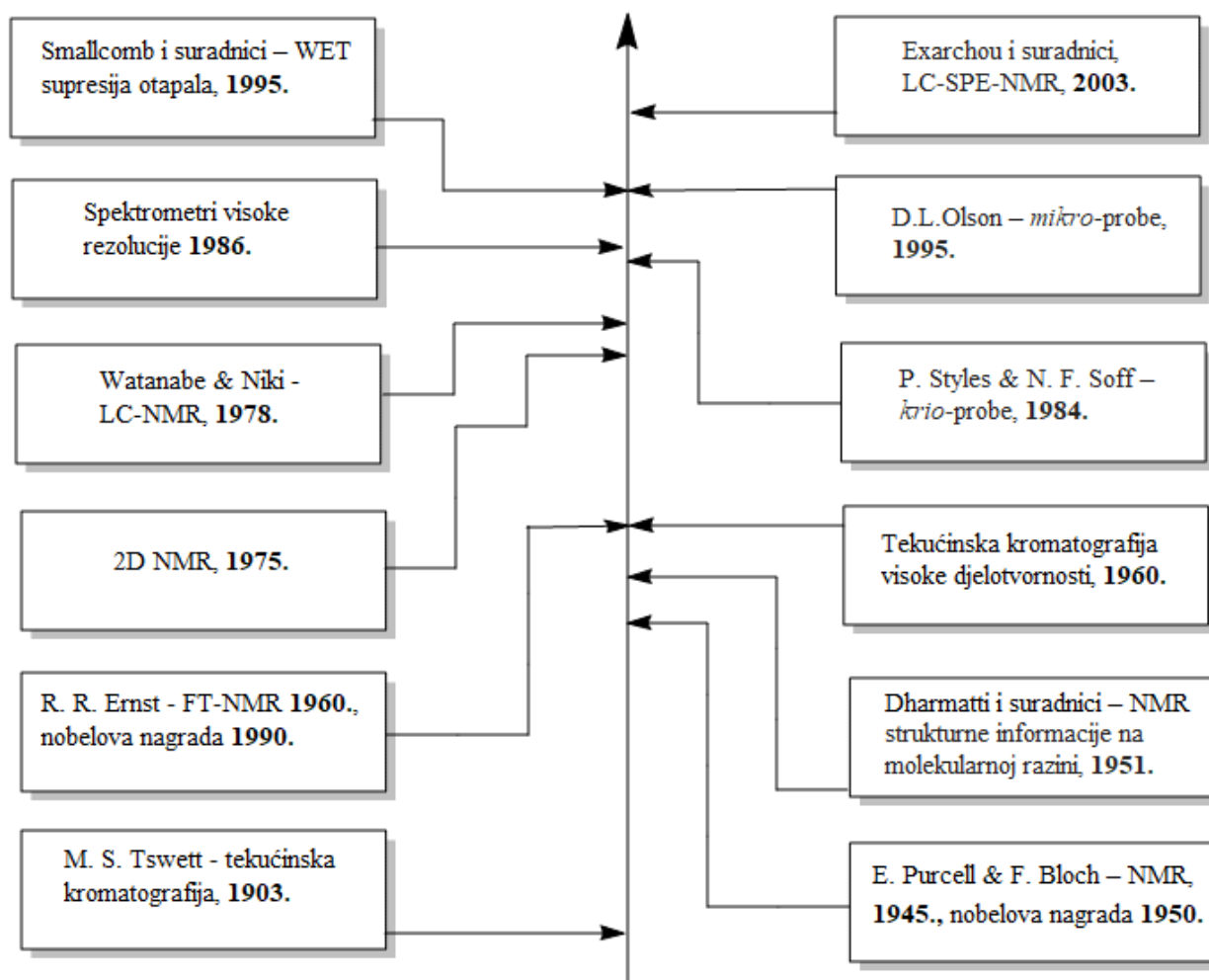
2.5. Spregnuti sustav LC-SPE/NMR

2.5.1. LC-NMR

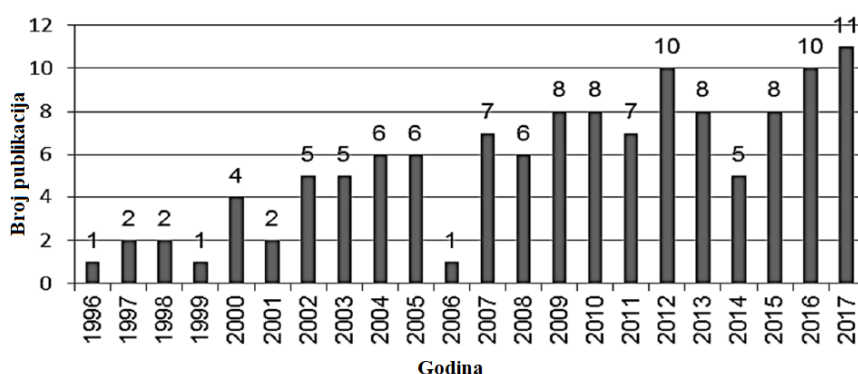
U današnje vrijeme sve više dobivaju na popularnosti suvremeni spregnuti sustavi³⁹ (engl. *hyphenated systems*), a koriste se za bolje i brže analiziranje smjesa različitih bioloških, biomedicinskih, okolišnih i farmaceutskih uzoraka.⁴⁰ Sprezati se mogu dvije ili više tehnika, a općenito, spregnuti sustavi sadrže jednu tehniku koja odjeljuje sastojke smjese i drugu tehniku koja odijeljene sastojke nakon toga detektira.⁴¹

Prvi pokušaji integracije tehnike NMR s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti zabilježeni su 1980-tih godina kada su tehnikom prekinutog protoka snimljeni prvi spektri ¹H LC-NMR. Spregnuti sustav LC-NMR pronašao je široku primjenu 1990-tih godina, a danas je to već dobro utemeljeno analitičko oruđe u farmaceutskoj industriji,

biomedicini, analizi metabolita, lijekova i prirodnih produkata te analizi okoliša. Glavni povijesni događaji povezani s razvojem sustava LC-NMR prikazani su na Slici 2.12. Zbog sve većeg napretka u razvoju tehnologije tijekom godina uslijedio je, očekivano, i val razvoja spregnutih tehnika. To je povuklo za sobom i interes za sofisticiran spregnuti sustav LC-NMR koji je tijekom godina u kontinuiranom porastu (Slika 2.13.).⁴²⁻⁴⁵



Slika 2.12. Razvoja spregnutog sustava LC-NMR kroz vrijeme.



Slika. 2.13. Broj znanstvenih radova vezanih za tehniku LC-NMR i publiciranih u vremenskom razdoblju od 1996. do 2017. godine (dostupnih u bazi podataka *ScienceDirect*).⁴²

Prvobitna ograničenja tehnike LC-NMR postojala su dijelom zbog slabe osjetljivosti tehnike NMR, a dijelom zbog praktičnih razloga pa su granice detekcije bile niske u usporedbi s drugim spregnutim tehnikama (npr. HPLC-MS).³⁹ S obzirom da mjerene performanse ovise o omjeru signala prema šumu (engl. *Signal to Noise ratio, S/N*), osjetljivost mjerenja se, općenito, može povećati na nekoliko načina: povećanjem volumena uzorka, povećanjem jakosti magnetnog polja, sniženjem temperature ili smanjenjem šuma pretpojačala. Navedeni omjer prikazan je jednadžbom (1):

$$\frac{S}{N} = \gamma N l (l + 1) \left(\frac{B_0}{T} \right)^{\frac{3}{2}} f \left(\frac{Q V_S}{b} \right)^{1/2} n^{-1} \quad (1)$$

gdje je γ žiromagnetna konstanta, N broj jezgara, l spinski kvantni broj, B_0 jakost magnetnog polja, T temperatura, Q faktor kvalitete rf zavojnice, b širina koju pokriva prijamnik (Hz), n šum pretpojačala, a f faktor punjenja NMR zavojnice. Faktor f računa se prema jednadžbi (2):

$$f = \frac{V_s}{V_c} \quad (2)$$

gdje je V_s volumen uzorka, a V_c volumen unutar zavojnice detektora. Uz slabu osjetljivost, glavna ograničenja spregnutog sustava LC-NMR bile su: dinamički raspon, uporaba skupih deuteriranih otapala te dizajn protočnih proba NMR. Sukladno tome pojavio se zahtjev za daljnjim razvojem. Sve snažnijim prodorima tehnologije u zadnjih nekoliko godina razvijeni

su, između ostalog, spektrometri visoke rezolucije i tehnike za supresiju signala otapala. Pored toga, osmišljeni su učinkovitiji sustavi za pretvaranje analognog signala u digitalni (engl. *Analog to Digital Converter*, ADC), digitalni filtri te "oversampling". Uvedena je krio-tehnologija, magneti s aktivnim štitom (engl. *actively shielded*) te novi materijali i probe NMR. Zamjetan napredak učinjen je, također, kod dizajna protočnih ćelija NMR.⁴⁴

Tehnike supresije signala otapala su pulsni sljedovi NMR koje otklanjaju i/ili umanjuju signale otapala u svrhu detekcije signala analita niske koncentracije. Omogućavaju snimanje kvalitetnih jedno- i dvodimenzijskih spektara LC-NMR čime je, posljedično, olakšana potpuna strukturna karakterizacija spojeva u smjesi.^{44,45} Neke od najučinkovitijih tehnika supresije signala otapala prikazane su u Tablici 2.3.

Tablica 2.3. Prikaz tehnika supresije signala otapala.⁴⁴

<i>Tehnike supresije signala otapala</i>	
<p>Prezasićenje (NOESY tip, "shaped" pulsevi)*</p>	
<p>WET (engl. <i>water suppression enhanced through T₁ effects</i>)</p>	
<p>WATERGATE (engl. <i>water suppression by gradient-tailored excitation</i>)</p>	

*Jednostruka, dvostruka i višestruka supresija signala

Postoji nekoliko načina izvedbe eksperimenta LC-NMR. Načini izvedbe jesu: tehnika kontinuiranog protoka (engl. *on-flow*), tehnika zaustavljenog protoka (engl. *stopped-flow*), tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim intervalima (engl. *time-slice*), tehnika skladištenja pikova u kapilarnim petljama (engl. *loop collection*) i tehnika skladištenja pikova na krutom nosaču (LC-SPE-NMR).^{44,45}

Najjednostavniji način analize LC-NMR jest tehnika kontinuiranog protoka gdje je kromatografska kolona izravno spregnuta sa spektrometrom NMR te ne dolazi do zaustavljanja protoka analita. Naime, spektri se snimaju paralelno s kromatografskim odjeljivanjem. Uslijed toga ova je tehnika pogodna za snimanje jednodimenzijskih ^1H i ^{19}F spektara NMR. Tehnika zahtijeva visoku koncentraciju analita, a primjenjuje se za uzorke nepoznatih kromatografskih svojstava te za nestabilne spojeve koji podliježu izomerizaciji i/ili brzom razgradnji.⁴⁴⁻⁴⁶

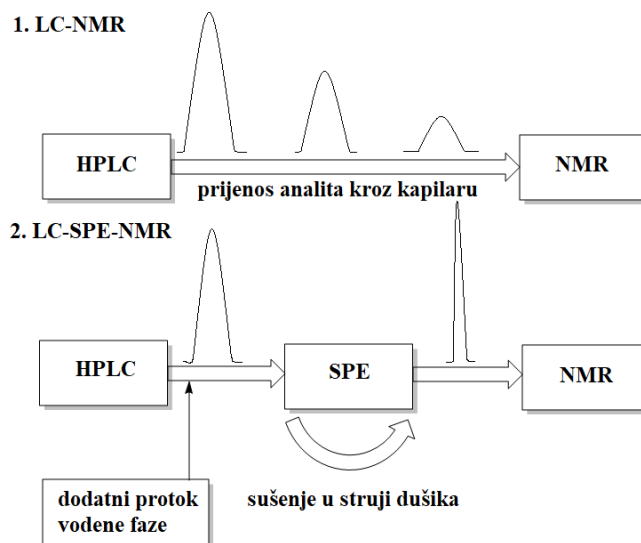
Ipak, najčešće korištena tehnika LC-NMR jest tehnika zaustavljenog protoka kod koje se kromatografsko odjeljivanje automatski zaustavlja nakon što analit dođe u protočnu ćeliju spektrometra NMR. Nakon snimanja spektara, kromatografsko odjeljivanje se nastavlja uz prethodnu brzinu protoka pokretne faze. Postoje dvije izvedbe tehnike zaustavljenog protoka: tehnika u kojoj se protok zaustavlja pomoću ventila i tehnika u kojoj se pikovi skladište u kapilarnim petljama. Pogodne su za odjeljivanje složenih smjesa kada sastojci imaju poznato vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni i karakteristične UV kromofore, a omogućavaju snimanje dvodimenzijskih homonuklearnih i heteronuklearnih spektara NMR. Tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim intervalima pronalazi svoju primjenu kada su sastojci slabo odijeljeni te nemaju dobru apsorpciju UV zračenja i poznata vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Kod tehnike skladištenja pikova u kapilarnim petljama sastojci smjese se nakon odjeljivanja spremaju u petlje jedan za drugim te se po završetku kromatografskog odjeljivanja neovisno šalju u protočnu ćeliju NMR. Takva tehnika korisna je kada se želi odrediti struktura većeg broja spojeva.⁴⁴⁻⁴⁶

Osim gore navedenih prednosti, postoji i nekoliko ograničenja tehnike LC-NMR. Jedno od njih jest to da je količina uzorka za snimanje spektara NMR ograničena kromatografijom. Uz to samo se dio signala LC nalazi unutar protočne probe NMR, a za snimanje spektara NMR je dostupna samo količina uzorka iz jednog injektiranja. Također, nedeuterirana otapala daju jake pozadinske signale, a deuterirana otapala su preskupa za kromatografiju te onemogućuju opažanje izmjenjivih protona. Rješenje ograničenja tehnike LC-NMR jest sprega s ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE).⁴⁷

2.5.2. LC-SPE-NMR

Profinjen i moderan spregnuti analitički sustav, s velikom primjenom u analizi bioaktivnih molekula i lijekova, raznih farmaceutika, metabolita, prirodnih spojeva, razgradnih produkata te onečišćenja, koji je nedavno postao i komercijalno dostupan, jest sustav LC-SPE-NMR.^{1,2} Exarchou i suradnici demonstrirali su 2003. godine spregu tekućinske kromatografije (engl. *Liquid Chromatography*, LC) s ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) koja omogućuje učinkovito odjeljivanje komponenata smjese na kromatografskoj koloni, zatim izdvajanje i ukoncentriravanje svakog pojedinog analita na SPE-nosaču (engl. *SPE-cartridge*), nakon čega slijedi identifikacija i određivanje strukture izdvojenog spoja spektroskopijom NMR.

Proširenje sustava LC-NMR, dodatkom automatizirane jedinice SPE, rezultiralo je mnogim poboljšanjima, a pokazalo je i puno praktičnih prednosti.⁴⁵⁻⁴⁸ Glavna prednost tehnike LC-SPE/NMR jest neovisnost kromatografskog odjeljivanja i snimanja spektara NMR što je praktičnije od konvencionalne metode LC-NMR. To se manifestira kod izbora otapala koja se mogu koristiti za analizu.^{45,46} S obzirom da se u kromatografskom odjeljivanju mogu koristiti nedeuterirana otapala, analiza je jeftinija, osjetljivija, brža i učinkovitija u odnosu na tehniku LC-NMR. Uslijed kvantitativnog obogaćivanja analita na SPE-nosaču, koje se postiže jednostrukim (engl. *single-trapping*) ili višestrukim (engl. *multi-trapping*) izdvajanjem analita na pojedini SPE-nosač, poboljšana je omjer signala i šuma (engl. signal to noise ratio, S/N), a samim time i osjetljivost mjerenja *krio*-probom NMR.^{49,50} Sušenjem SPE-nosača u struji dušika uklanja se većina otapala iz kromatografske analize pa su signali otapala u spektru NMR reducirani, a posljedično nema potrebe za supresijom signala otapala.⁵¹ Nadalje, nema efekta širenja pika koji se javlja u tehnici LC-NMR, jer u tehnici LC-SPE-NMR svaka komponenta koja je odijeljena na kromatografskoj koloni može biti brzo uskladištena na SPE-nosaču, a sam oblik pika LC nije bitan za spektroskopiju NMR⁵²⁻⁵⁴ (Slika 2.14.).



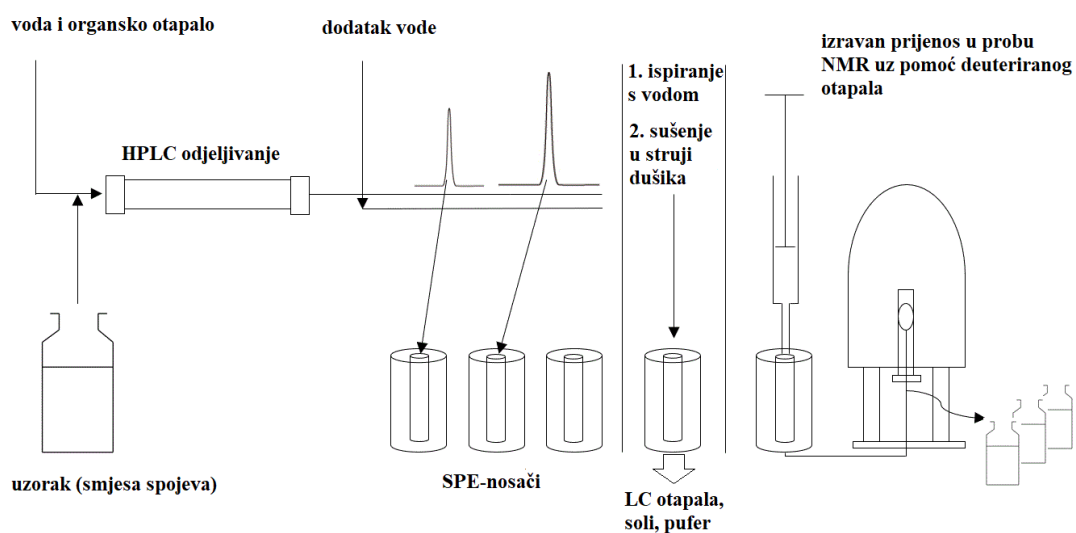
Slika 2.14. Prijenos kromatografskog pika u tehnici LC-NMR (gore) i tehnici LC-SPE-NMR (dolje).

Nakon kromatografskog odjeljivanja smjese, spojevi se detektiraju detektorom UV-DAD (engl. *Diode Array Detector*), a analit otopljen u organskom otapalu razrjeđuje se s malo vode i zatim ekstrahira na čvrstu fazu.³⁹ Glavni dio jedinice SPE jest automatski izmjenjivač SPE-nosača (engl. *Automatic Cartridge Exchanger, ACE*) u kojem su smješteni SPE-nosači punjeni različitim nepokretnim fazama. Da bi se spojevi zadržali na SPE-nosaču, potrebno je smanjiti elucijsku jakost pokretne faze (organskog otapala), a to se postiže upotrebom dodatne pumpe HPLC (tzv. *make-up* pumpe) koja osigurava dodatni protok vodene faze. Također, bitno je da se željeni uzorak može zadržati na SPE-nosaču. To se postiže prikladnim odabirom nepokretne faze kojom su punjeni SPE-nosači.^{45,46}

Kao čvrsta nepokretna faza mogu se koristiti čestice silikagela derivatizirane nepolarnim alifatskim C-2, C-8, C-18 skupinama, čestice aluminijevog oksida pri različitim vrijednostima pH, razni ionski izmjenjivači, polidivinilbenzenske smole, magnezijev silikat, smola ili porozni materijal kao što je ugljen.

Jake hidrofobne interakcije između analita i nepokretne faze doprinose učinkovitijem izdvajanju analita na SPE-nosač, koja je pogodna za snimanje spektara NMR. Iako se u praksi pokazalo da se metaboliti, razna onečišćenja lijekova te razgradni produkti lako zadržavaju na SPE-nosačima, sama učinkovitost izdvajanja pikova (engl. *trapping efficiency*) ovisi o polarosti sastojka. U kromatografiji obrnutih faza, gdje je nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza polarna, učinkovitost izdvajanja analita na SPE-nosač najveća je za sastojke čije

je vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni dulje, odnosno za manje polarne spojeve.⁴⁴⁻⁴⁸ Na kraju, nakon što se višak otapala ukloni sušenjem u struji dušika, analit se otapa u deuteriranom otapalu i prenosi u protočnu ćeliju NMR (Slika 2.15.). Spregnuti sustav korišten u ovom istraživanju prikazan je na slici 2.16.



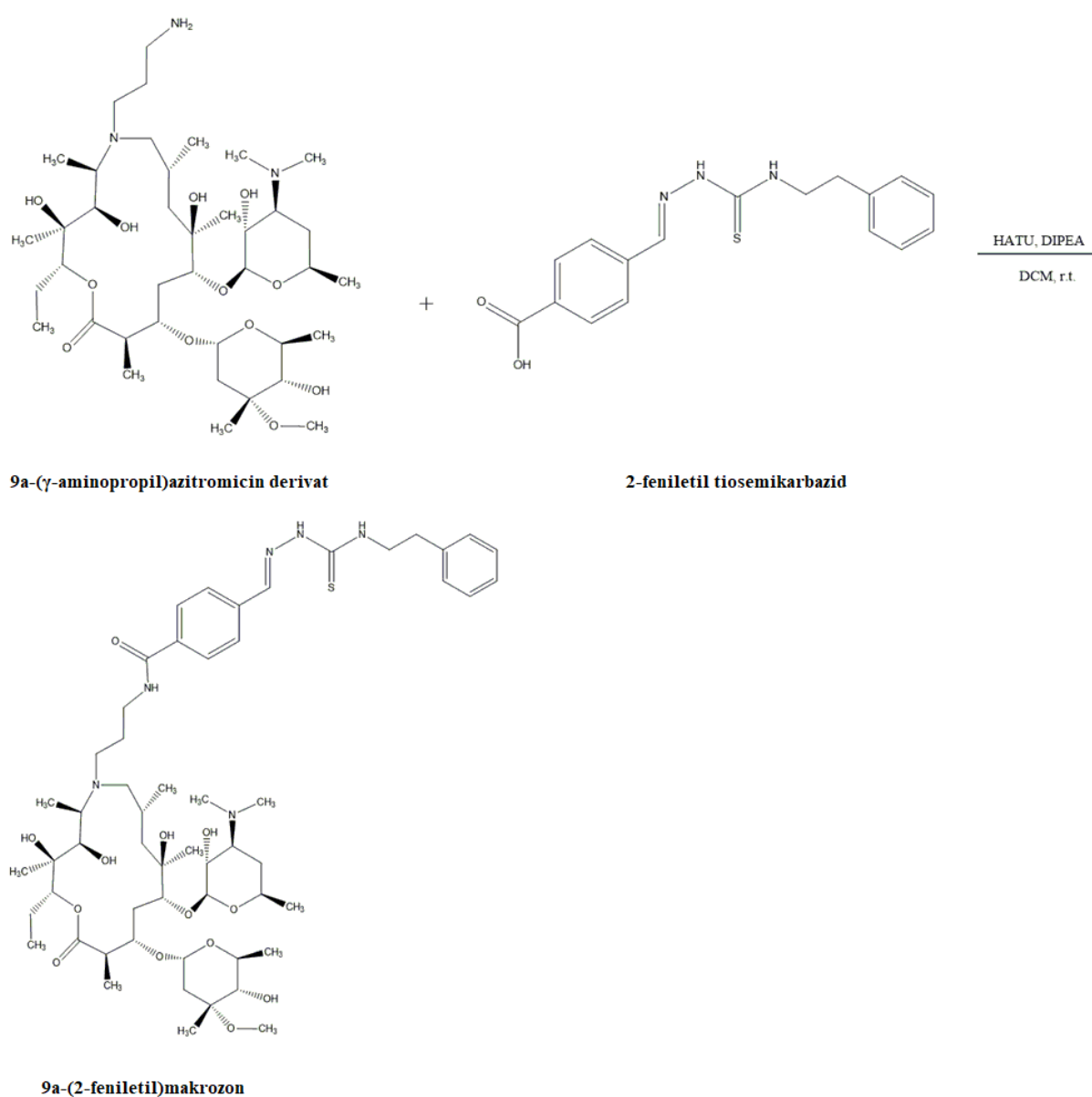
Slika 2.15. Princip rada tehnike HPLC-SPE-NMR.



Slika 2.16. Spregnuti sustav LC-SPE/krio NMR.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U izradi ovog diplomskog rada korištena je reakcijska smjesa 9a-(2-feniletil)makrozona sintetizirana u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (Slika 3.1.). Polazna tvar za sintezu navedenog makrozona, 9a-(γ -aminopropil)azitromicin derivat, sintetiziran je u tvrtci Fidelta d.o.o., Zagreb. Ostale korištene kemikalije te njihovi proizvođači prikazani su u Tablici 3.1.



Slika 3.1. Shematski prikaz sinteze 9a-(2-feniletil)makrozona.

Tablica 3.1. Popis kemijskih tvari korištenih tijekom istraživanja.

<i>Kemijska tvar</i>	<i>Proizvođač</i>
acetonitril (ACN), $\geq 99,9\%$, HPLC grade	Fisher Chemical (UK)
amonijev hidrogenkarbonat, $\geq 99\%$	Sigma Aldrich (Njemačka)
amonijak otopina min. 25% p.a.	Kemika (Hrvatska)
4-formilbenzojeva kiselina, 97%	Sigma Aldrich (Njemačka)
hidrazin monohidrat (N_2H_4), 98 %	Sigma Aldrich (Njemačka)
feniletil izotiocijanat, 96%	Acros Organics (SAD)
azitromicin	Fidelta d.o.o. (Hrvatska)
<i>N,N</i> -diizopropiletilamin (DIPEA), 99,5%	Acros Organics (SAD)
HATU, 97%	Acros Organics (SAD)
acetonitril- <i>d</i> 3, 99,80 %D	Eurisotop (UK)

voda ultra visoke čistoće	Milli-Q Integral Water Purification System, Merck (SAD)
Silikagel LC60A40-63 micron	Fluorochem (UK)
diklormetan stabiliziran s 2-metil-but-2-enom, (CH ₂ Cl ₂), 99,5%	T.T.T. d.o.o. (HR)
metanol (CH ₃ OH), ≥ 99,9%, HPLC grade	PanReac AppliChem (SAD)
dimetil sulfoksid- <i>d</i> ₆ , 99,80 %D	Eurisotop (UK)

3.1. Radni uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)

Istraživanje je provedeno na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti, Agilent 1260 Infinity, koji je opremljen kvaternom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatiranim prostorom za kromatografsku kolonu te detektorom UV-DAD. Kromatogrami su procesirani u programskim paketima *Agilent OpenLab CDS ChemStation* (SAD) te *Bruker HyStar 3.2.* (SAD). Za kromatografsko odjeljivanje korištena je kolona Waters XBridge® Phenyl dimenzija 150 mm × 4,6 mm; 3,5 μm uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila i 10 mmol dm⁻³ amonijačnog pufera pH 10 (Tablica 3.2.). Protok pokretne faze bio je 1,0 mL min⁻¹, a temperatura kolone 25°C. Volumen injektiranja bio je 15 μL. Valna duljina detekcija bila je 210 nm.

Tablica 3.2. Sastav pokretne faze za analizu reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona.

<i>t</i> / min	φ (eluent A) / %	φ (eluent B) / %
0	50	50
20	68	32

21	100	0
30	100	0
30,1	50	50
35	50	50

3.1.1. Priprava pokretne faze za analizu HPLC

Pufer je pripravljen otapanjem 1,58 g amonijeva hidrogenkarbonata u deioniziranoj vodi u tikvici od 2000 mL. pH otopine podešen je na pH 10, uz pomoć pH-metra, postupnim dodavanjem 25%-tne otopine amonijaka. Tako pripravljena otopina profiltrirana je pod sniženim tlakom kroz filter veličine pora 0,22 μm .

3.1.2. Priprava standardnih otopina

Standardne otopine polaznih tvari korištenih u sintezi 9a-(2-feniletil)makrozona pripravljene su u koncentraciji $\gamma = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Odvagano je po 10 mg 9a-(γ -aminopropil) derivata azitromicina, 2-feniletil tiosemikarbazida, azitromicina, HATU-a i 4-formilbenzojeve kiseline u volumetrijske tikvice od 5 mL te je tikvica nadopunjena acetonitrilom do oznake. Također, pripravljene su standardne otopine tekućih tvari tako što je otpipetirano 2,69 μL *N,N*-diizopropiletilamina ($\rho = 0,742 \text{ g mL}^{-1}$), 1,83 μL fenil izotiocijanata ($\rho = 1,094 \text{ g mL}^{-1}$), odnosno 1,94 μL hidrazin monohidrata ($\rho = 1,032 \text{ g mL}^{-1}$) u volumetrijske tikvice od 5 mL te su tikvice nadopunjene acetonitrilom do oznake. Radne otopine pripravljene su razrjeđenjem standardnih otopina s acetonitrilom do konačne masene koncentracije $\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.1.3. Priprava uzorka za analizu HPLC

Otopina reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona pripravljena je otapanjem 25 mg reakcijske smjese u acetonitrilu ($\gamma_0 = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Odvagi makrozona dodan je acetonitril u volumenu 60% volumetrijske tikvice. Tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj da bi se ubrzalo otapanje uzorka, a zatim nadopunjena acetonitrilom do oznake. Radne otopine dobivene su razrjeđivanjem temeljne otopine acetonitrilom do konačnih koncentracija $\gamma_1 = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ i $\gamma_2 = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.2. Radni uvjeti ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE)

Za ekstrakciju na čvrstoj fazi korišten je instrument Prospekt 2 proizvođača Spark Holland, Nizozemska, s jedinicom SPE i pumpom Knauer K-120 za dodatni protok vodene faze. Korišteni programski paket bio je *Bruker Hystar 3.2.* (SAD). Istražena je učinkovitost ekstrakcije analita na nekoliko različitih vrsta SPE-nosača: C2, C8, C18, CN, Resin GP, Resin SH, MM anion te MM kation. Također je istražen utjecaj dodatnog protoka pokretne faze u rasponu od $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ do $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ uz jednostruko i višestruko skladištenje spojeva (engl. *multitrapping*). Prije analize SPE-nosači su kondicionirani ispiranjem s $500 \text{ }\mu\text{L CH}_3\text{CN}$, a nakon toga ekvilibrirani s $500 \text{ }\mu\text{L H}_2\text{O}$. SPE-nosači su nakon ekstrakcije analita sušeni 45 min u struji dušika. Za eluiranje analita sa SPE-nosača korišteno je $200 \text{ }\mu\text{L CD}_3\text{CN}$.

3.3. Snimanje spektara NMR

Snimljeni su spektri ^1H , COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC te su za to korišteni pulsni programi unutar programskog paketa *TopSpin 3.6.1*. Spektri su snimani na spektrometru *Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend* s 5 mm BBO (engl. *broadband*) direktnom Prodigy krio-probom i z-gradijentnom zavojnicom pri 298 K. Kao referentni signal korišten je tetrametilsilan (TMS), a kao otapalo acetonitril- d_3 . Spektri su analizirani i obrađeni u programu *TopSpin 3.6.1*.

3.3.1. Priprava uzorka za snimanje spektara NMR

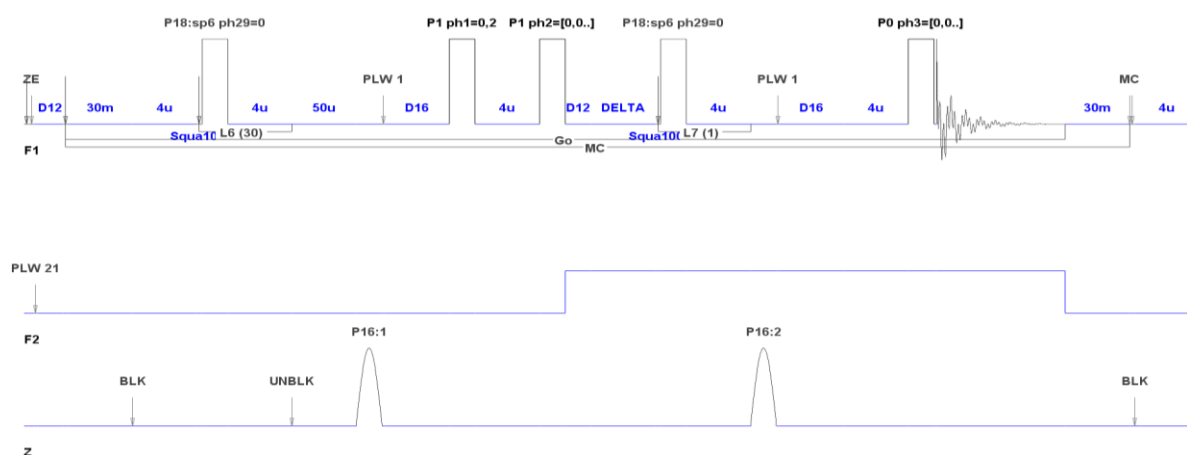
Za snimanje spektara NMR polaznih krutih tvari korištenih u sintezi, reakcijske smjese te 9a-(2-feniletil)makrozona pročišćenog kolonskom kromatografijom pripravljene su otopine masene koncentracije $\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Odvagano je 2,5 mg tvari i otopljeno u $500 \text{ }\mu\text{L}$ acetonitrila- d_3 . Za snimanje spektara NMR tekućina otpipetirano je $3,37 \text{ }\mu\text{L}$ *N,N*-diizopropiletilamina ($\rho = 0,742 \text{ g mL}^{-1}$), $2,29 \text{ }\mu\text{L}$ fenil izotiocijanata ($\rho = 1,094 \text{ g mL}^{-1}$), odnosno $2,42 \text{ }\mu\text{L}$ hidrazin monohidrata ($\rho = 1,032 \text{ g mL}^{-1}$) i otopljeno u $500 \text{ }\mu\text{L}$ acetonitrila- d_3 . Pripravljene otopine su potresane na *Vortex* mješalici kako bi se pospješilo otapanje uzorka te su po potrebi filtrirane i prenesene u čiste i suhe cjevčice NMR promjera 5 mm.

Za snimanje spektara LC-SPE-NMR izolirani spojevi su isprani sa SPE-nosača deuteriranim acetonitrirom ($v = 200 \text{ }\mu\text{L}$) u čiste i suhe cjevčice NMR promjera 3 mm.

3.3.2. ^1H NMR

Za snimanje spektara ^1H NMR polaznih tvari korištenih u sintezi, reakcijske smjese te 9a-(2-feniletil)makrozona pročišćenog kolonskom kromatografijom primjenjen je pulsni slijed *zg30* koji se sastoji od vremena odgode, radiofrekvencijskog pulsa od 30° i vremena akvizicije tijekom kojeg se snima spektar (Tablica 3.3.). Uvjeti mjerenja bili su: 16 snimaka, spektralna širina 20 ppm, digitalno razlučivanje 0,24 Hz.

Za snimanje spektara LC-SPE- ^1H NMR izoliranih nepoznatih spojeva korišten je pulsni slijed *lc1pncwgpps* sa supresijom signala otapala (Tablica 3.3.). To je jednodimenzijaska inačica NOESY pulsno slijeda za supresiju signala otapala koji se sastoji od dva pulsa za prezasićenje tijekom odgode relaksacije (engl. *relaxation delay*) i perioda miješanja (engl. *mixing period*) te dva gradijentna pulsa za bolju supresiju signala otapala (Slika 3.2.). Uvjeti snimanja bili su: 128 ili 256 snimaka (ovisno o koncentraciji analita), spektralna širina 20 ppm, digitalno razlučivanje 0,98 Hz.



Slika 3.2. Pulsni slijed 1D NOESY za supresiju signala otapala.

3.3.3. Homonuklearni i heteronuklearni 2D spektri NMR

Broj snimaka za homonuklearne i heteronuklearne eksperimente 2D ovisio je o koncentraciji spoja, odnosno o omjeru signala i šuma u spektru ^1H . Spektri COSY snimljeni su koristeći pulsni slijed *cosypppqf* (Tablica 3.3.). Parametri mjerenja bili su sljedeći: 2048 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Spektralno područje od 5341,88 Hz te relaksacijsko vrijeme odgode od 2 s. Digitalna rezolucija bila je 5,22 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 41,73 Hz u F1 dimenziji.

Za snimanje spektara HSQC korišten je pulsni slijed *hsqcedetgpsp.3* (Tablica 3.3.). Parametri mjerenja bili su: 4096 točaka u F2 dimenziji, 256 inkremenata u F1 dimenziji, relaksacijsko vrijeme odgode 1,5 s, 48 snimaka po inkrementu, širina spektra u F2 dimenziji 6393,86 Hz, odnosno 18111,57 Hz u F1 dimenziji, digitalna rezolucija 3,12 Hz u F2 dimenziji i 141,50 Hz u F1 dimenziji.

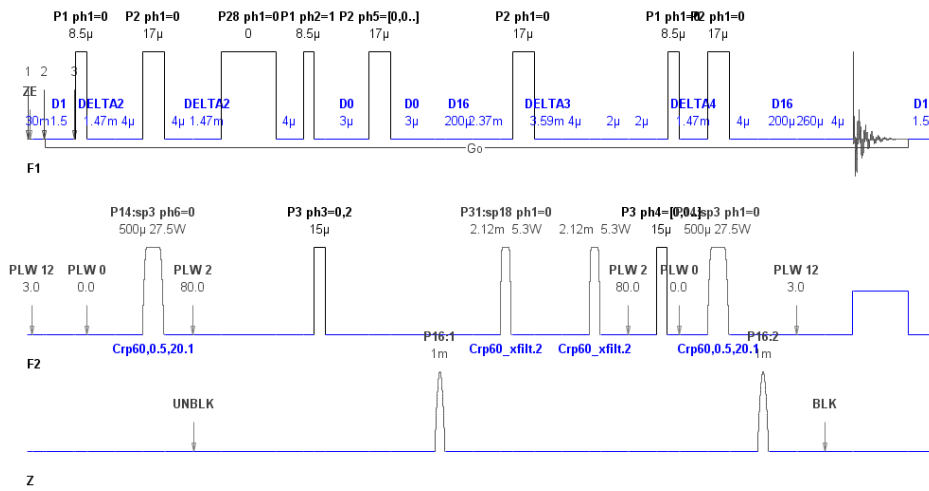
Spektri HMBC snimljeni su upotrebom pulsnoaga slijeda *hmbcgpndqf* (Tablica 3.3.). Parametri mjerenja bili su: 4096 točaka u F2 dimenziji, 256 inkremenata u F1 dimenziji, spektralna širina 15,02 Hz u F2 dimenziji, odnosno 222,09 Hz u F1 dimenziji, 98 snimaka po inkrementu, relaksacijsko vrijeme odgode 1,32 s te digitalna rezolucija 2,93 Hz u F2 dimenziji, odnosno 174,59 Hz u F1 dimenziji.

Tablica 3.3. Korišteni pulsni programi unutar programskog paketa *TopSpin 3.6.1*.

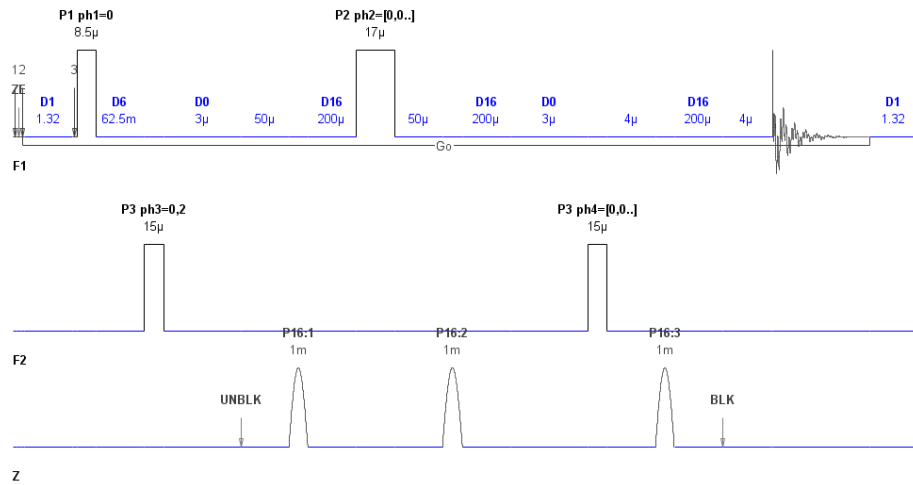
Pulsni programi unutar programskog paketa TopSpin 3.6.1.

pulsni slijed <i>zg30</i>	<p>1 2 ZE 30m D1 1 P0 ph1=[0,2..] 4μ Go MC 30m F1</p>
pulsni slijed <i>cosygpndqf</i>	<p>P17 ph3=0 2.5m 5m P1 ph1=0,2 8.5μ P0 ph2=[0,0..] 8.5μ 12 PLW 10 ZE 1,2 D12 30m 20μ PLW 1 15,0 D1 2 D0 3μ 50μ P16:1 1m P0 ph2=[0,0..] 8.5μ D16 200μ D13 4μ D16 200μ 4μ D11 30m UNBLK BLK P16:1 1m F1</p>

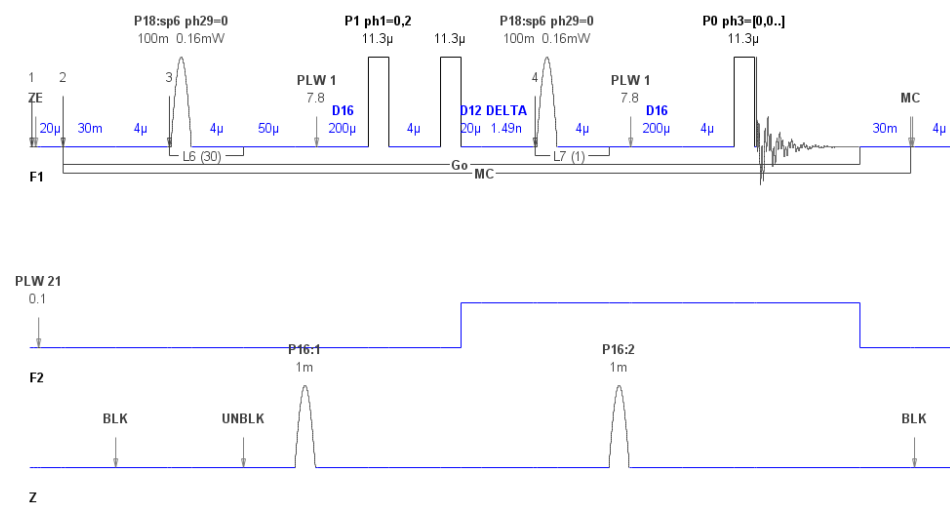
pulsni slijed
hsqcedetgpp.3



pulsni slijed
hmbcgpndqf



pulsni slijed
lc1pncwgpps



3.4. Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS)

Za snimanje spektara MS korišten je vezani sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa uz elektroraspršenje kao ionizacijski izvor (UPLC-ESI-MS) proizvođača *Waters Corporation* (SAD).

Ishodna otopina reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona pripravljena je otapanjem 1 mg reakcijske smjese u 1 mL acetonitrila. Radna otopina pripravljena je razrjeđenjem ishodne otopine u acetonitrilu do konačne koncentracije $\gamma = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$.

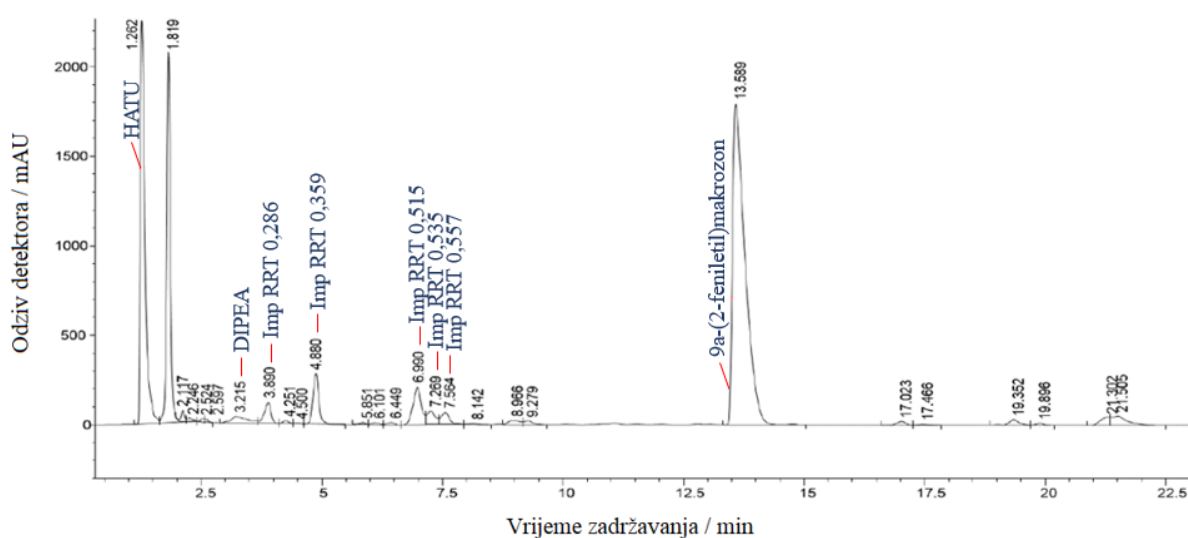
3.5. Pročišćavanje reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona kolonskom kromatografijom

Kolonska kromatografija provedena je na staklenoj koloni punjenoj silikagelom uz eluiranje pokretnom fazom $E+$ čiji je sastav ψ (diklormetan, metanol, amonijak) = 90 : 15 : 1,5. Za provjeru čistoće eluiranih frakcija s kolone korištena je plošna tehnika tekućinske kromatografije – tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC). Kvalitativna analiza TLC-om provedena je na plohi dimenzija 5 cm \times 20 cm na koju je nanesen sloj sorbensa (silikagel). Frakcije su na pločicu nanese pomoću kapilare u točku. Kako bi se kromatogram razvio, pločica je stavljena u komoru na čijem se dnu nalazilo otapalo $E+$, odnosno pokretna faza. Nakon što je otapalo prešlo 2/3 kromatografske pločice pod utjecajem kapilarnih sila, kromatografija je prekinuta, a pločica osušena. Mrlje analita detektirane su pod UV svjetlom i/ili prskanjem 10% -tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu.

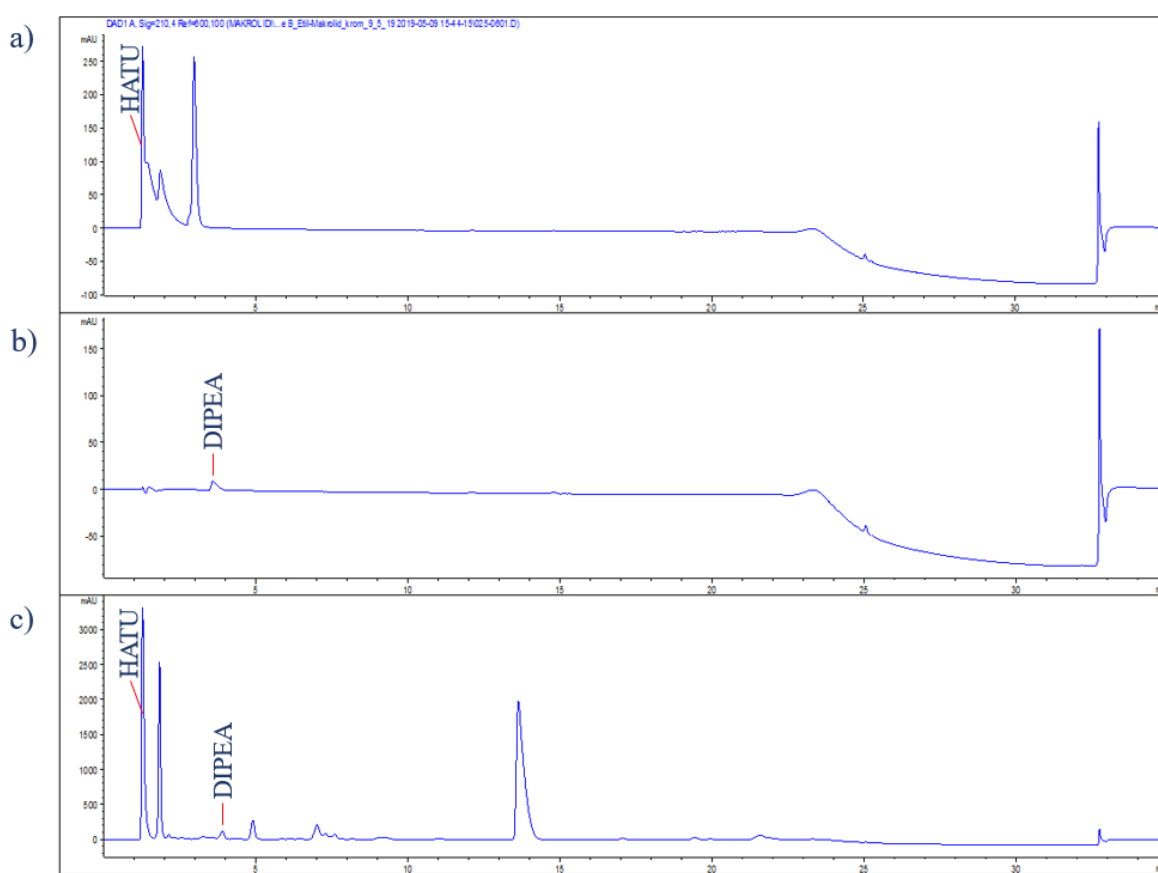
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Tekućinskromatografska analiza reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona

Zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje sastojaka reakcijske smjese novosintetiziranog 9a-(2-feniletil)makrozona postignuto je na kromatografskoj koloni Waters XBridge® Phenyl, dimenzija 150 mm × 4,6 mm; 3,5 μm, uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila i 10 mmol dm⁻³ amonijačnog pufera pH 10 (Tablica 3.2.). Reprezentativni kromatogram reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona prikazan je na Slici 4.1. Usporedbom vremena zadržavanja spojeva u pojedinačnim kromatogramima polaznih tvari korištenih u sintezi (Dodatak, Slike D1. – D8.) s vremenima zadržavanja spojeva u kromatogramu reakcijske smjese, identificirani su HATU i DIPEA (Slika 4.2.). HATU, 1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat, se koristi kao aktivator karboksilne skupine kiseline koja, zatim, u reakciji s aminom stvara amid. Reakcija se provodi uz dodatak baze DIPEA, *N,N*-diizopropiletilamin.⁵⁵ Budući da se HATU i DIPEA dodaju u reakcijsku smjesu u suvišku, očekivana je njihova identifikacija u analiziranom uzorku. Spektri NMR polaznih tvari korištenih u sintezi nalaze se u dodatku (Slike D9. – D15.).



Slika 4.1. Reprezentativni kromatogram reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona masene koncentracije 2,0 mg mL⁻¹.



Slika 4.2. Reprezentativni kromatogram a) HATU-a ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$), b) DIPEA-e ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) i c) reakcijske smjese ($\gamma = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.

Kvantitativna analiza reakcijske smjese provedena je metodom normalizacije pikova⁵⁶ u kromatogramu reakcijske smjese i to uz pomoć programa *Agilent OpenLab CDS ChemStation*. Prema njoj se sadržaj pojedine komponente izračunava iz omjera površine kromatografske krivulje određivane tvari i ukupne površine svih kromatografskih krivulja, a računa se prema jednadžbi (3) gdje je A površina kromatografske krivulje, a f faktor odgovora. Jednadžba (3) korištena je bez faktora odgovora s obzirom da srodni spojevi novog makrozona, preko kojih bi se računao faktor odgovora, nisu bili na raspolaganju.

$$c_x = \frac{\frac{A_x}{f_x}}{\sum \frac{A_i}{f_i}} \times 100 \quad (3)$$

Nedostatak metode normalizacije pikova je taj što ona ne uzima u obzir nedetektirane komponente uzorka te pretpostavlja isti odziv detektora za sve sastavnice, a korištenjem metode s vanjskim standardima povećala bi se točnost rezultata. Rezultati dobiveni primjenom ove metode prikazani su u Tablici 4.1. Ukupno 27 različitih spojeva čini reakcijsku smjesu 9a-(2-feniletil)makrozona. Nepoznati spojevi prisutni u reakcijskoj smjesi imenovani su oznakom Imp za onečišćenje (engl. *Impurity*) i relativnim vremenima zadržavanja (engl. *Relative Retention Time*, RRT) u odnosu na glavnu komponentu 9a-(2-feniletil)makrozon. Onečišćenje Imp RRT 0,286 (pik 9) izlazi s kolone pri t_R 3,901 min, a čini 1,215 % reakcijske smjese. Onečišćenje Imp RRT 0,359 (pik 11), koje čini 2,948 % reakcijske smjese, ima vrijeme zadržavanja t_R 4,895 min. Onečišćenje Imp RRT 0,515 (pik 15) izlazi s kolone pri t_R 7,011 min i čini 1,797 % reakcijske smjese. Budući da su navedena onečišćenja zastupljena u reakcijskoj smjesi u udjelima većima od 1 %, odabrana su za analizu tehnikom LC-SPE/NMR. Glavna komponenta ima vrijeme zadržavanja t_R 13,265 min i čini 46,715 % reakcijske smjese. Također je vidljivo da odabrana onečišćenja imaju kraća vremena zadržavanja u odnosu na glavnu komponentu, što znači da su polarnija.

Tablica 4.1. Metoda normalizacije pikova u kromatogramu reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona.

PIK	t_R / min	RRT	% POVRŠINE
HATU	1,262	0,093	26,615
2	1,825	0,134	15,787
3	2,124	0,156	0,258
4	2,254	0,165	0,047
5	2,524	0,185	0,187
6	2,822	0,207	0,012
7	3,04	0,223	0,011
DIPEA	3,215	0,238	0,326
9	3,901	0,286	1,215
10	4,268	0,313	0,127
11	4,895	0,359	2,948
12	5,87	0,431	0,083
13	6,12	0,449	0,065
14	6,466	0,475	0,093
15	7,011	0,515	1,797
16	7,287	0,535	0,168
17	7,584	0,557	0,324
18	8,169	0,600	0,051
19	8,704	0,639	0,016
20	9,04	0,663	0,073
21	9,308	0,683	0,027
22	11,111	0,815	0,075

9a-(2-feniletil)makrozon	13,625	1,000	46,715
24	17,066	1,253	0,331
25	19,412	1,425	0,439
26	19,954	1,465	0,100
27	21,588	1,584	2,109

4.2. Istraživanje učinkovitosti ekstrakcije spojeva na SPE-nosače

Poznato je da izbor prikladne nepokretne faze za izolaciju pojedinih sastojaka reakcijske smjese bitno utječe na uspješnost analize. Nepokretne faze SPE-nosača vrlo su selektivne s obzirom na sorpciju ili desorpciju analita i uslijed toga utječu na količinu analita koja će doći do protočne ćelije NMR.^{40,43} Istovremeno, hidrofobne interakcije između analita i nepokretne faze važne su za dobro zadržavanje analita, a učinkovitost zadržavanja spojeva prilično ovisi o polarosti sastojka.³⁹ U kromatografiji obrnutih faza, gdje je nepokretna faza manje polarna od pokretne faze, učinkovitost zadržavanja spojeva na SPE-nosaču veća je za one spojeve koji se dulje zadržavaju na kromatografskoj koloni, odnosno za manje polarne spojeve.

U ovom istraživanju istražena je učinkovitost ekstrakcije glavne komponente i odabranih onečišćenja na SPE-nosače. Korišteno je osam vrsta nepokretnih faza SPE-nosača među kojima su četiri bazirane na silika-materijalu, dvije na polimernom materijalu, a dvije grade ionski izmjenjivači. Popis odabranih punila SPE-nosača, kao i neka njihova svojstva, nalaze se u Tablici 4.2.

Tablica 4.2. Nepokretne faze SPE-nosača i njihova svojstva.

Nepokretna faza	Opis	Veličina čestica punila
CN	cijanopropilna faza na bazi silikagela	7 µm
C2	etilna faza na bazi silikagela	7 µm
C8	oktilna faza na bazi silikagela	7 µm
C18	oktadecilna faza na bazi silikagela	7 µm
Resin GP	modificirani divinilbenzenski polimer	5-15 µm
Resin SH	modificirani stiren-divinilbenzenski polimer	15-25 µm

MM* anion	anionski izmjenjivač s polidivinil benzenskom bazom	10 μm
MM* kation	kationski izmjenjivač s polidivinil benzenskom bazom	10 μm

*MM=mješoviti način (engl. *Mixed Mode*)

Glavna komponenta reakcijske smjese i odabrana onečišćenja ekstrahirana su na svaku pojedinu vrstu SPE-nosača višestrukim ukoncentriravanjem (engl. *multitrapping*) 5 puta uz stalan dodatni protok vodene faze od 3,0 mL min⁻¹. Nakon sušenja SPE-nosača u struji dušika, ekstrahirani spojevi su eluirani deuteriranim otapalom u cjevčice NMR. Snimljeni su spektri ¹H NMR iz kojih je dobiven podatak o omjeru signala prema šumu (engl. *Signal-to-Noise, S/N*). Omjer signala prema šumu određen je automatski u programu *TopSpin 3.6.1.*, a izračunat je u području od 9,0 ppm do 5,5 ppm. Rezultati su prikazani u Tablici 4.3.

Tablica 4.3. Učinkovitost ekstrakcije glavnog spoja i onečišćenja iz reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona na različitim nepokretnim fazama višestrukim ukoncentriravanjem.

Spoj	S/N*							
	SPE-nosač							
	CN	C2	C8	C18	Resin GP	Resin SH	MM kation	MM anion
9a-(2-feniletil) makrozon	1,9	2,1	22,2	170,8	17,0	4,0	1,8	38,8
Imp RRT 0,359	3,0	1,8	2,0	2,4	12,6	18,0	4,4	7,6
Imp RRT 0,141	2,1	1,7	2,2	1,7	1,8	2,5	1,9	1,9

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

Iz rezultata prikazanih u Tablici 4.3. vidljivo je da se novოსintetizirani 9a-(2-feniletil)makrozon (glavni spoj) najbolje zadržava na nepokretnoj fazi C18 koja se bazira na silika-materijalu, dok polarnije onečišćenje (Imp RRT 0,359) pokazuje bolje zadržavanje na Resin SH divinilbenzenskom polimernom SPE-nosaču. Onečišćenje Imp RRT 0,141 se nije uspješno ekstrahiralo niti na jednoj nepokretnoj fazi SPE-nosača, stoga ga nije bilo moguće identificirati tehnikom LC-SPE/NMR. Prema posljednjim istraživanjima^{40,43} pokazano je da se polarniji spojevi vrlo slabo zadržavaju na nepokretnim fazama koje se baziraju na silika-materijalu, a umjereno dobro na polimernim nepokretnim fazama, što je potvrđeno i našim istraživanjem.

Zbog većeg udjela organskog materijala polimerne nepokretne faze obično imaju veću specifičnu površinu i povećan kapacitet zadržavanja spojeva u odnosu na silika-bazirane faze te bolje zadržavaju polarnije organske spojeve. Na temelju dobivenih podataka za ekstrakciju nepoznatih onečišćenja Imp RRT 0,286, Imp RRT 0,359 i Imp RRT 0,515, koja su polarnija od glavne komponente, odabrana je nepokretna faza Resin SH.

Učinkovitost ekstrakcije spojeva na SPE-nosače najviše ovisi o odabiru prikladne nepokretne faze. Drugi čimbenik, koji ima značajan utjecaj na zadržavanje spojeva, je dodatni protok vodene faze (*make-up* protok). Uloga dodatnog protoka vodene faze jest smanjenje elucijske jakosti organskog dijela pokretne faze koja se koristi u kromatografiji obrnutih faza. Poznato je da veći udio organskog otapala značajno smanjuje faktor zadržavanja spojeva na koloni.⁴⁰ Stoga je istražen utjecaj dodatnog protoka vodene faze na zadržavanje nepoznatih onečišćenja Imp RRT 0,286, Imp RRT 0,359 i Imp RRT 0,515 na nepokretnoj fazi Resin SH. Odabrana onečišćenja ekstrahirana su na nepokretnu fazu Resin SH višestrukim ukoncentriravanjem (engl. *multitrapping*) 60 puta uz dodatni protok vodene faze od 3,0 mL min⁻¹, 1,0 mL min⁻¹ i 0,5 mL min⁻¹. Nakon sušenja SPE-nosača u struji dušika, ekstrahirani spojevi su eluirani deuteriranim otapalom u cjevčice NMR. Snimljeni su spektri ¹H NMR iz kojih je dobiven podatak o omjeru signala prema šumu (engl. *Signal-to-Noise*, S/N). Omjer signala prema šumu određen je automatski u programu *TopSpin 3.6.1.*, a izračunat je u području od 9,0 ppm do 5,5 ppm. Rezultati su prikazani u Tablici 4.4. Pokazano je da veći dodatni protok vodene faze pogoduje boljem zadržavanju polarnijih onečišćenja.

Tablica 4.4. Učinkovitost ekstrakcije onečišćenja iz reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozon na nepokretnoj fazi Resin SH višestrukim ukoncentriravanjem pri različitim dodatnim protocima vodene faze.

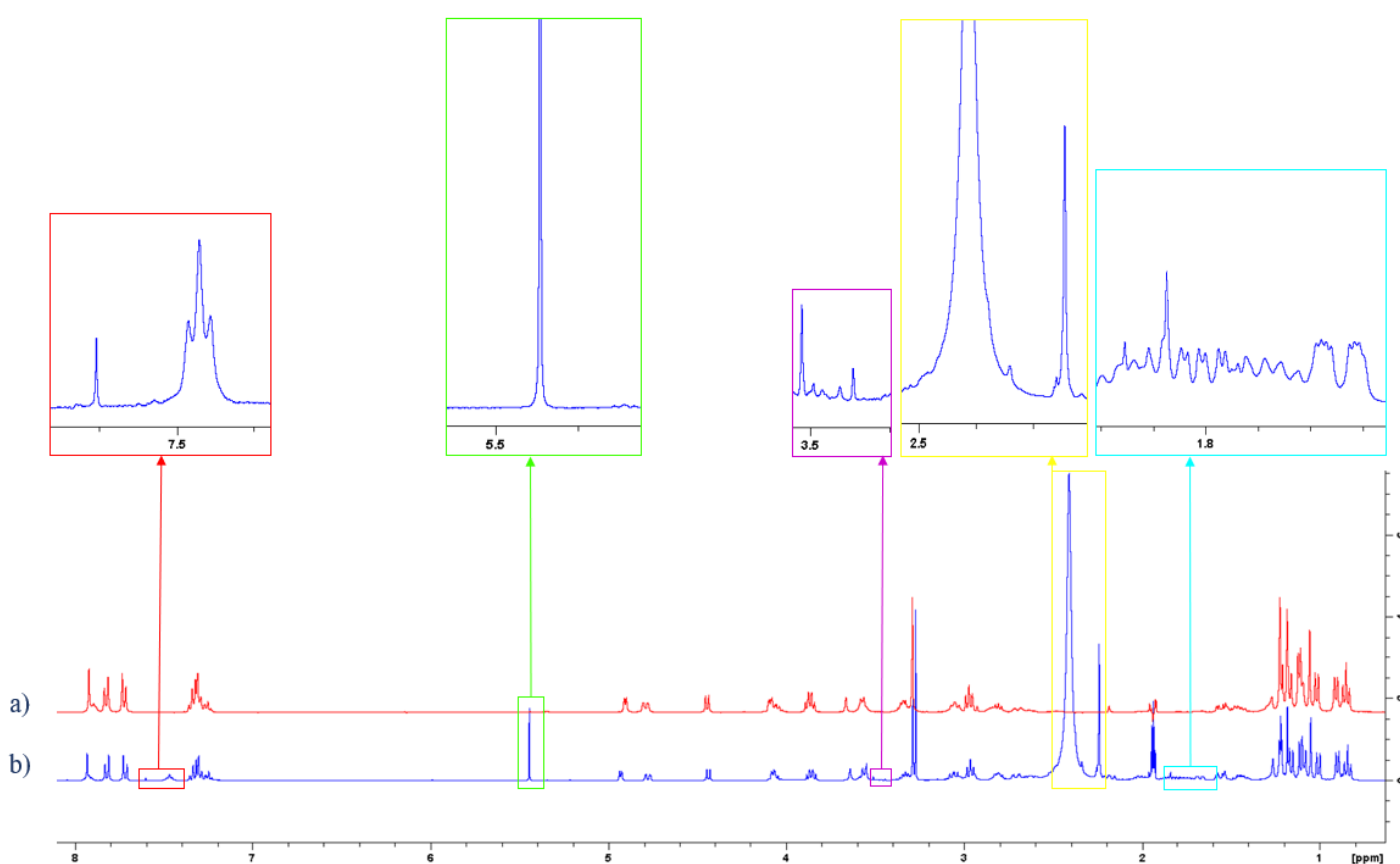
Spoj	S/N*		
	Dodatni protok / mL min ⁻¹		
	3,0	1,0	0,5
Imp RRT 0,286	22,1	27,4	6,0
Imp RRT 0,359	35,1	14,4	7,75
Imp RRT 0,515	55,6	67,7	75,1

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

4.3. Analiza reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona tehnikom LC-SPE/NMR

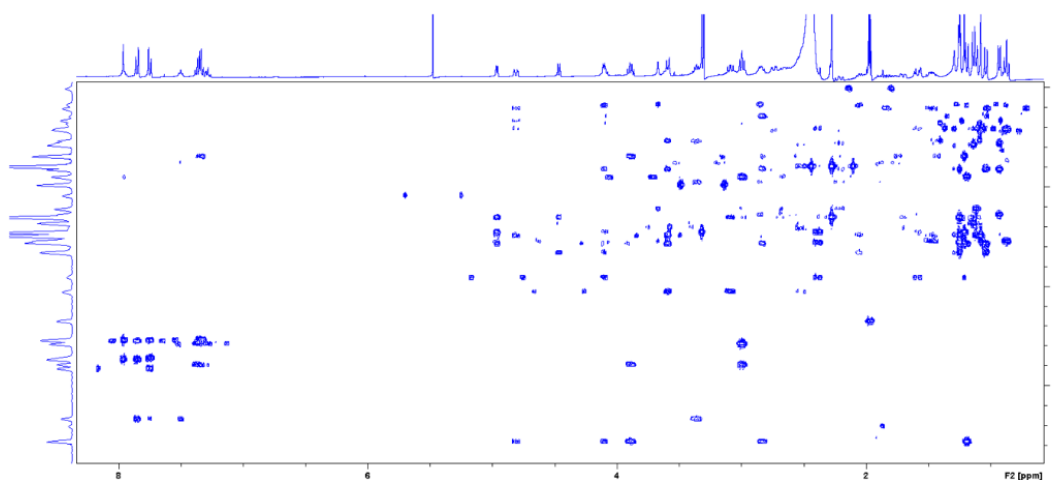
4.3.1. Analiza glavne komponente

9a-(2-feniletil)makrozon uspješno je izoliran iz reakcijske smjese tehnikom LC-SPE i to višestrukim ukoncentriravanjem analita (5 puta) na SPE-nosač s nepokretnom fazom C18. Glavna komponenta je također izolirana kolonskom kromatografijom te su uspoređeni spektri ^1H NMR izoliranog spoja (Slika 4.3.). Usporedbom spektara ^1H NMR 9a-(2-feniletil)makrozona vidljivo je da je spoj izoliran tehnikom LC-SPE čišći (Slika 4.3.a) u odnosu na isti spoj izoliran kolonskom kromatografijom (Slika 4.3.b)). Time je pokazano da je tehnika LC-SPE/NMR brža i učinkovitija metoda koja koristi znatno manje količine organskih otapala za izolaciju i identifikaciju spojeva iz reakcijskih smjesa u usporedbi s klasičnim metodama pročišćavanja.

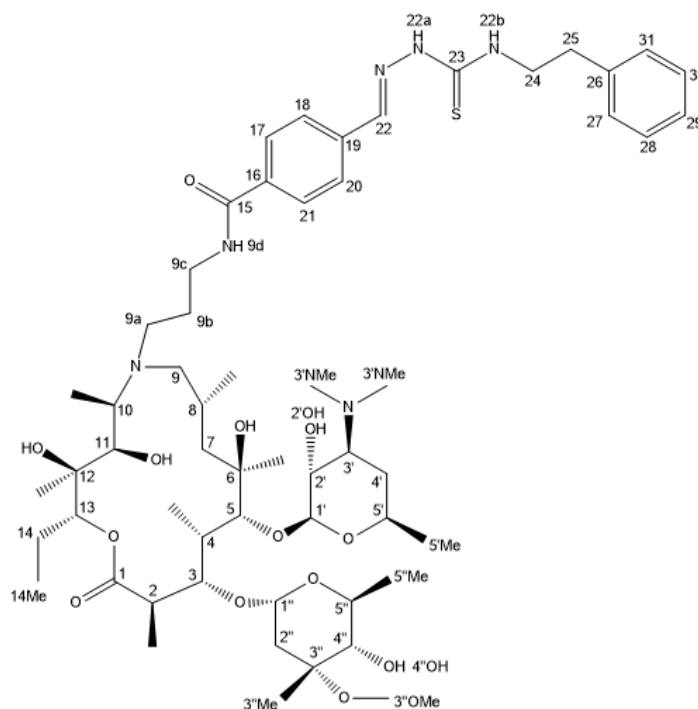


Slika 4.3. a) Spektar ^1H NMR 9a-(2-feniletil)makrozona izoliranog tehnikom LC-SPE i b) kolonskom kromatografijom.

Da bi se dobila dovoljna količina spoja za snimanje dvodimenzijskih spektara NMR, povećan je broj uzastopnih injektiranja reakcijske smjese na kromatografsku kolonu s 5 na 60 puta. Glavna komponenta je izolirana na SPE-nepokretnu fazu C18. Nakon sušenja SPE-nosača u struji dušika, spoj je eluiran s CD_3CN u 3 mm cjevčicu NMR te su snimljeni jedno- i dvodimenzijski spektri NMR (Slika 4.4, Dodatak, D17. – D20.) te spektar MS (Dodatak, D16.) na temelju kojih je potvrđena struktura novog spoja (Slika 4.5.). Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C spektrima NMR za 9a-(2-feniletil)makrozon asignirani u acetonitrilu- d_3 prikazani su u Tablici 4.5.



Slika 4.4. Spektar HMBC izoliranog 9a-(2-feniletil)makrozona snimljen u deuteriranom acetonitrilu pri 25 °C.



Slika 4.5. Struktura 9a-(2-feniletil)makrozona.

Tablica 4.5. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C 9a-(2-feniletil)makrozona asignirani u acetonitrilu- d_3 .

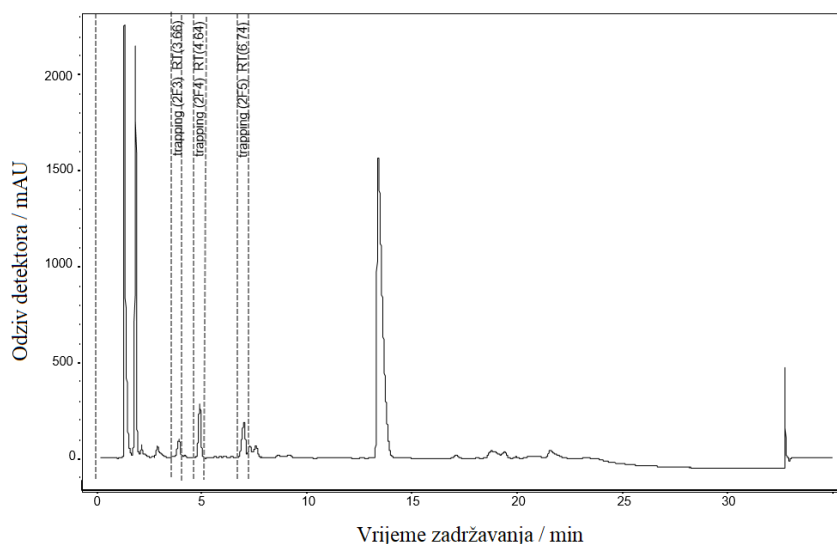
Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1	–	178,20
2	2,84	45,11
2Me	1,19	14,58
3	4,10	78,55
4	2,05	40,97
4Me	1,03	8,86
5	3,59	83,16
6	–	74,16
6Me	1,25	26,93
6OH	– ^a	–
7eq; 7ax	1,58; 1,47	41,17
8	1,99	28,08
8Me	0,92	21,98
9eq; 9ax	2,73; 2,22	63,94
9a	3,05; 2,65	47,62
9b	1,90; 1,77	27,21
9c	3,36	38,12
9d	7,50	–
10	2,85	60,98
10Me	1,11	8,45
11	3,67	74,61
11OH	– ^a	–
12	–	74,81
12Me	1,07	16,62
12OH	– ^a	–
13	4,80	77,19
14eq; 14ax	1,84; 1,47	21,23
14Me	0,87	10,26
15	–	166,60
16	–	136,07
17; 21	7,85	127,38
18; 20	7,74	126,92
19	–	136,81
22	7,96	141,28
22a	– ^a	–
22b	– ^a	–
23	–	177,81
24	3,89	45,24
25	2,99	34,93
26	–	139,44
27; 31	7,36	128,93
28; 30	7,35	126,45
29	7,38	126,41
1'	4,46	102,44
2'	3,07	70,91
2'OH	– ^a	–
3'	2,52	65,36
3'NMe ₂	2,27	39,75
4'eq; 4'ax	1,70; 1,11	28,89
5'	3,59	68,19
5'Me	1,14	20,89

1"	4,95	95,43
2"eq; 2"ax	2,38; 1,59	34,76
3"	–	72,80
3"Me	1,21	20,62
3"OMe	3,31	49,04
4"	2,98	77,88
4"OH	– ^a	–
5"	4,09	65,42
5"Me	1,25	18,25

^anije opaženo

4.3.2. Izolacija i identifikacija nepoznatih onečišćenja iz reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona

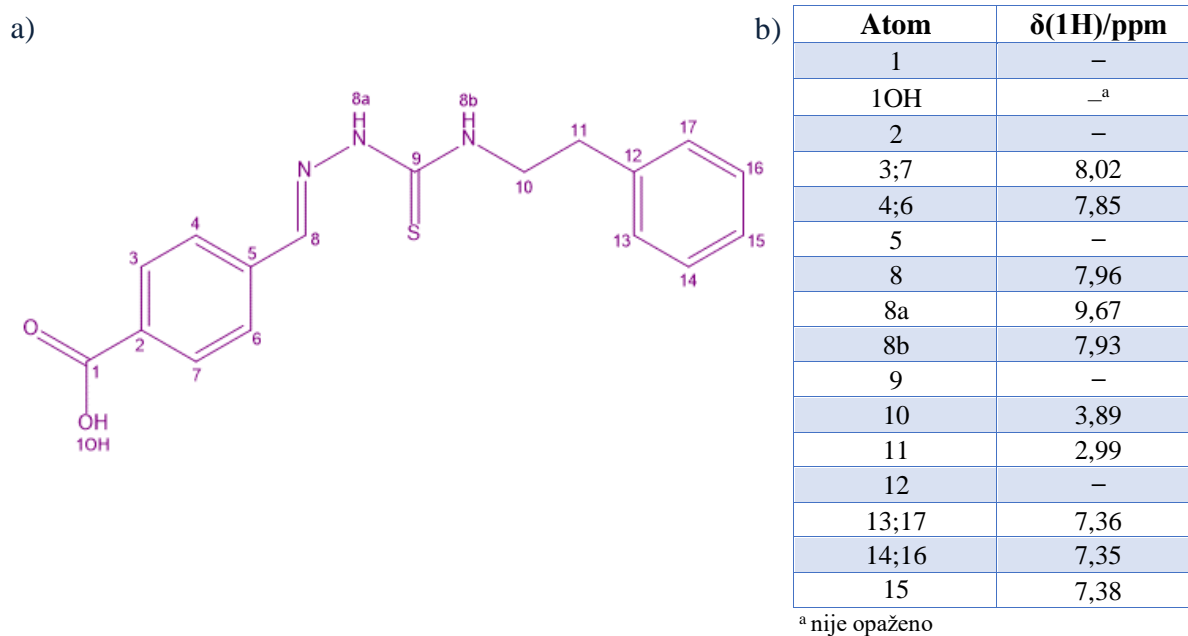
Za izolaciju nepoznatih onečišćenja, Imp RRT 0,286 (pik 9), Imp RRT 0,359 (pik 11) i Imp RRT 0,515 (pik 15), iz reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona korišten je uzorak masene koncentracije 5,0 mg mL⁻¹. Spojevi su estrahirani višestrukim ukoncentriravanjem na Resin SH SPE-nosače 60 puta (Slika 4.6.).



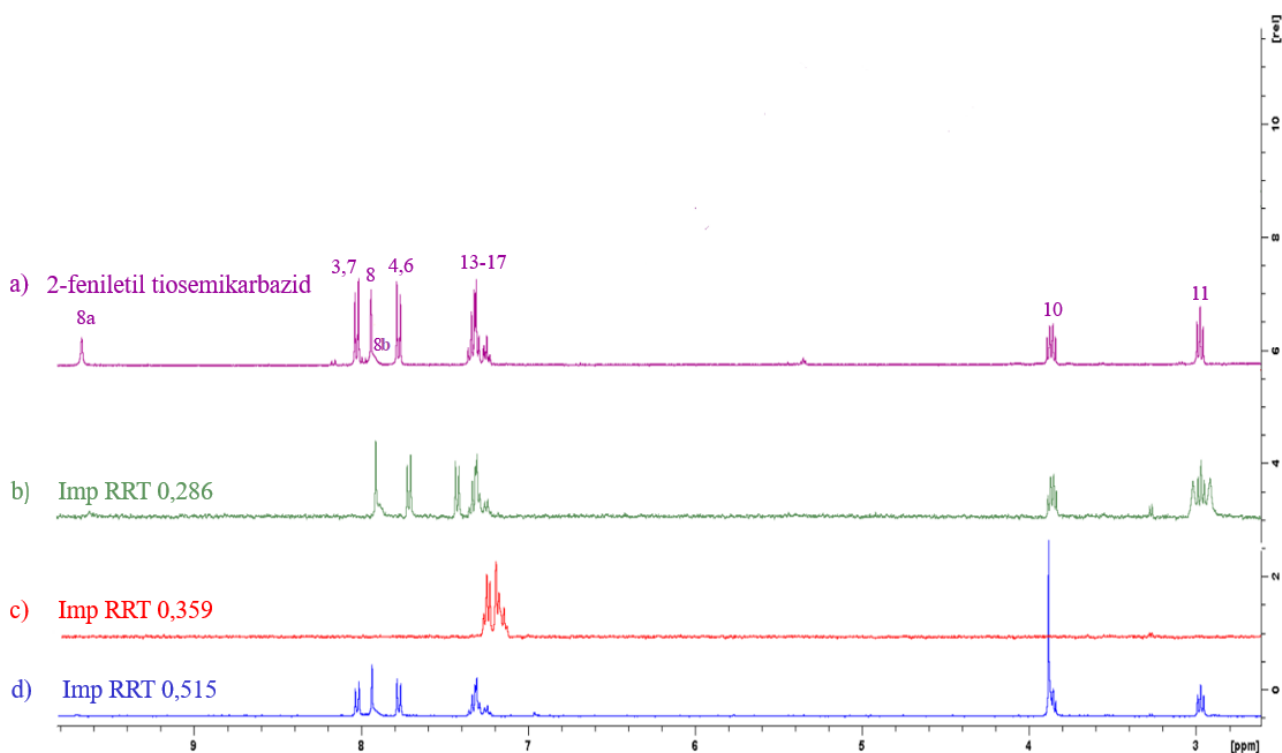
Slika 4.6. Ekstrakcija odabranih nepoznatih onečišćenja iz reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona.

Nakon sušenja SPE-nosača u struji dušika analiti su eluirani deuteriranim acetonitrilom u 3 mm cjevčice NMR te su snimljeni spektri ¹H i COSY za svaki izolirani spoj. Koncentracija izoliranih onečišćenja, nažalost, nije bila dovoljna za snimanje heteronuklearnih 2D eksperimenata NMR. Usporedbom spektara ¹H NMR izoliranih spojeva i 2-feniletil tiosemikarbazida, kiseline koja se koristi u sintezi 9a-(2-feniletil)makrozona (Slika 4.8.), vidljivo je da su izolirana onečišćenja strukturno vrlo slična 2-feniletil tiosemikarbazidu (Slika

4.7.). Spektri NMR 2-feniletil tiosemikarbazida snimljeni su, također, u deuteriranom otapalu DMSO (Dodatak, Slike D21. – D24.).

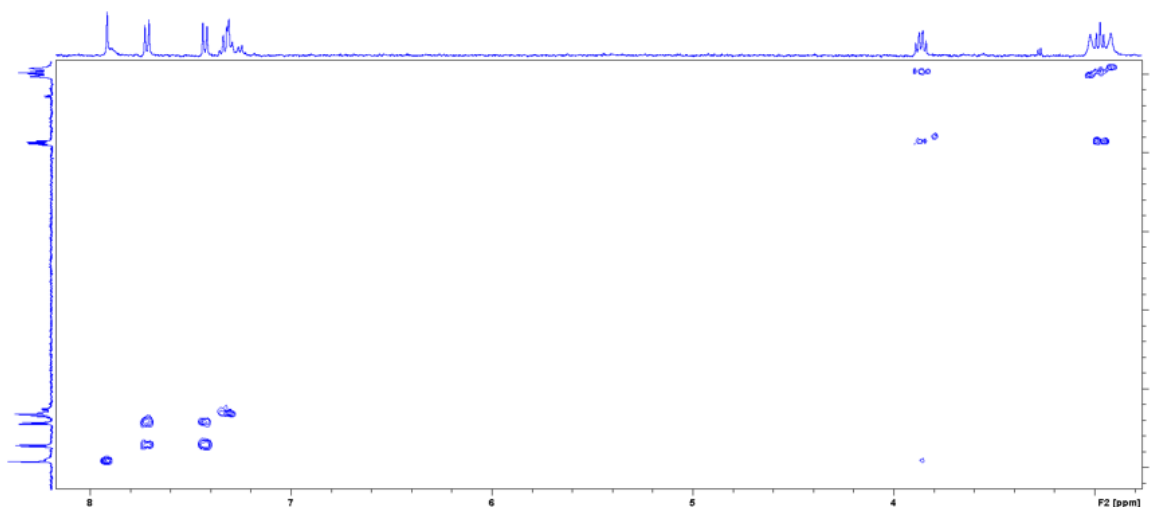


Slika 4.7. a) kemijska struktura; b) kemijski pomaci 1H 2-feniletil tiosemikarbazida snimljeni u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.

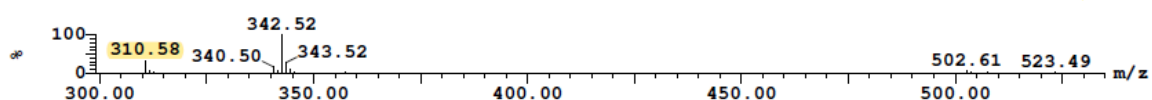


Slika 4.8. Preklapljeni spektri 1H NMR: a) 2-feniletil tiosemikarbazida; b) onečišćenja Imp RRT 0,286; c) onečišćenja Imp RRT 0,359 i d) onečišćenja Imp RRT 0,515 snimljeni u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.

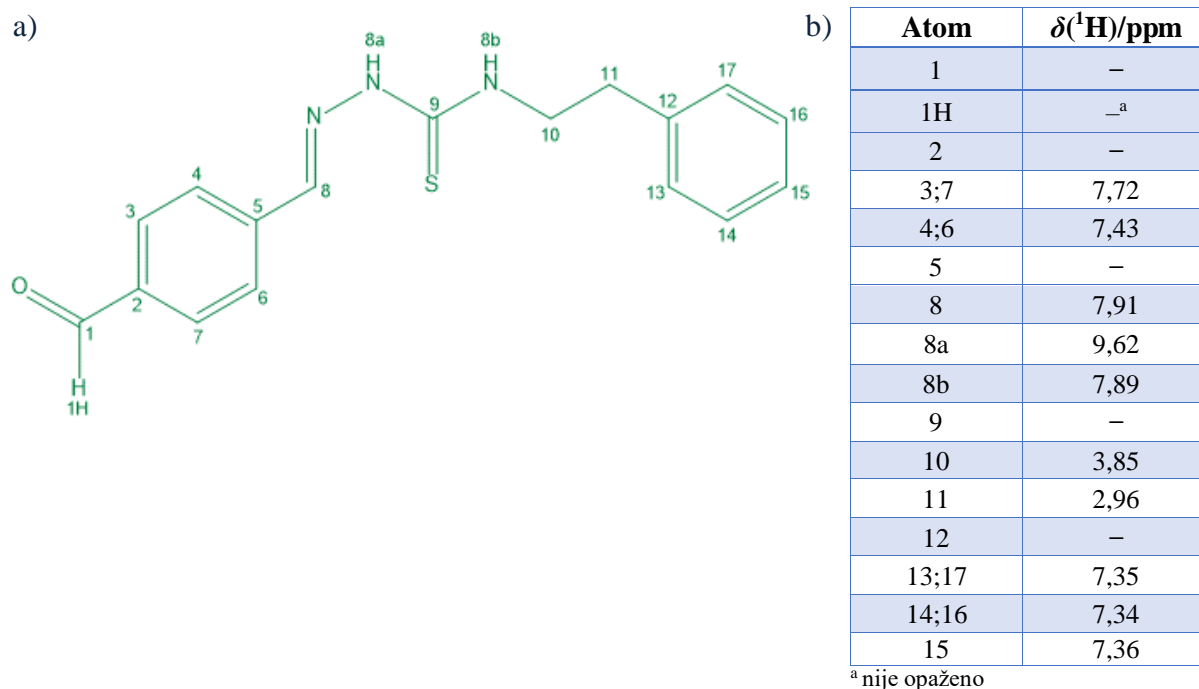
Signali onečišćenja Imp RRT 0,286 u spektru ^1H NMR većinom se preklapaju sa signalima 2-feniletil tiosemikarbazida, ali u aromatskom području dolazi do pomaka signala dubleta koji odgovaraju protonima 3 i 7, odnosno 4 i 6, što može ukazivati na to da se radi o aldehidu, a ne o kiselini. Dublet H3; H7 je pomaknut sa 8,02 ppm u spektru kiseline na 7,71 ppm u spektru aldehida, a dublet H4; H6 se pomaknuo sa 7,85 ppm u spektru kiseline na 7,43 ppm u spektru aldehida. Kemijski pomaci protona H13 – H17 ne razlikuju se značajno u spektru kiseline i u spektru onečišćenja. U spektru onečišćenja također su prisutni signali metilenskih skupina 10 i 11. U spektru COSY za izolirano onečišćenje vidljiva je sprega metilidenskih (metinskih) protona H3; H7 s protonima H4; H6, kao i sprega metilenskih skupina 10 i 11 (Slika 4.9.). Protoni karboksilne skupine, odnosno aldehidne skupine, nisu prisutni u spektrima zbog kemijske izmjene s deuteriranim otapalom. Snimanjem spektra MS za izolirano onečišćenje Imp RRT 0,286 dobiven je molekularni ion $m/z = 311$ (Slika 4.10.). Na temelju spektara NMR (Slika 4.3.7., Dodatak, Slika D25.) i MS predložena je struktura onečišćenja Imp RRT 0,286 (Slika 4.11.).



Slika 4.9. Spektar COSY onečišćenja Imp RRT 0,286 snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.

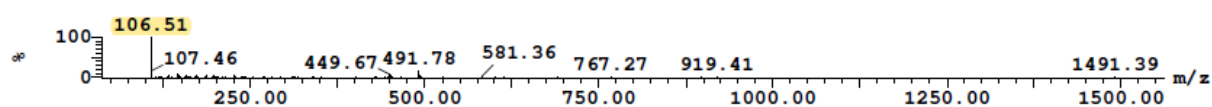


Slika 4.10. Spektar ESI-MS onečišćenja Imp RRT 0,286.

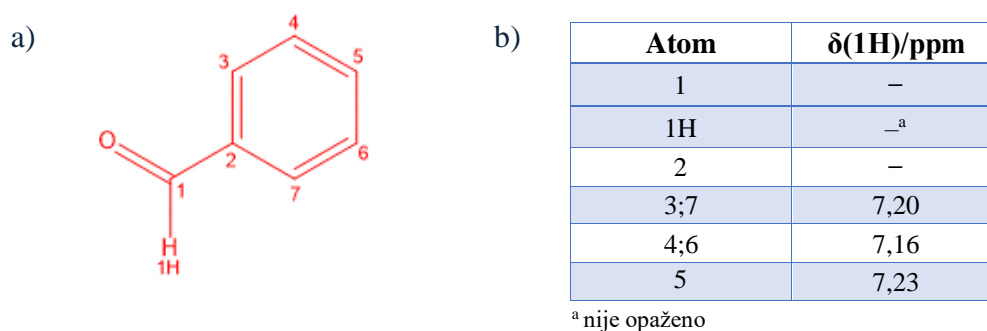


Slika 4.11. a) Predložena struktura; b) kemijski pomaci ^1H onečišćenja Imp RRT 0,286 snimljeni u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.

Spektar onečišćenja Imp RRT 0,359 najjednostavniji je od svih snimljenih spektara ^1H NMR. U njegovom spektru vidljivo je preklapanje signala navedenog onečišćenja i 2-feniletil tiosemikarbazida u području od 7,40 – 7,00 ppm, dok ostali signali izostaju. Zbog toga je za onečišćenje Imp RRT 0,359 predložena struktura benzaldehida (Slika 4.13.), a spektar MS dodatno je potvrdio predloženu strukturu (Slika 4.12.). Pripadni spektri NMR nalaze se u dodatku (Slike D26. i D27.).

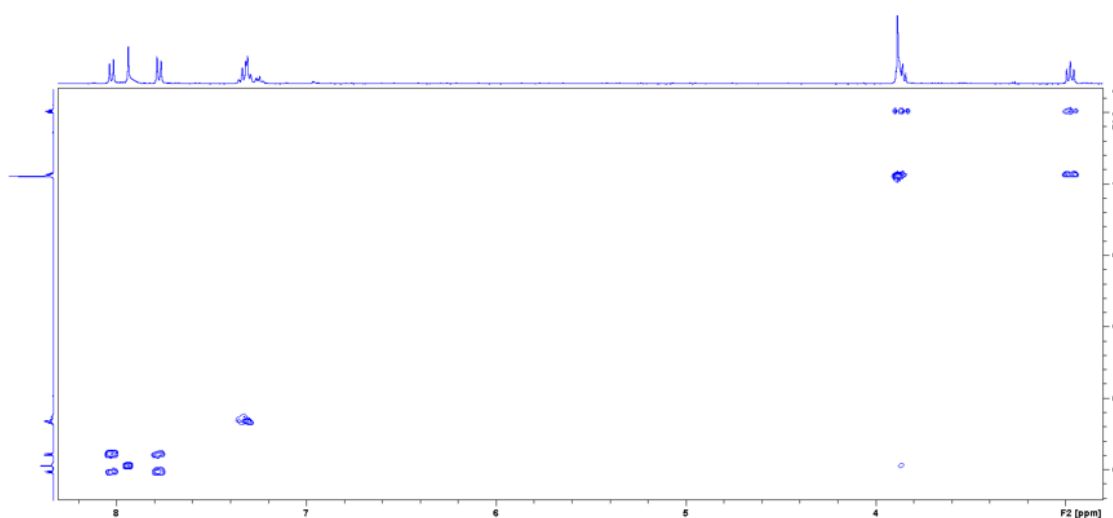


Slika 4.12. Spektar ESI-MS onečišćenja Imp RRT 0,359.

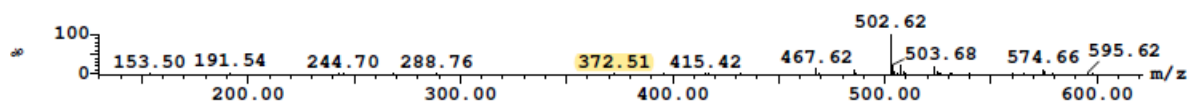


Slika 4.13. a) Predložena struktura; b) kemijski pomaci 1H onečišćenja Imp RRT 0,359 snimljeni u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.

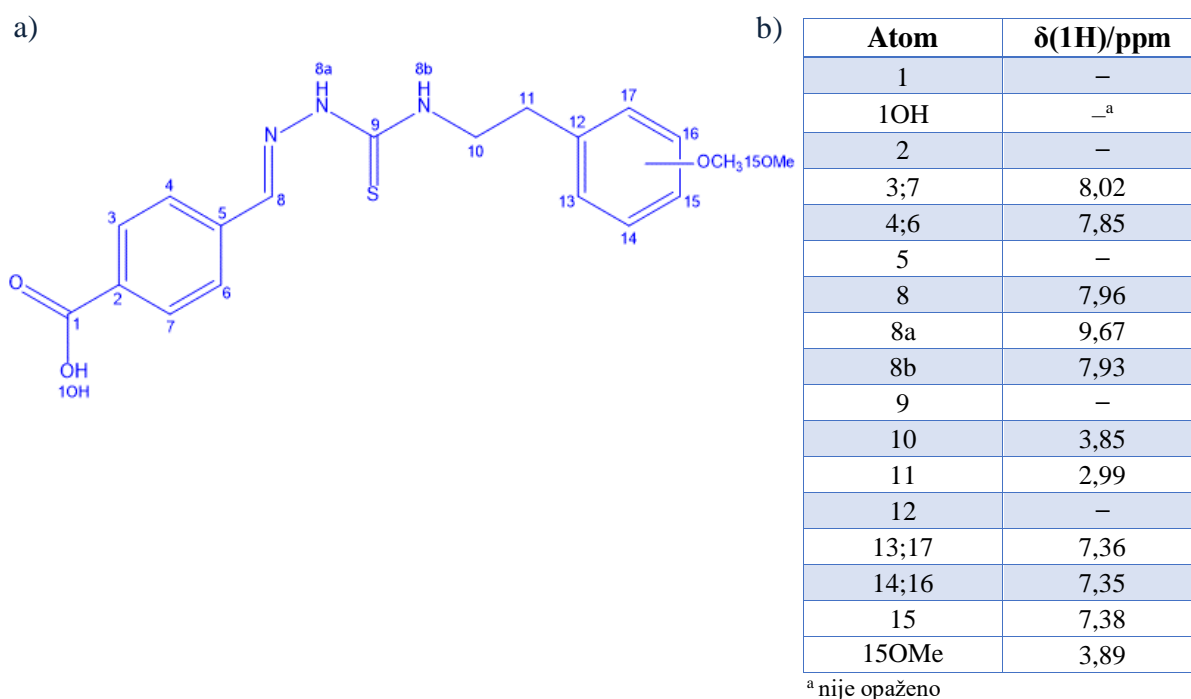
Signali onečišćenja Imp RRT 0,515 u spektru 1H NMR (Dodatak, Slika D28.) u potpunosti se preklapaju sa signalima 2-feniletil tiosemikarbazida, no u spektru onečišćenja prisutan je dodatni singlet pri 3,89 ppm koji bi mogao odgovarati metoksi-skupini vezanoj na benzenski prsten. Položaj metoksi-skupine nije moguće odrediti samo na temelju spektara 1H i COSY, već bi trebalo snimiti spektre HSQC i HMBC, što u našem slučaju nije bilo moguće zbog niske koncentracije izoliranog onečišćenja. Spektar MS onečišćenja dao je molekulski ion $m/z = 373$ (Slika 4.15.). Spektar COSY za onečišćenje Imp RRT 0,515 prikazan je na slici 4.14., a predložena struktura spoja nalazi se na Slici 4.16.



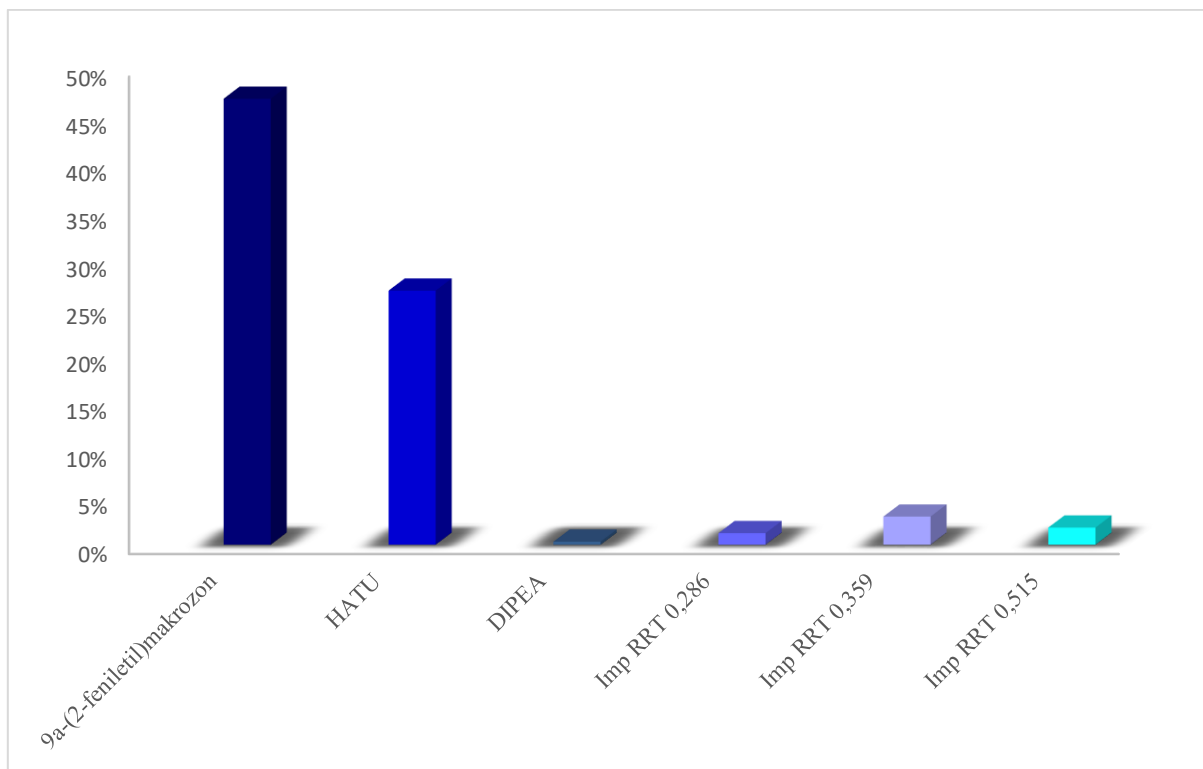
Slika 4.14. Spektar COSY onečišćenja Imp RRT 0,515 snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



Slika 4.15. Spektar ESI-MS onečišćenja Imp RRT 0,515.

Slika 4.16. a) Predložena struktura; b) kemijski pomaci ^1H onečišćenja Imp RRT 0,515 snimljeni u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.

Iz reakcijske smjese uspješno je izolirano i identificirano 6 spojeva: 9a-(2-feniletil)makrozon, 2 polazne kemikalije korištene u sintezi 9a-(2-feniletil)makrozona i 3 nova spoja. Udio identificiranih spojeva određen metodom normalizacije pikova u reakcijskoj smjesi 9a-(2-feniletil)makrozona prikazan je na Slici 4.17.



Slika 4.17. Udio (%) određen metodom normalizacije pikova identificiranih spojeva u reakcijskoj smjesi 9a-(2-feniletil)makrozona.

§ 5. ZAKLJUČAK

Istraživanja u sklopu ovog diplomskog rada pokazala su da je vezani sustav LC-SPE/NMR prikladna metoda za istraživanje profila čistoće (engl. *impurity profiling*) novog azitromicinskog konjugata – 9a-(2-feniletil)makrozona. Kako bi se osigurala uspješnost analize potrebno je optimirati uvjete kromatografskog odjeljivanja, skladištenja uzorka na sustavu SPE i snimanja spektara NMR.

U ovom istraživanju istražena je učinkovitost ekstrakcije glavne komponente i odabranih onečišćenja na SPE-nosače u svrhu dobivanja kvalitetnih spektara NMR. Novosintetizirani makrozon pokazao je dobro zadržavanje na nepolarnoj čvrstoj fazi SPE-nosača baziranoj na silika materijalu (C-18), dok se veći broj polarnih onečišćenja zadržao bolje na polimernim SPE-nosačima (Resin SH). Uz to, učinkovitost ekstrakcije polarnih onečišćenja bila je bolja uz veći dodatni protok vodene faze.

Na temelju snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR i MS predložene su strukture nepoznatih spojeva reakcijske smjese. Pokazalo se da su uspješno izolirana onečišćenja reakcijske smjese strukturno slična 2-feniletil tiosemikarbazidu koji se koristi kao polazni reaktant u sintezi 9a-(2-feniletil)makrozona.

Provedeno istraživanje dalo je uvid u strukture onečišćenja na brži i učinkovitiji način od standardnih metoda *off-line*, koristeći pritom znatno manje količine uzorka i otapala, a automatizirana tehnika LC-SPE/NMR pokazala se kao vrlo učinkovit vezani sustav za odjeljivanje te identifikaciju reaktanata, produkata i nepoznatih onečišćenja iz reakcijske smjese, što je neophodan dio razvoja i istraživanja svakog novog lijeka.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN	–	acetonitril
ADC	–	pretvarač analognog u digitalni signal, engl. <i>Analog to Digital Converter</i>
COSY	–	korelacijska spektroskopija, engl. <i>Correlation Spectroscopy</i>
DCM	–	diklormetan
DMSO	–	dimetil-sulfoksid
DIPEA	–	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
FT-NMR	–	nuklearna magnetna rezonancija uz Fourierovu transformaciju, engl. <i>Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance</i>
HATU	–	1-(bis(dimetilamino)metilen)-1H-1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat
HMBC	–	engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	–	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS	–	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - masena spektrometrija, engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
HSQC	–	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICH	–	međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova, engl. <i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
LC	–	tekućinska kromatografija, engl. <i>Liquid Chromatography</i>
LC-SPE-NMR	–	tekućinska kromatografija - ekstrakcija na čvrstoj fazi - nuklearna magnetna rezonancija, engl. <i>Liquid Chromatography - Solid-Phase Extraction - Nuclear Magnetic Resonance</i>
MS	–	spektrometrija masa, engl. <i>Mass Spectrometry</i>

NMR	–	nuklearna magnetna rezonancija, engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	–	spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta, engl. <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
rRNA	–	ribosomska ribonukleinska kiselina, engl. <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
S/N	–	omjer signala prema šumu, engl. <i>Signal to Noise ratio</i>
SPE	–	ekstrakcija na čvrstoj fazi, engl. <i>Solid-Phase Extraction</i>
STD	–	metode razlike prijenosa zasićenja, engl. <i>Saturation Transfer Difference</i>
STD-NMR	–	Nuklearna magnetna rezonancija uz metodu razlike prijenosa zasićenja, engl. <i>Saturation Transfer Difference - Nuclear Magnetic Resonance</i>
UPLC-ESI-MS	–	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti - elektroraspršenje - masena spektrometrija, engl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry</i>
WATERGATE	–	supresija signala vode pomoću pobude gradijentima, engl. <i>Water suppression by Gradient - Tailored Excitation</i>
WET	–	supresija signala vode pojačana pomoću efekata T1, engl. <i>Water suppression Enhanced through T1 effects</i>

§ 7. LITERATURNI IZVORI

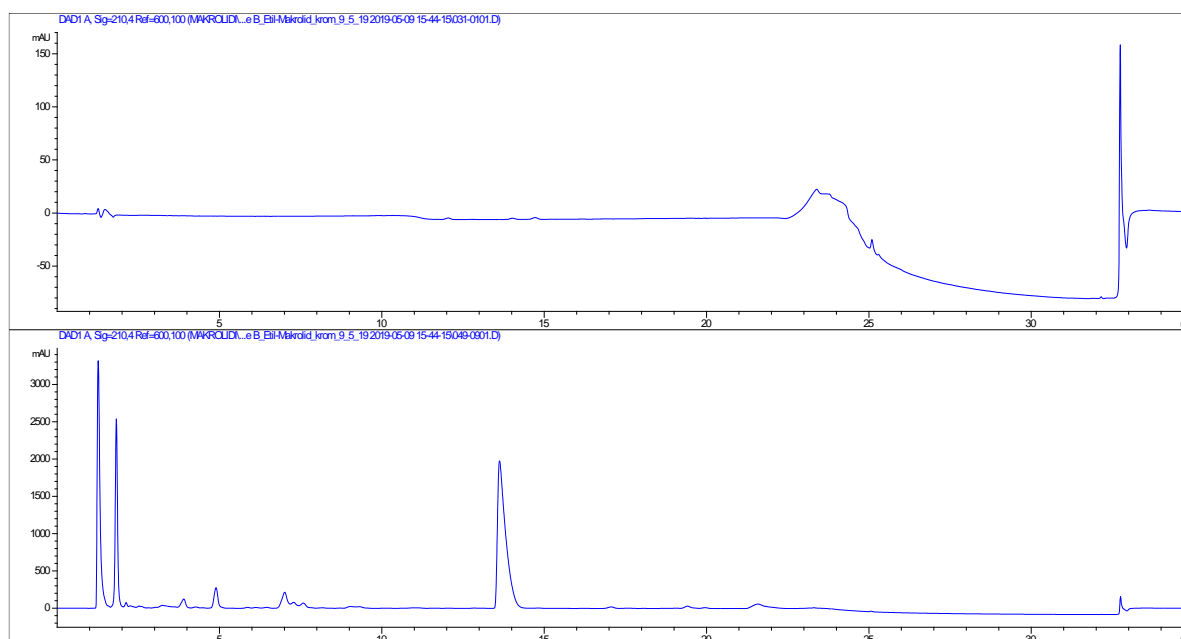
1. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 2048–163.
2. M. Harča, I. Habinovec, E. Meštrović, I. Biljan, P. Novak, *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 543–547.
3. M. Bukvić Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša and N. Kujundžić, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 853–856.
4. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides, Properties, Santhesis and applications*, De Gruyter, Berlin, 2019, str. 1–30.
5. I. Mikulandra, M. Facković, A. Lulić, I. Habinovec, N. Benčić, M. B. Krajačić, I. Grgičević, T. Jednačak, M. Cindrić, P. Novak, Synthesis and characterization of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates, 26. Hrvatski sastanak kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, 2019, Book of abstracts, str. 93.
6. I. Habinovec, N. Benčić, M. Bukvić Krajačić, I. Grgičević, I. Mikulandra, T. Jednačak, P. Novak, LC-SPE/NMR analysis of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates, 26. Hrvatski sastanak kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, 2019, Book of abstracts, str. 88.
7. I. Habinovec, P. Novak, N. Benčić, I. Mikulandra, A.-M. Lulić, I. Grgičević, M. Bukvić, K. Zangger, Determination of ethly-phenyl macrozone reaction mixture components by LC-SPE/NMR methodology, Adriatic NMR, Mali Ston, 2019, Book of abstracts, str. 61.
8. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018., str. 63–77.
9. J. M. Zuckerman, *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **18** (2004) 621–649.
10. T. Sugimoto, T. Tanikawa, K. Suzuki, Y. Yamasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 5787–5801.
11. Moselio Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, Cambridge, 2009, str. 529–558.
12. *Macrolide Drugs Market by Drug Type (14-membered ring agents, 14-membered ring agents, 15-membered ring agents (Azalides), 16-membered ring agents, and Ketolides), By Distribution Channels (Hospital pharmacies, Clinics, Hospitals, Retail pharmacies,*

- and Online pharmacies): Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis and Forecast, 2018–2024*, Zion Market Research, New York, 2018.
13. G. M. Bright, A. A. Nagel, J. Bordner, K. A. Desai, J. N. Dibrino, J. Nowakowska, L. Vincent, R. M. Watrous, F. C. Sciavolino, A. R. English, J. A. Retsema, M. R. Anderson, L. A. Brennan, R. J. Borovoy, C. R. Cimochoowski, J. A. Faiella, A. E. Girard, D. Girard, C. Herbert, M. Manousos, *R. Mason, J. Antibiot.* **41** (1988) 1029–1047.
 14. Z. B. Tomišić, *Kem. Ind.* **60** (2011) 603–617.
 15. G. Kobrehel, G. Radobolja. Z. Tamburašev, S. Đokić, *11-aza-10-deoxo-10-dihydroerythromycin A and derivatives thereof as well as a process for their preparation*, U.S. Patent 4328334, 1982.
 16. G. Kobrehel, S. Đokić, *11-methyl-11-aza-4-O-cladinosyl-6-O-desosaminyl-15-ethyl-7,13,14-trihydroxy-3,5,7,9,12,14-hexamethyl-oxacyclopentadecane-2-one and derivatives thereof*, U.S. Patent 4517359, 1985.
 17. S. Djokić, G. Kobrehel, G. Lazarevski, N. Lopotar, Z. Tamburašev, B. Kamenar, A. Nagl, I. Vicković, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **0** (1986) 1811–1890.
 18. M. J. Parnhama, V. E. Haber, E. J. Giamarellos-Bourboulis, G. Perletti, G. M. Verleden, R. Vos, *Pharm. Therap.* **143** (2014) 225–245.
 19. R. Berisio, N. Corti, P. Pfister, A. Yonath, E. C. Böttger, *Antimicrob. Agents Chemother.* **50** (2006) 3816–3823.
 20. <https://mediately.co/hr/drugs/aQPITcP1LVaaxVGsw01z6hpthgN/azitromicin-belupo-500-mg-filmom-oblozene-tablete> (datum pristupa 5. kolovoza 2019.)
 21. P. Novak, J. Barber, A. Cikos, B. Arsic, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Kosutic-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
 22. P. Novak, I. Tatic, P. Tepes, S. Kostrun, J. Barber, *J. Phys.Chem.* **110** (2006) 572–579-
 23. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165–173.
 24. A. I. Matesanz, P. Souza, *Mini-Rev. Med. Chem.* **9** (2009) 1389–1396.
 25. K. Pičuljan, *Struktura i vodikove veze derivata tiosemikarbazona u otopini*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 5–10.
 26. P. Heffeter, V. F.S. Pape, É. A. Enyedy, B. K. Keppler, G. Szakacs, C. R. Kowol, *Antiox. Redox Signal.* **30** (2019) 1062–1082.
 27. S. Arora, S. Agarwal, S. Singhal, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6** (2014) 34–41.
 28. D. S. Kalinowski, P. Quach, D. R. Richardson, *Future Med. Chem.* **1** (2009) 1143–1151.

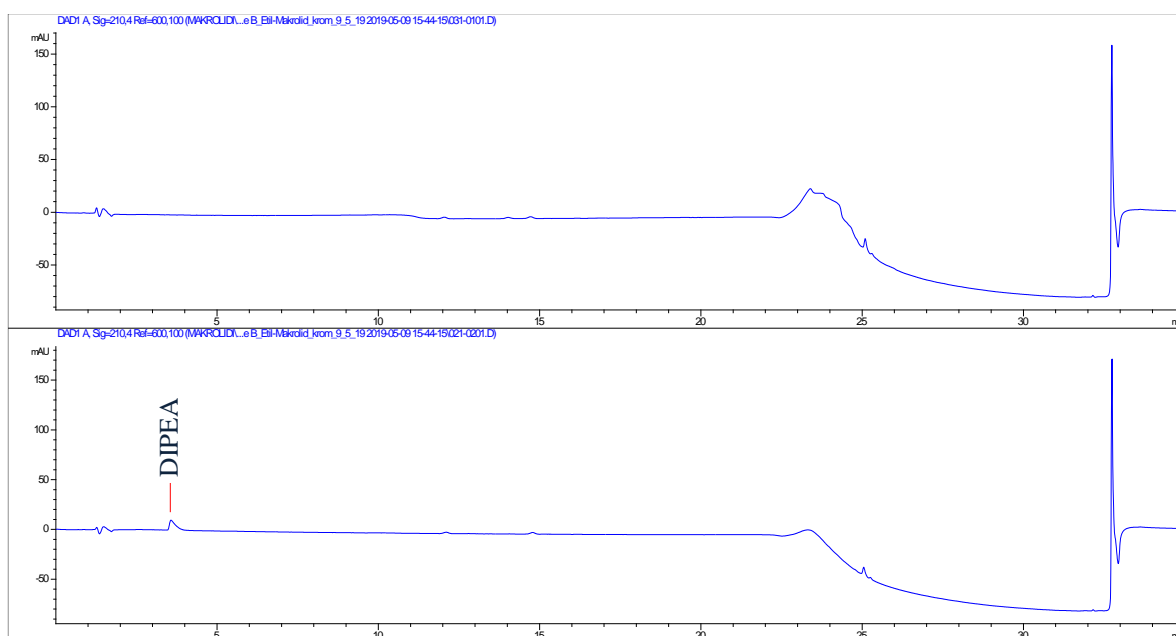
29. D. Palanimuthu, R. Poon, S. Sahni, R. Anjum, D. Hibbs, H.-Y. Lin, P. V. Bernhardt, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Eur. J. Med. Chem.* **139** (2017) 612–632.
30. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz and F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
31. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak and N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3459–3470.
32. A. Gatti, b, M. Carcelli, D. Rogolino, A. Habtemariam, I. Romero-Canelón, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, XLIV Congresso Nazionale di Chimica Inorganica, Padova, 2016, Book of abstracts, str. 57.
33. A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parson, I. D. Oswald, A. Parkin, F. P. Fabbiani, J. E. Davidson, A. Dawson, R. E. Aird, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 6858–6868.
34. M. A. Soares, M. A. Almeida, C. Marins-Goulart, O. A. Chaves, A. Echevarria, M. C. C. de Oliveira, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27** (2017) 3546–3550.
35. B. Nigović, M. Sertić, *Farmaceutski glasnik: glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva*, **68** (2012) 77–88.
36. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualiti-guidelines.html> (datum pristupa 18. kolovoza 2019.)
37. P. Venkatesan, K. Valliappan, *J. Pharm. Sci. & Res.* **6** (2014) 254–259.
38. R. M. Maggio, N. L. Calvo, S. E. Vignaduzzo, T. S. Kaufman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 102–22.
39. M. Sandvoss, B. Bardsley, T. L. Beck, E. Lee-Smith, S. E. North, P. J. Moore, A. J. Edwards, R. J. Smith, *Magn. Reson. Chem.* **43** (2005) 762–770.
40. C. Clarkson, M. Sibumb, R. Mensenb, J. W. Jaroszewski, *J. Chromatogr. A* **1165** (2007) 1–9.
41. I. Habinovec, *Sprengnute tehnike u analizi metabolita lijekova*, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
42. T. Gebretsadik, W. Linert, M. Thomas, T. Berhanu, R. Frew, *Sci* **1** (2019) 31–46.
43. G. Miliauskas, T. A. van Beek, P. de Waard, R. P. Venskutonis, E. J. R. Sudholter, *J. Chromatogr. A* **1112** (2006) 276–284.
44. P. Novak, *Kem. Ind.* **53** (2014) 441–447.

45. I. R. Capistrano, A. Wouters, K. Foubert, A. M. Balde', S. Apers, F. Lardon, L. Pieters, V. Exarchou, *Phytochem. Lett.* **12** (2015) 119–124.
46. J.-L. Wolfender, M. Litaudon, D. Touboul, E. F. Queiroz, *Nat. Prod. Rep* **36** (2019) 855–868.
47. M. Hefny Gad, E. Tuenter, N. El-Sawi, S. Younes, E.-M. El-Ghadban, K. Demeyer, L. Pieters, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, *Phytochem. Anal.* **29** (2018) 5–15.
48. J. W. Jaroszewski, *Planta Med.* **71** (2005) 795–802.
49. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 148–173.
50. M. Godejohann, Li-Hong Tseng, U. Braumann, J. Fuchser, M. Spraul, *J. Chromatogr. A* **1058** (2004) 191–196.
51. I. Habinovec, P. Novak, *Metodologija LC-SPE-NMR – Primjena u analizi bioaktivnih molekula i lijekova*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019., Knjiga sažetaka, str. 10.
52. I. Habinovec, T. Jednačak, P. Novak, *ADMET & DMPK* **3** (2015) 352–358.
53. P. Novak, P. Tepeš, M. Ilijaš, I. Fistrić, I. Bratoš, Amir Avdagić, V. Gabelica Marković and M. Dumić, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 68–72.
54. S. Görög, *Trends Anal. Chem.* **101** (2018) 2–6.
55. N. P. Barton, H. Hobbs, S. T. Hodgson, Y. M. L. Lacroix, P. A. Procopiou, *CC. Chemokine receptor 4 antagonists*, Patent Int. Appl. 2012025473, 2012.
56. S. Erturk, E. S. Aktas, L. Ersoy, S. Ficicioglu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33** (2003) 1017–1023.

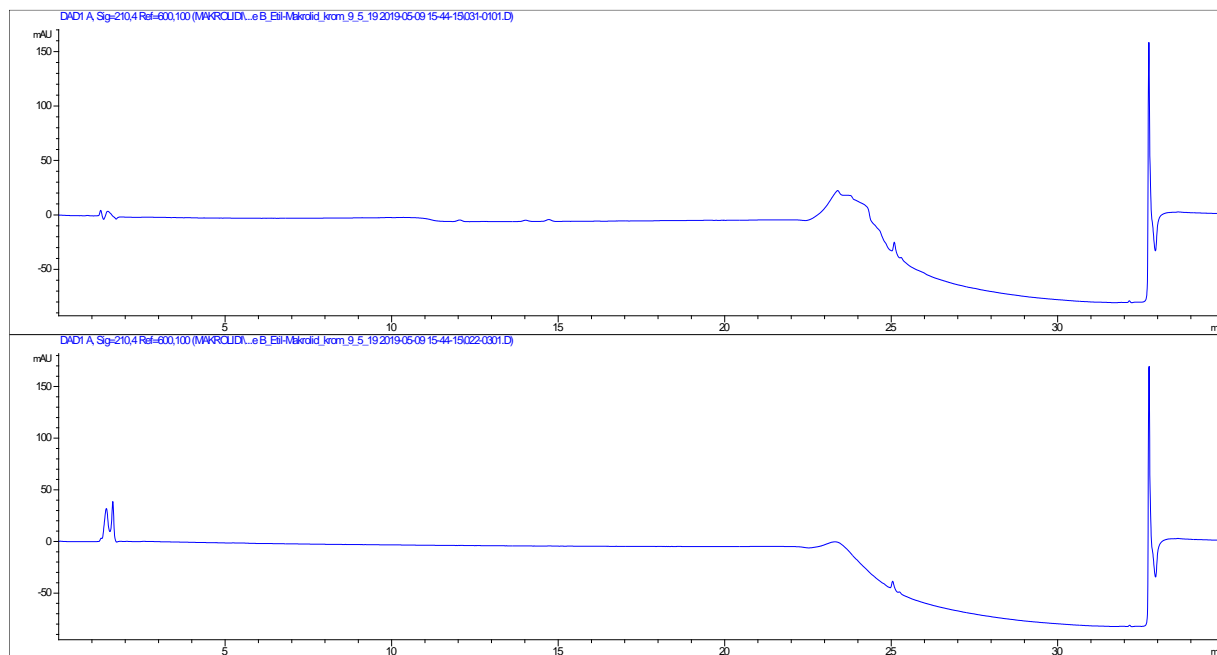
§ 8. DODATAK



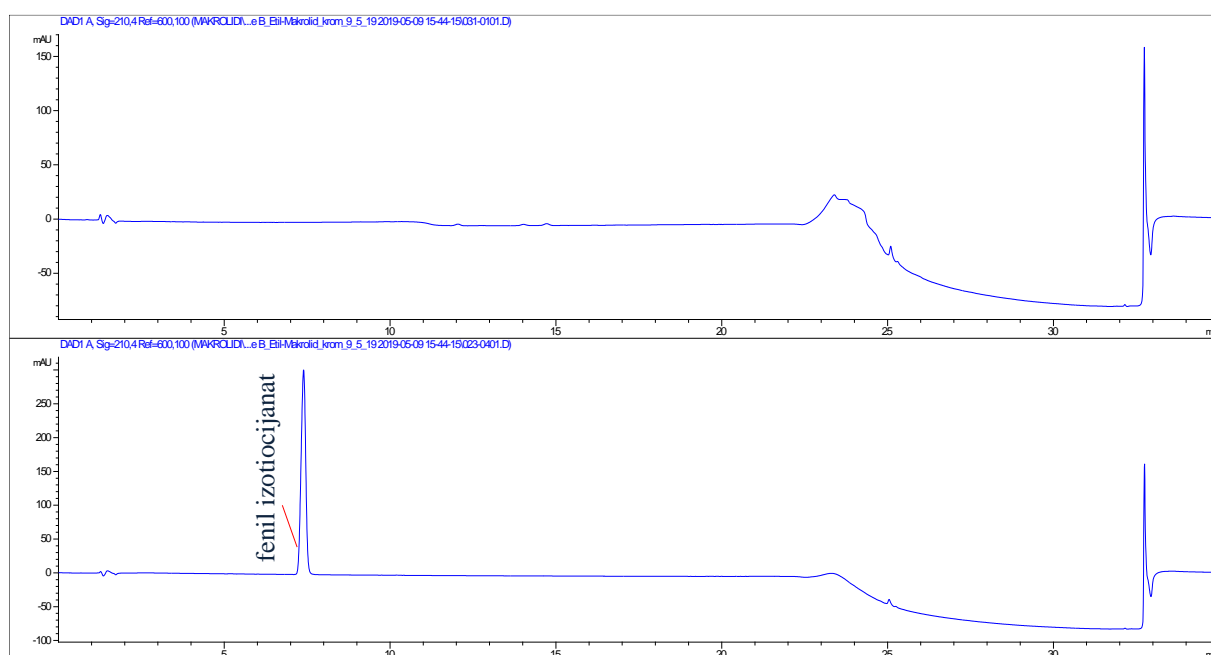
Slika D1. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i reakcijske smjese 9a-(2-feniletil)makrozona ($\gamma = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



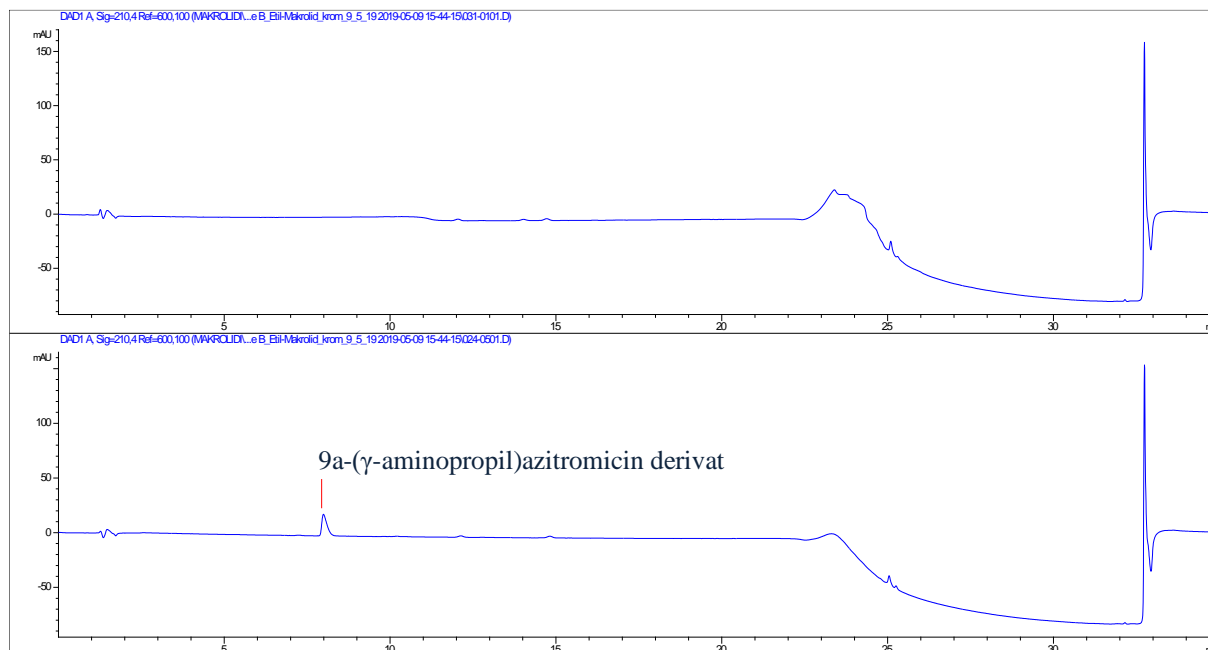
Slika D2. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i DIPEA-e ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



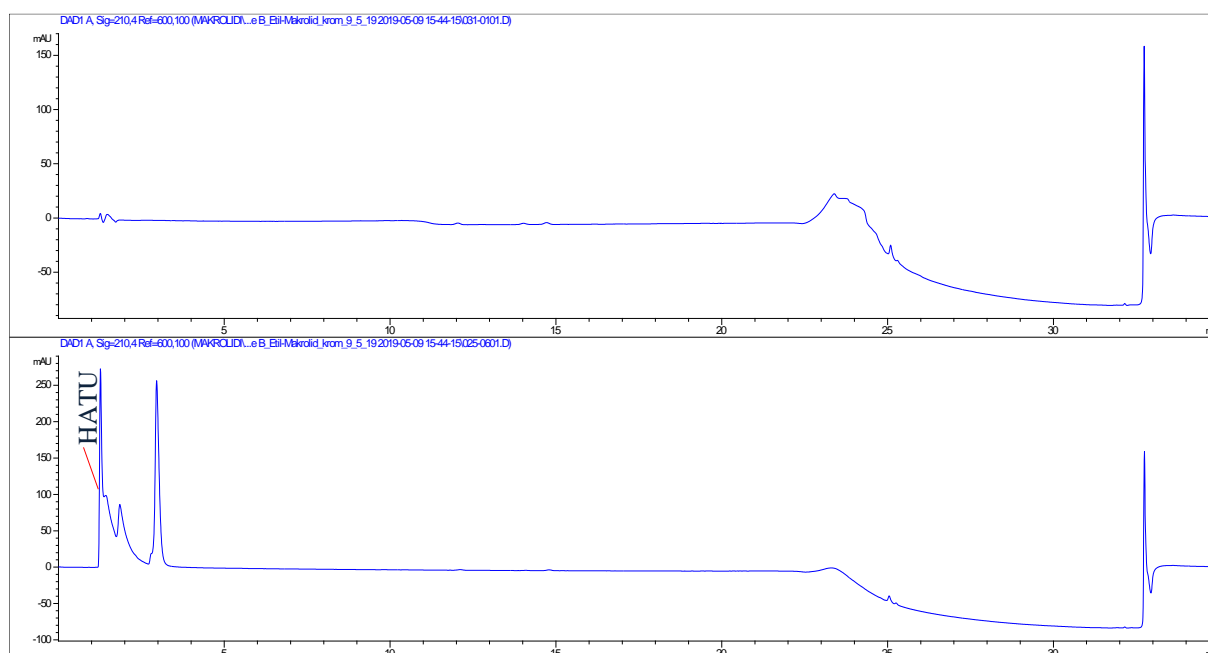
Slika D3. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i hidrazin monohidrata ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



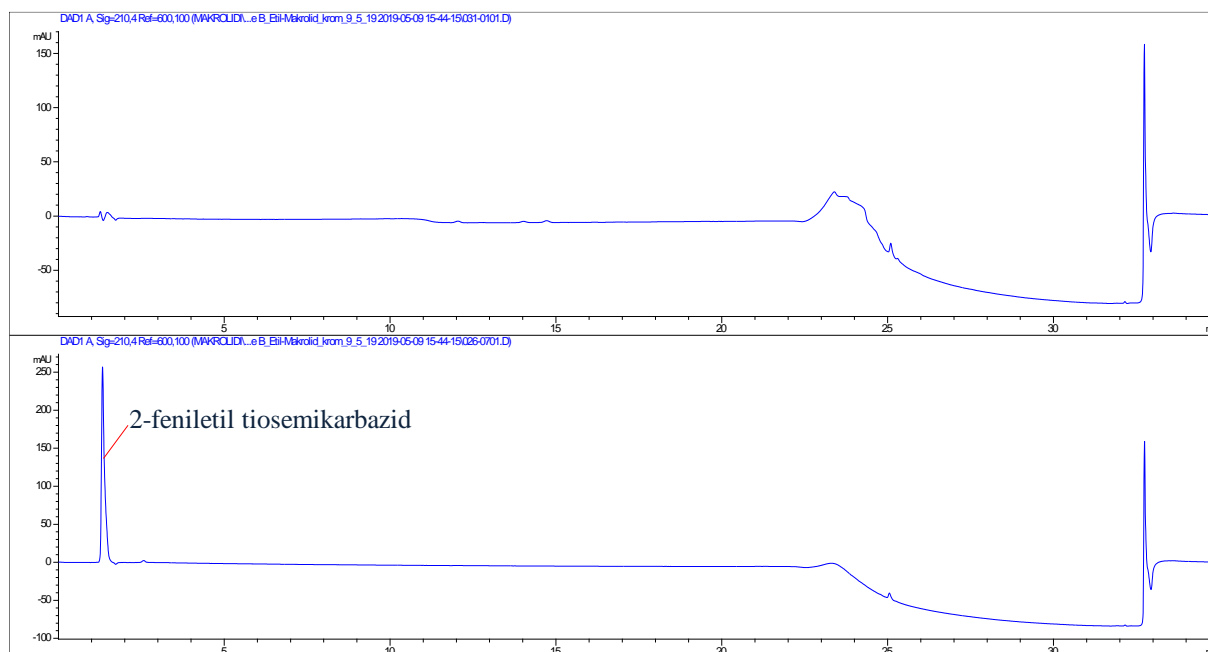
Slika D4. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i fenil izotiocijanata ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



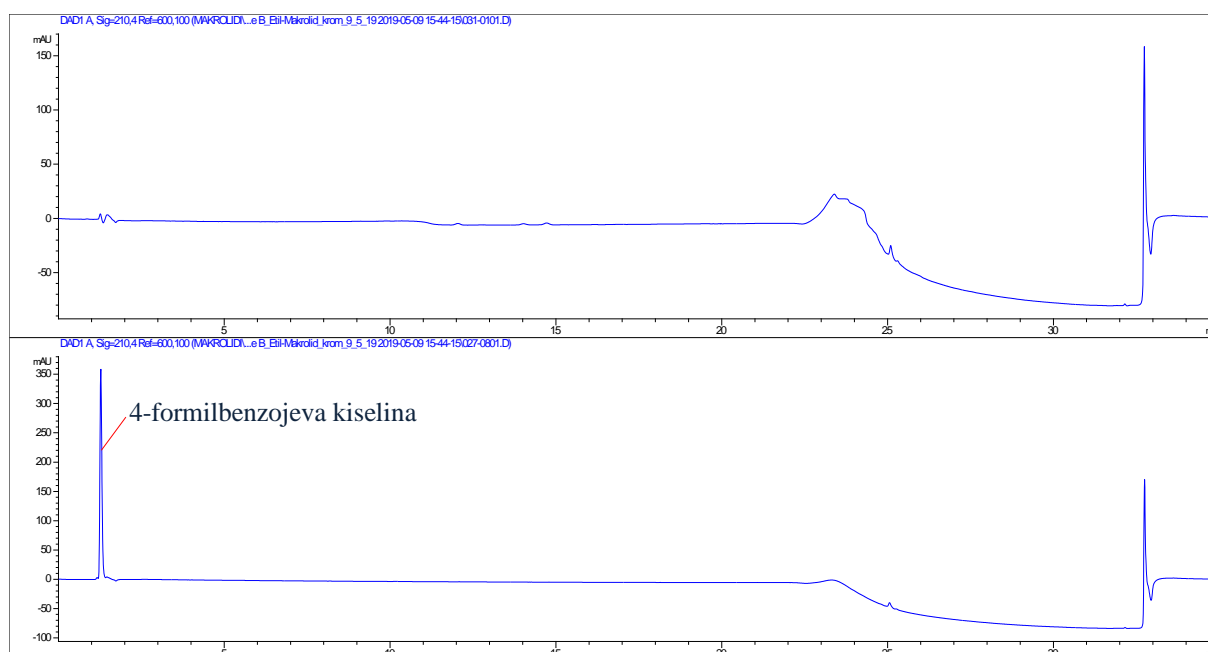
Slika D5. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i 9a-(γ -aminopropil)azitromicin derivat ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



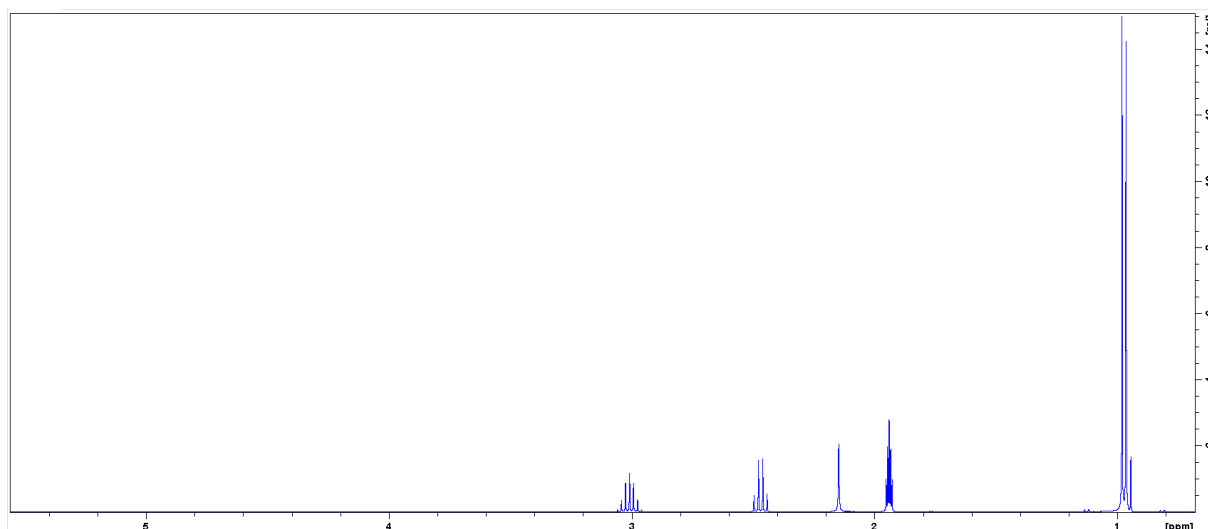
Slika D6. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i HATU-a ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



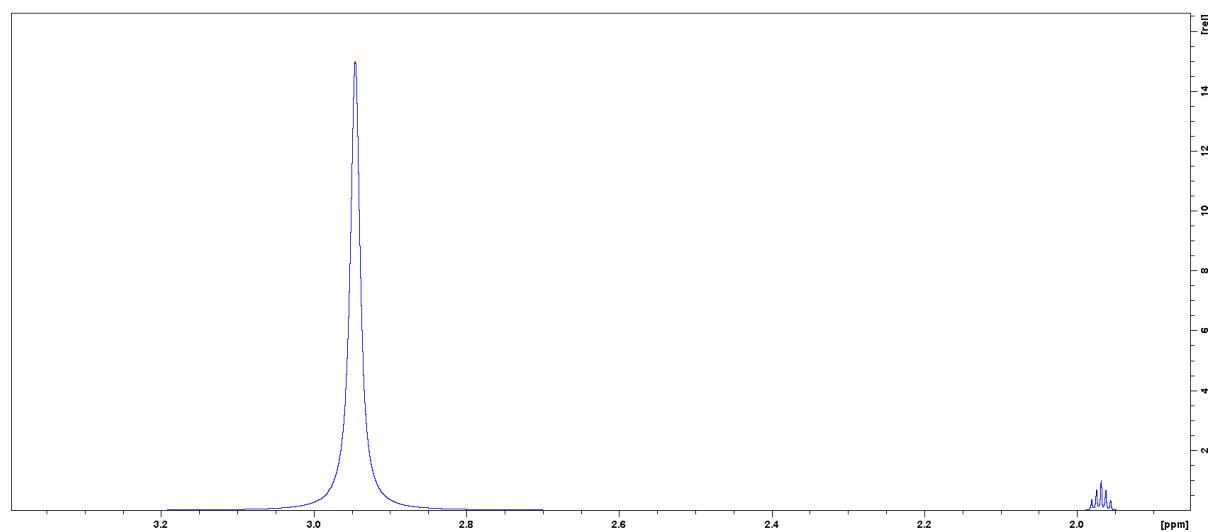
Slika D7. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i 2-feniletil tiosemikarbazida ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



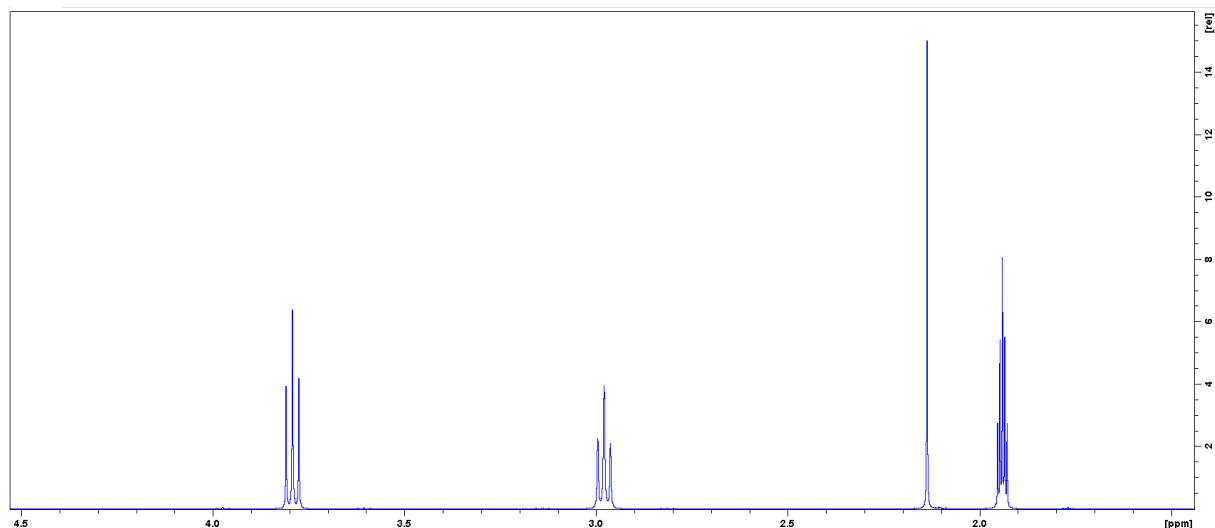
Slika D8. Kromatogram slijepe probe (acetonitril) i 4-formilbenzojeve kiseline ($\gamma = 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 3.2.



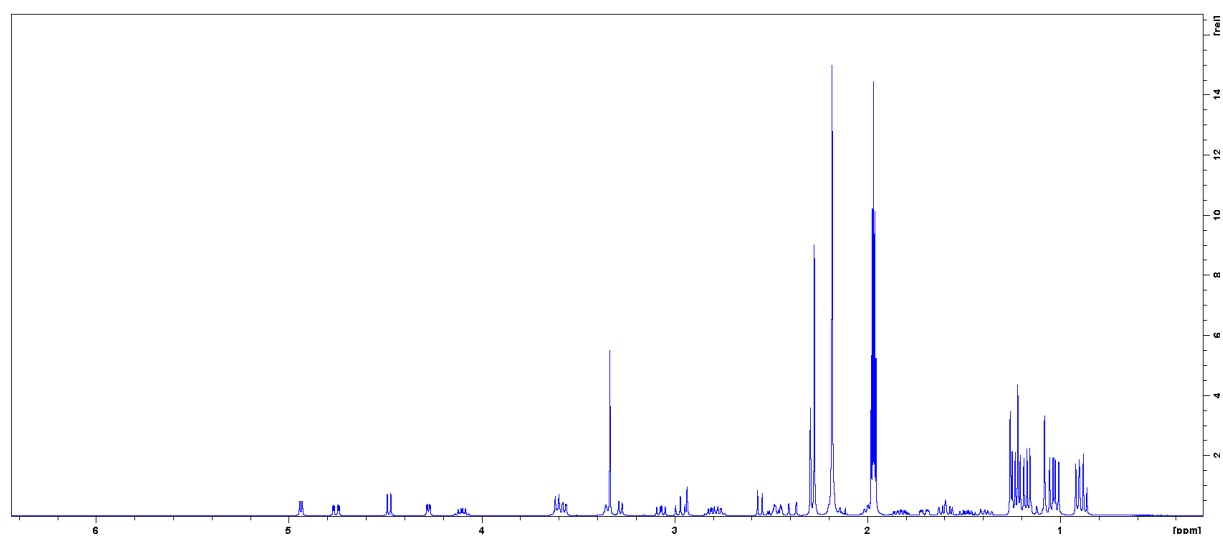
Slika D9. Spektar ^1H NMR DIPEA-e ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25°C .



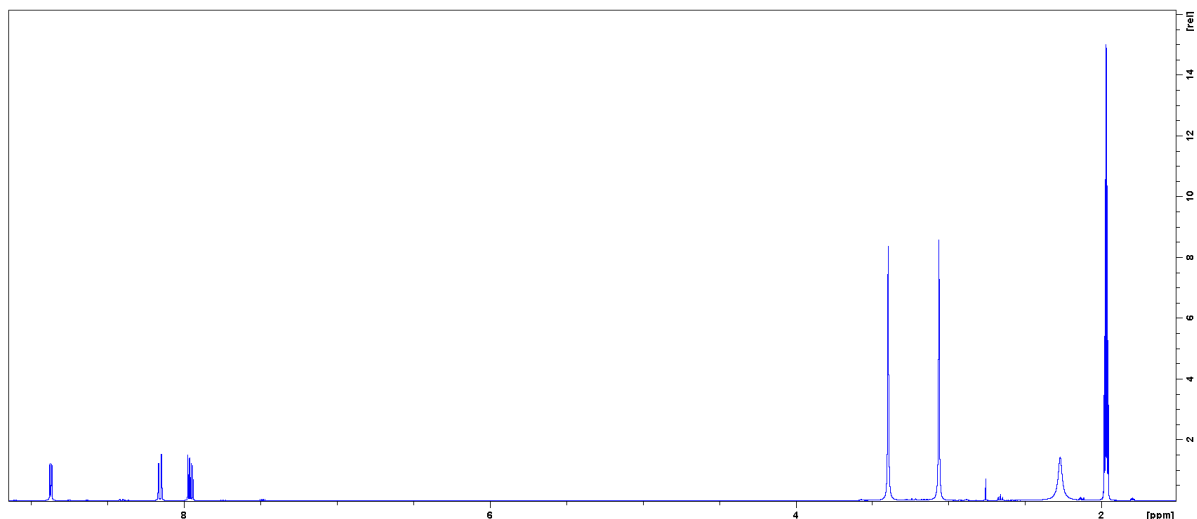
Slika D10. Spektar ^1H NMR hidrazin monohidrata ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25°C .



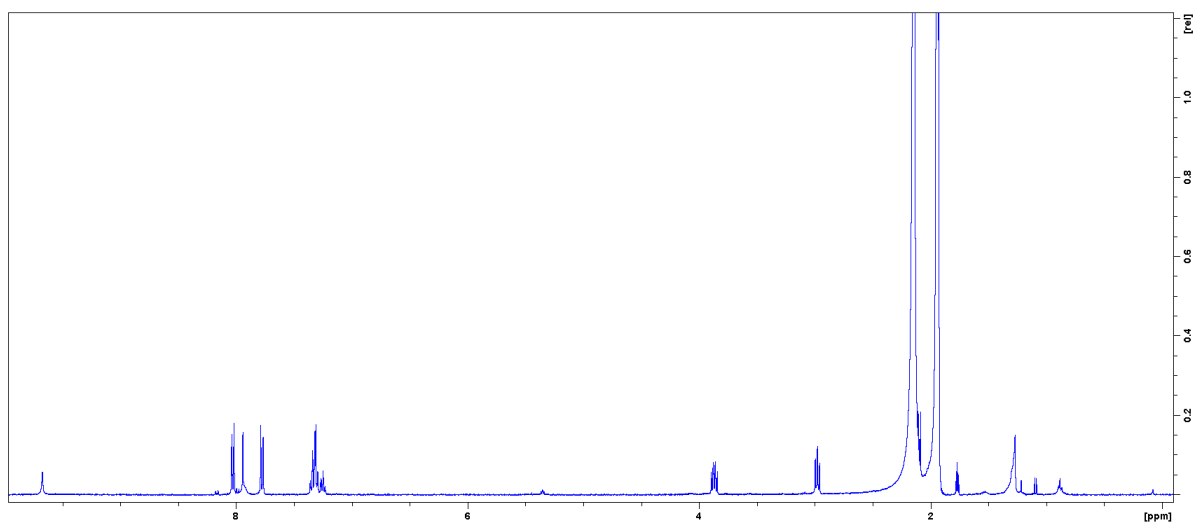
Slika D11. Spektar ¹H NMR fenil izotiocijanata ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



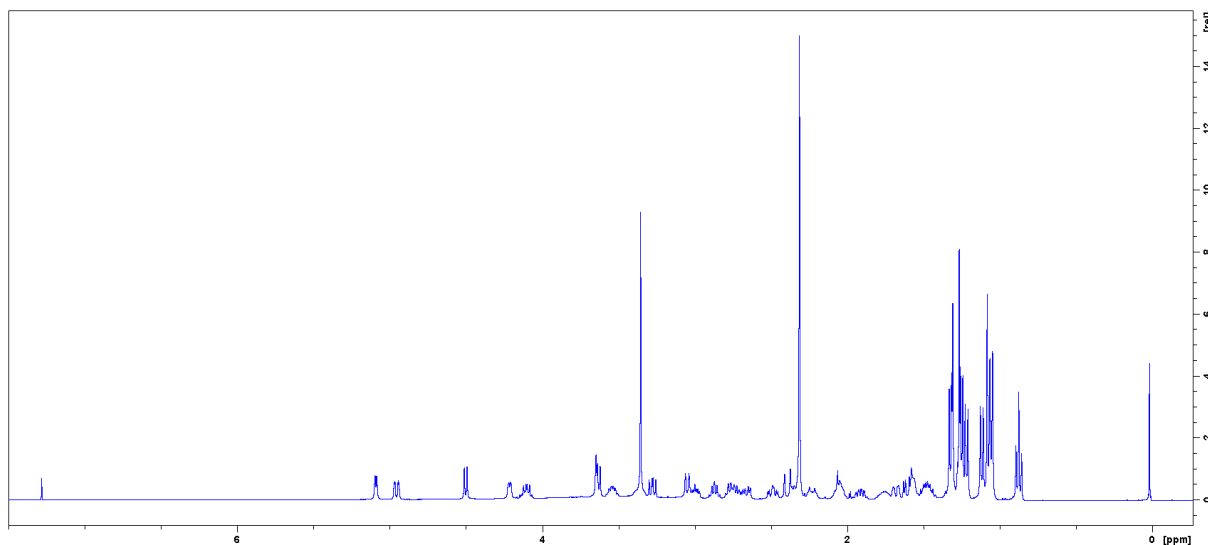
Slika D12. Spektar ¹H NMR azitromicina ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



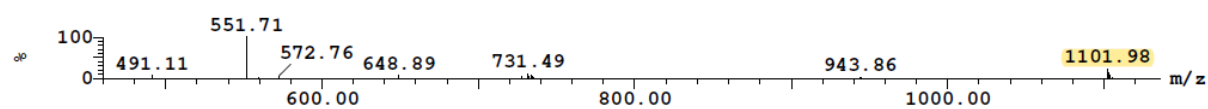
Slika D13. Spektar ¹H NMR HATU-a ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



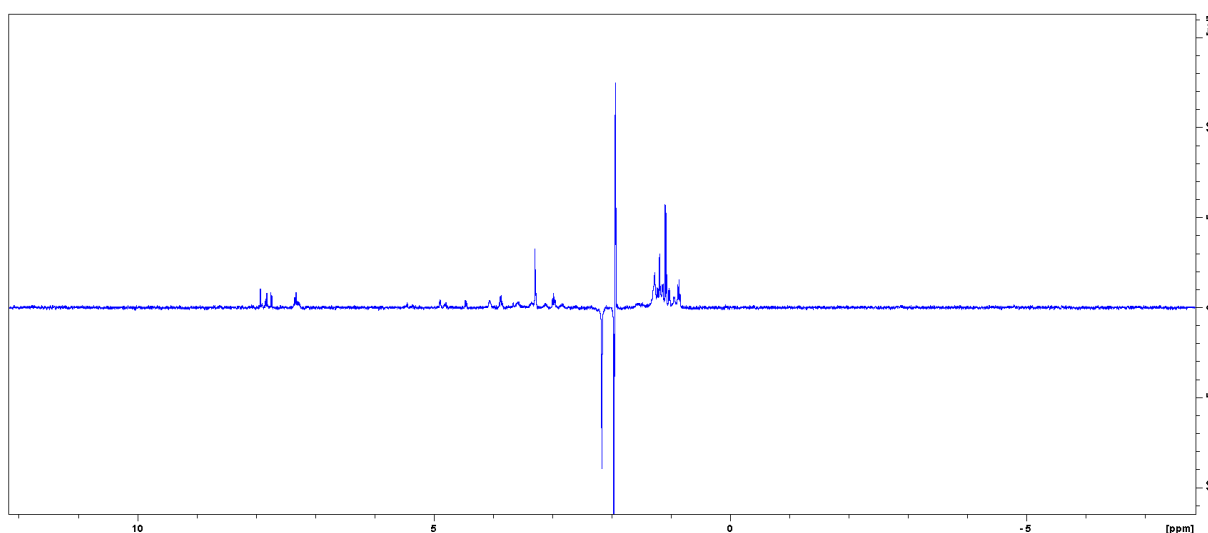
Slika D14. Spektar ¹H NMR 2-feniletil tiosemikarbazida ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



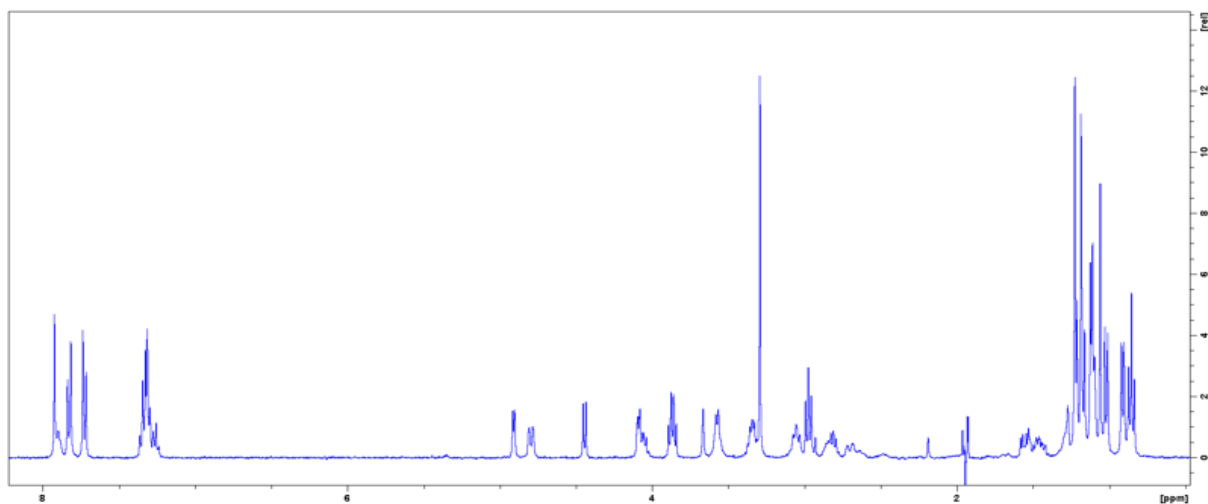
Slika D15. Spektar ¹H NMR 9a-(γ -aminopropil) derivata azitromicina ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



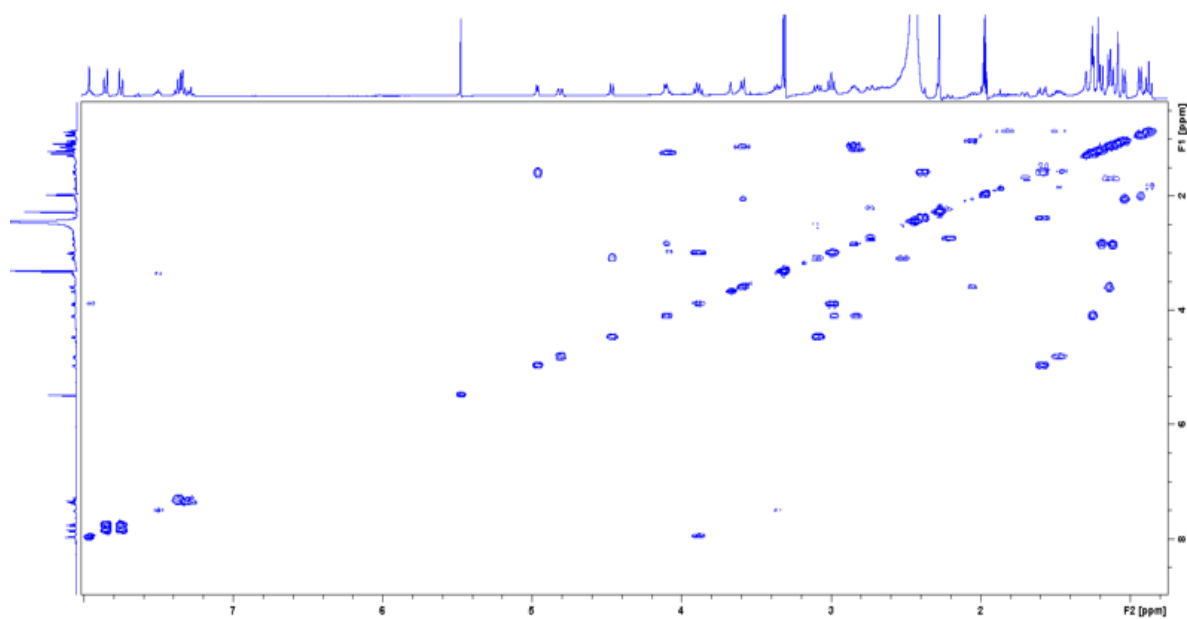
Slika D16. Spektar ESI-MS 9a-(2-feniletil)makrozona.



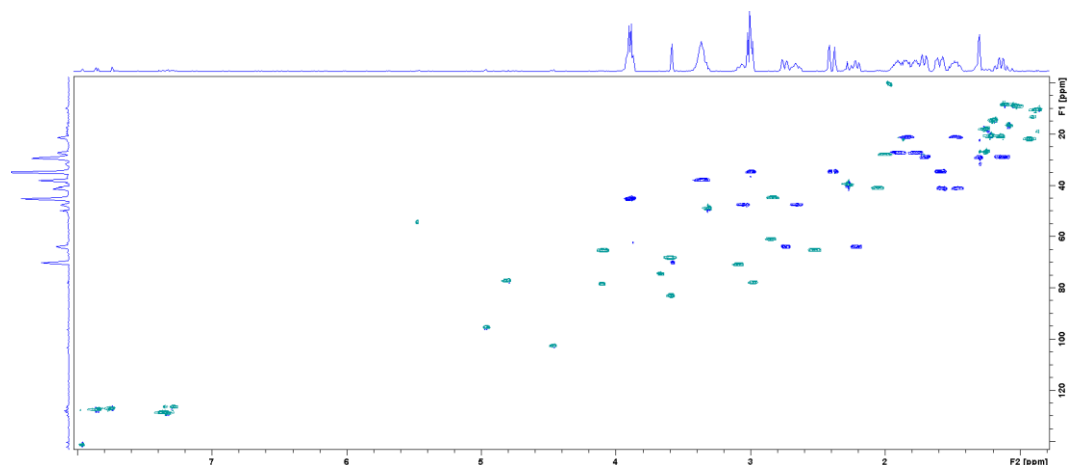
Slika D17. Spektar LC-SPE ¹H NMR izoliranog 9a-(2-feniletil)makrozona snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.



Slika D18. Uvećani prikaz spektra LC-SPE ^1H NMR izoliranog 9a-(2-feniletil)makrozona snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.

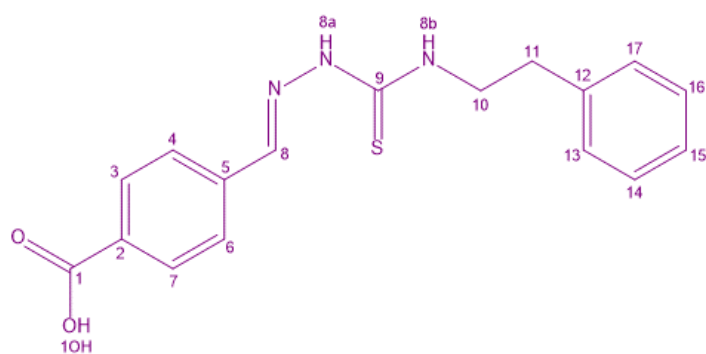


Slika D19. Spektar LC-SPE COSY izoliranog 9a-(2-feniletil)makrozona snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.



Slika D20. Spektar LC-SPE HSQC izoliranog 9a-(2-feniletil)makrozona snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.

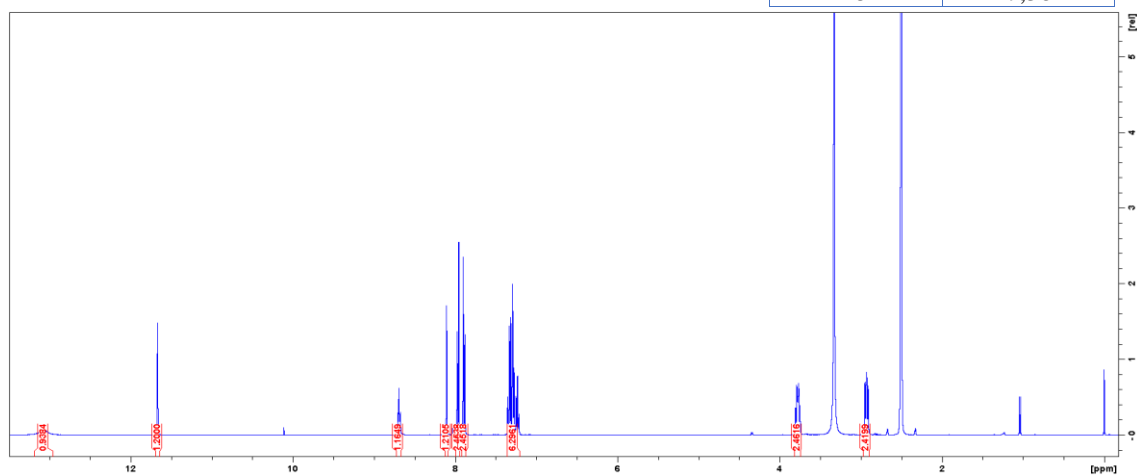
a)



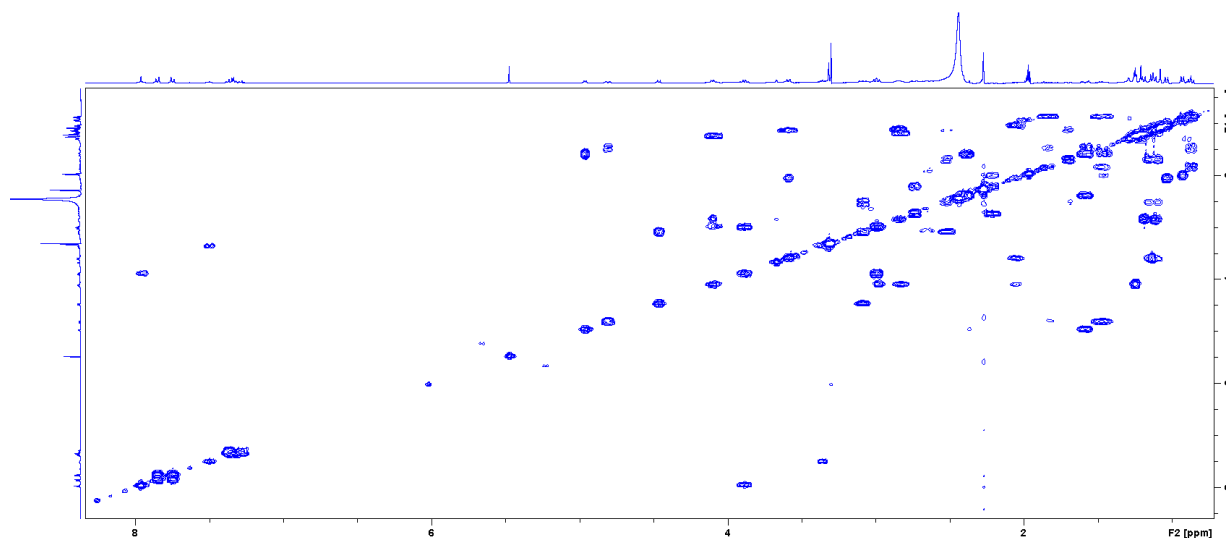
b)

Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$
1	–
1OH	13,12
2	–
3;7	8,02
4;6	7,85
5	–
8	7,96
8a	9,67
8b	7,93
9	–
10	3,89
11	2,99
12	–
13;17	7,36
14;16	7,35
15	7,38

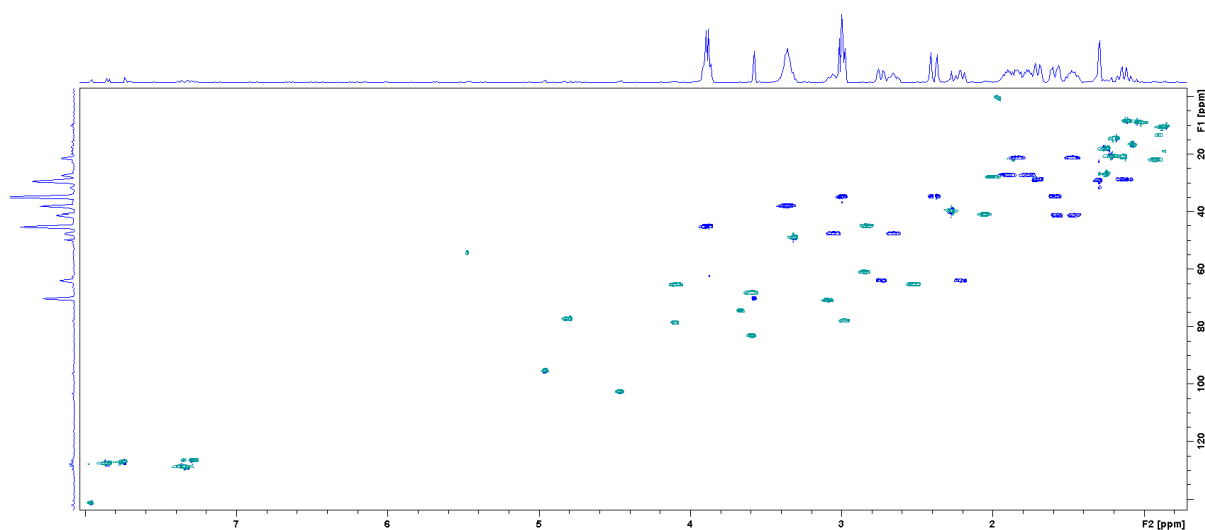
c)



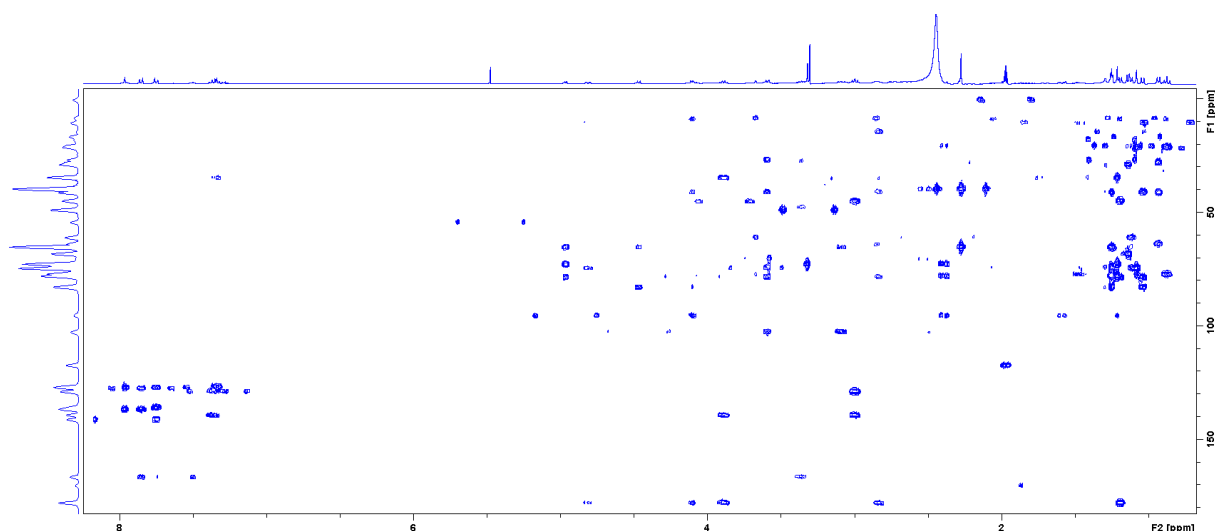
Slika D21. a) kemijska struktura; b) kemijski pomaci ^1H i c) spektar ^1H NMR 2-feniletil tiosemikarbazida ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u DMSO- d_6 pri 25 °C.



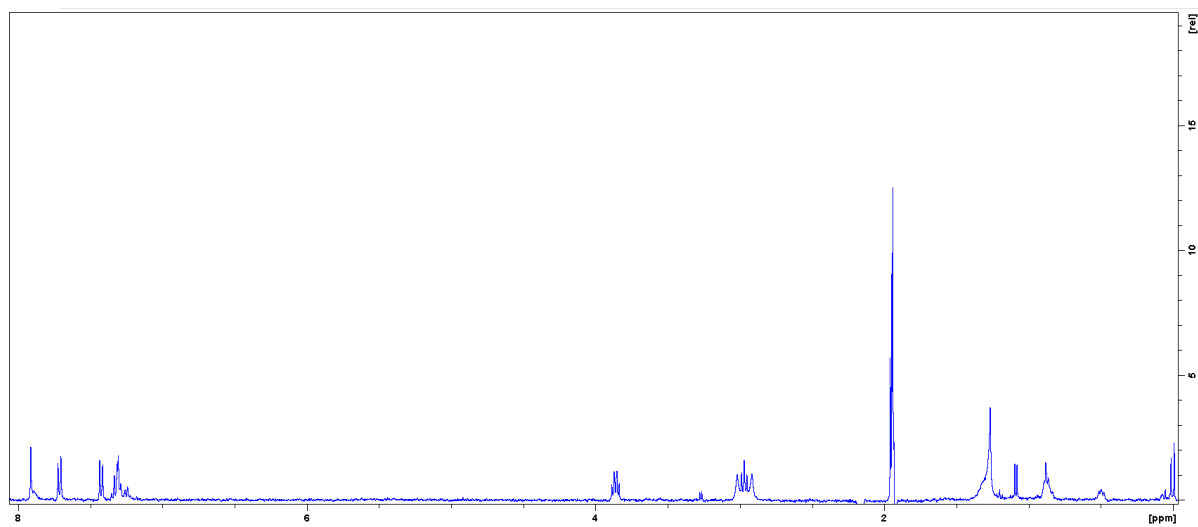
Slika D22. Spektar COSY 2-feniletil tiosemikarbazida ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u DMSO-*d*₆ pri 25 °C.



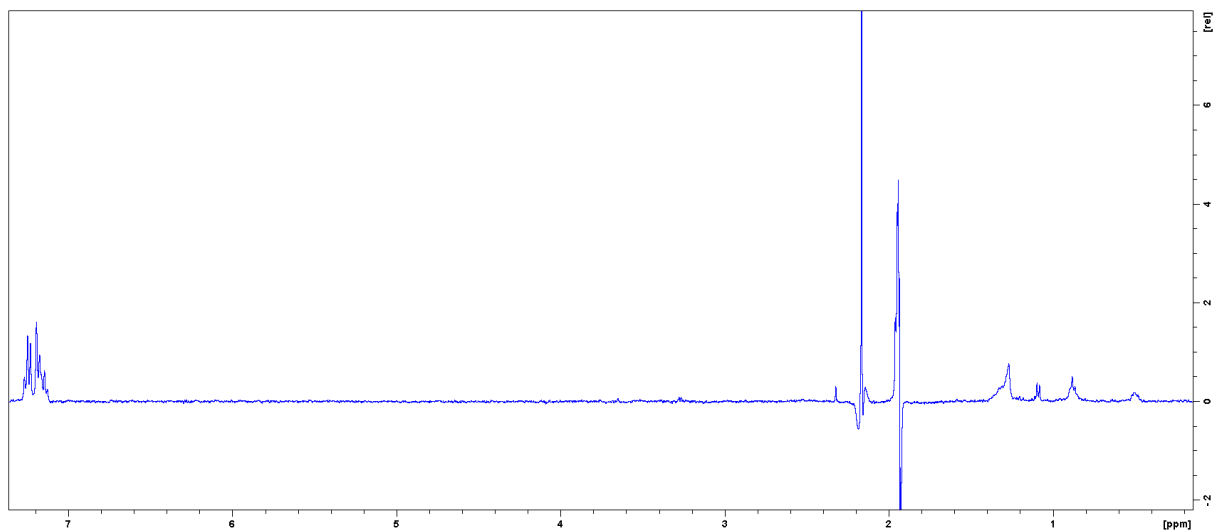
Slika D23. Spektar HSQC 2-feniletil tiosemikarbazida ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u DMSO-*d*₆ pri 25 °C.



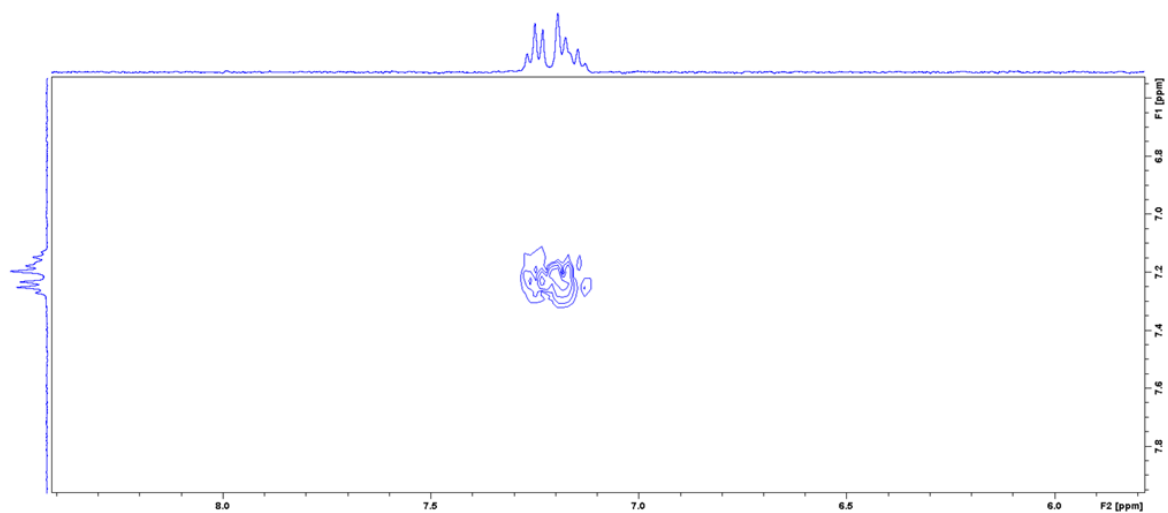
Slika D24. Spektar HMBC 2-feniletil tiosemikarbazida ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u DMSO- d_6 pri 25 °C.



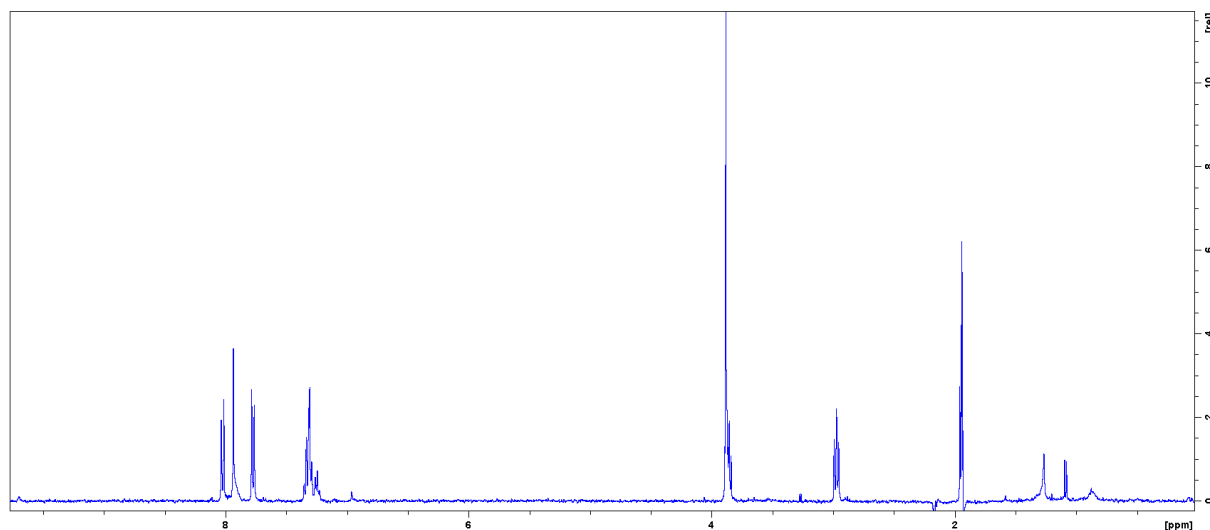
Slika D25. Spektar LC-SPE ^1H NMR onečišćenja Imp RRT 0,286 snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.



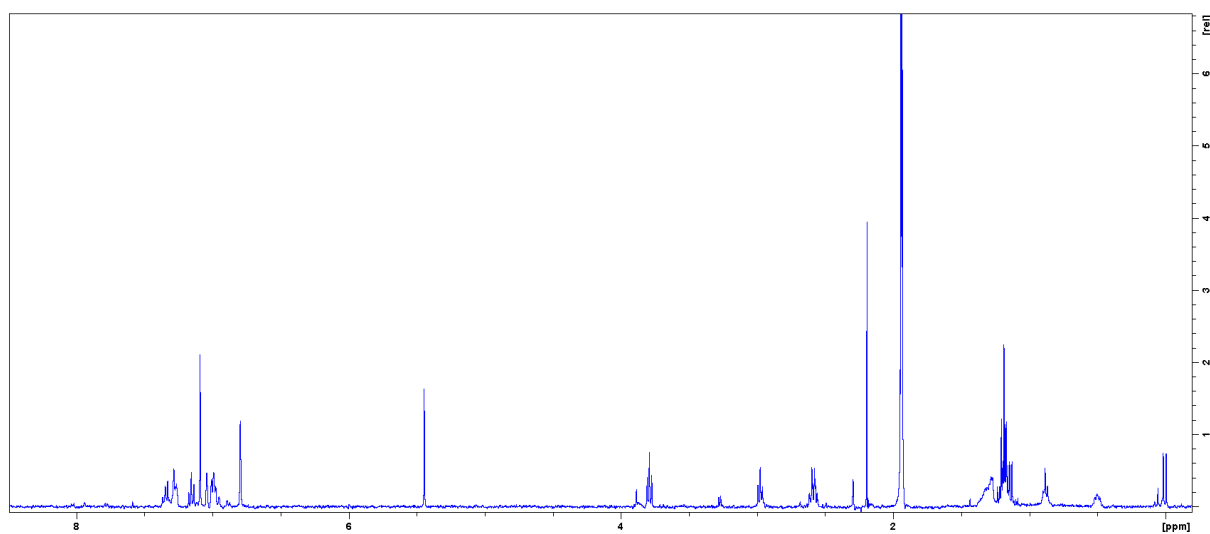
Slika D26. Spektar LC-SPE ^1H NMR onečišćenja Imp RRT 0,359 snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.



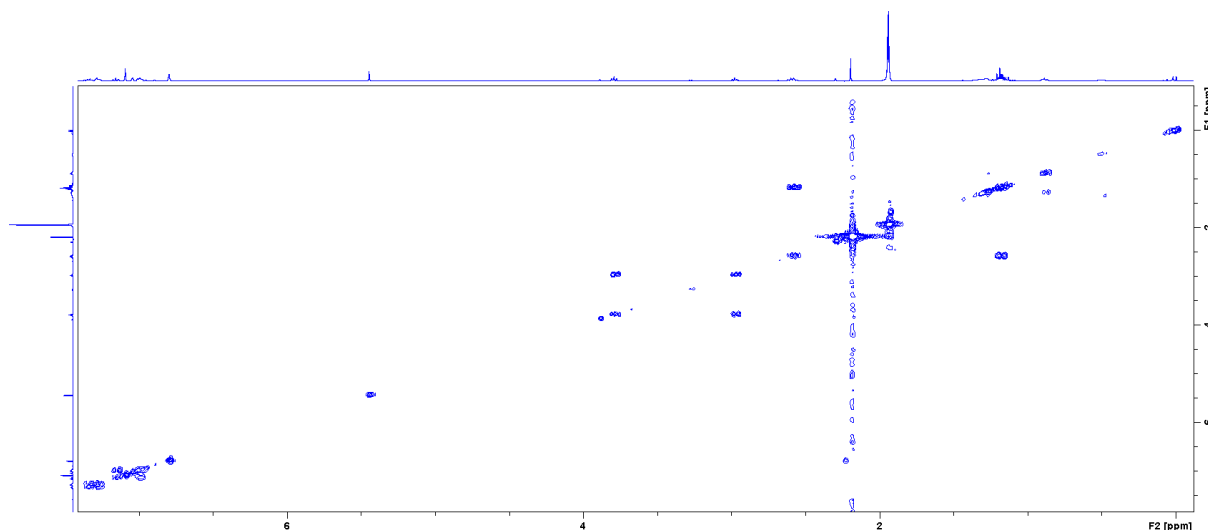
Slika D27. Spektar COSY onečišćenja Imp RRT 0,359 snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.



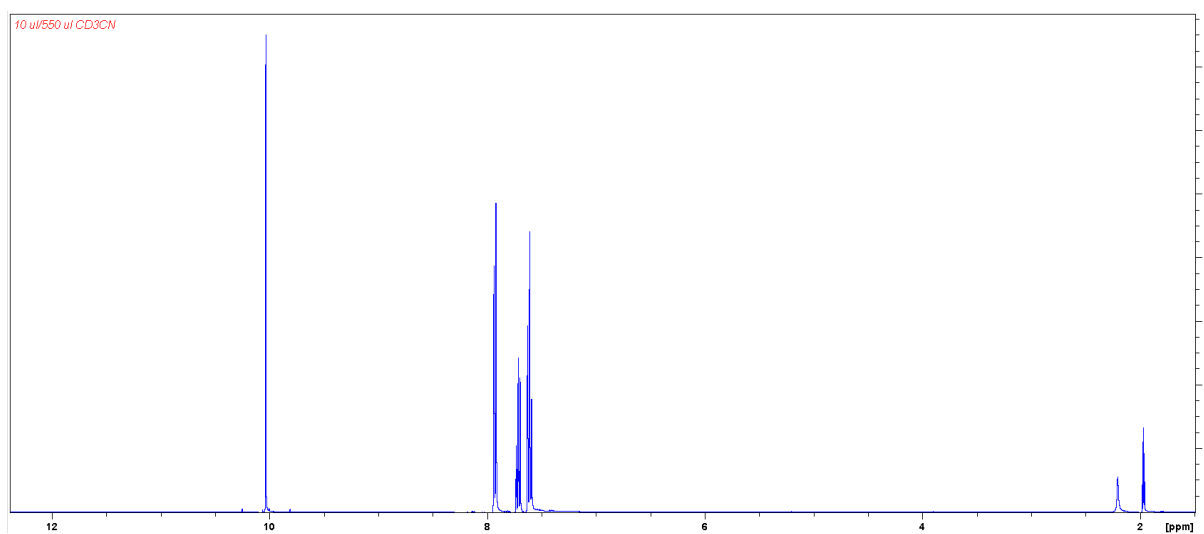
Slika D28. Spektar LC-SPE ^1H NMR izoliranog onečišćenja Imp RRT 0,515 snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.



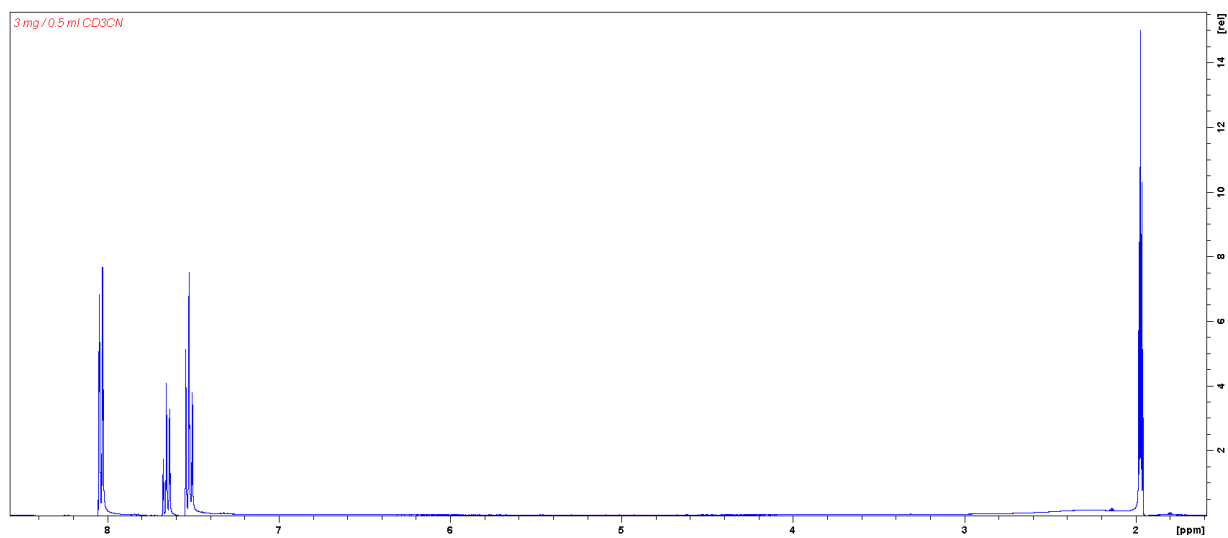
Slika D29. Spektar LC-SPE ^1H NMR izoliranog onečišćenja Imp RRT 0,557 snimljen u deuteriranom otapalu acetonitril- d_3 pri 25 °C.



Slika D30. Reprezentativni spektar LC-SPE COSY NMR izoliranog onečišćenja Imp RRT 0,557 snimljen u deuteriranom otapalu acetonitril- d_3 pri 25 °C.



Slika D31. Spektar ¹H NMR standarda benzaldehida ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 25 °C.



Slika D32. Spektar ¹H NMR standarda benzojeve kiseline ($\gamma = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Noelle Benčić

Datum rođenja: 26. rujna 1992.

Mjesto rođenja: Pula

Obrazovanje

1999.–2007. Osnovna škola Kaštanjer, Pula

2003.–2007. Glazbena škola Ivana Matetića Ronjgova, Pula

2007.–2011. Gimnazija Pula, Pula

2011.–2017. Preddiplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2017. Sveučilišna prvostupnica kemije sa završnim radom *Pregled instrumentnih analitičkih metoda pri utvrđivanju autentičnosti uzoraka hrane*

2017.–2019. Diplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2013. Posebna Rektorova nagrada u području Prirodnih znanosti

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. 6. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

2014. 7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

2015. 8. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. I. Habinovec, N. Benčić, M. Bukvić Krajačić, I. Grgičević, I. Mikulandra, T. Jednačak, P. Novak, LC-SPE/NMR analysis of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates,

- Adriatic NMR, Šibenik, 26. Hrvatski sastanak kemičara i kemijskih inženjera, 2019, Book of abstracts, str 88.
2. I. Mikulandra, M. Facković, A. Lulić, I. Habinovec, N. Benčić, M. B. Krajačić, I. Grgičević, T. Jednačak, M. Cindrić, P. Novak, Synthesis and characterization of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates, Šibenik, 26. Hrvatski sastanak kemičara i kemijskih inženjera, 2019, Book of abstracts, str 93.
 3. I. Habinovec, P. Novak, N. Benčić, I. Mikulandra, A.-M. Lulić, I. Grgičević, M. Bukvić, K. Zangger, determination of ethly-phenyl macrozone reaction mixture components by LC-SPE/NMR methodology, Adriatic NMR, Mali Ston, 2019, Book of abstracts, str 61.

Radno iskustvo

travanj 2018. – srpanj 2019. Rad u laboratoriju u Zavodu za analitičku kemiju
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u
Zagrebu