

# Priprava i karakterizacija benzil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il-, 2-naftil i p-trifluormetoksifenil- makrozona, novih konjugata makrolidnih antibiotika

---

Facković, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:240827>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Matea Facković

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA BENZIL-,  
BENZO-3,4-(1,3-DIOKSOLIL)-,  
METILTIOFEN-2-KARBOKSILAT-3-IL-,  
2-NAFTIL- I *p*-TRIFLUORMETOKSIFENIL-  
MAKROZONA, NOVIH KONJUGATA  
MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2020.



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

*Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na odabranoj temi i korisnim savjetima tijekom izrade rada.*

*Zahvaljujem neposrednoj voditeljici Ivi Habinovec, mag. chem. na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada, ugodnoj radnoj atmosferi te na vremenu i trudu uloženom na ispravak rada.*

*Zahvaljujem Ivani Mikulandri, mag. chem. na pomoći pri asignaciji spektara.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Željki Soldin na lektoriranju rada.*

*Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na pomoći pri imenovanju spojeva.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na iskazanoj podršci i ljubavi tijekom cijelog školovanja. Hvala vam što ste vjerovali u mene!*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Makrolidni antibiotici</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Eritromicin</i> .....	3
2.1.2. <i>Sinteza azitromicina</i> .....	6
2.1.3. <i>Sinteza i reakcije tiosemikarbazida</i> .....	8
<b>2.2. Derivati 15-eročlanih makrolida</b> .....	<b>12</b>
2.2.1. <i>Sinteza derivata azitromicina i (tio)ureje</i> .....	13
<b>2.3. Interakcije makrolida</b> .....	<b>16</b>
2.3.1. <i>Prijenosni nuklearni Overhauserov efekt (tr-NOE)</i> .....	16
2.3.2. <i>Metoda razlike prijenosa zasićenja (engl. Saturation Transfer Difference, STD)</i> .....	18
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. Materijali i metode</b> .....	<b>20</b>
3.1.1. <i>Opći postupak pripreve makrozona</i> .....	20
3.1.2. <i>Općeniti postupak pripreve tiosemikarbazona (N-arilhidrazin-karbotioamida)</i> .....	23
3.1.3. <i>Općeniti postupak pripreve tiosemikarbazida (4-((2-aril-karbamotioilhidraziniliden)metil)benzojeve kiseline)</i> .....	24
3.1.4. <i>Općeniti postupak pripreve makrozona</i> .....	26
3.1.5. <i>Pročišćavanje makrozona</i> .....	28
3.1.6. <i>Karakterizacija sintetiziranih spojeva</i> .....	29
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. Benzil-makrozon (f1)</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2. Benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozon (f2)</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3. Metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozon (f3)</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4. 2-naftil-makrozon (f4)</b> .....	<b>52</b>
<b>4.5. p-trifluorometoksifenil-makrozon (f5)</b> .....	<b>59</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>67</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	<b>68</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>69</b>
<b>§ 8. DODATAK</b> .....	<b>VII</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>XVIII</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA BENZIL-, BENZO-3,4-(1,3-DIOKSOLIL)-, METILTIOFEN-2-KARBOKSILAT-3-IL-, 2-NAFTIL I *p*-TRIFLUORMETOKSIFENIL-MAKROZONA, NOVIH KONJUGATA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

Matea Facković

Makrolidni antibiotici, kao što je azitromicin, imaju široku primjenu u liječenju infekcija dišnih puteva. Djeluju kao inhibitori sinteze proteina vežući se na bakterijsku ribosomsku podjedinicu 50S. Zbog povećane rezistencije bakterija javlja se potreba za razvojem novih, poboljšanih antibiotika. Dobru antibakterijsku aktivnost *in vitro* na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije pokazuju makrozoni, novi konjugati azitromicina i tiosemikarbazida. Konjugacijom 9a-( $\gamma$ -aminopropil) derivata azitromicina i novosintetiziranih tiosemikarbazida **e1-e5** pripravljeno je pet novih spojeva, **f1-f5**. Sintetizirani spojevi pročišćeni su kolonskom kromatografijom, a struktura im je određena na temelju snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR te spektara MS. Budućim istraživanjima ispitat će se biološka aktivnost pripremljenih spojeva.

(71+XVII stranica, 96 slika, 20 tablica, 21 literaturni navod, 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, makrolidni antibiotici, makrozoni, spektri NMR, tiosemikarbazidi, tiosemikarbazoni

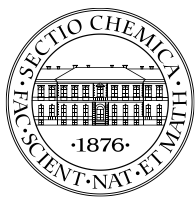
Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak  
Neposredni voditelj: Iva Habinovec, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
  2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivana Biljan

Datum diplomskog ispita: 13. veljače 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A BENZYL-, BENZO-3,4-(1,3-DIOXOLYL)-, METHYL-THIOPHENE-2-CARBOXYLATE-3-YL, 2-NAPHTHYL-, AND *p*-TRIFLUOROMETHOXY-PHENYL-MACROZONE, NEW CONJUGATES OF MACROLIDE ANTIBIOTICS

Matea Facković

Macrolide antibiotics, such as azithromycin, have been widely prescribed for the treatment of respiratory tract infections. They act as inhibitors of protein synthesis by binding to the bacterial ribosomal subunit 50S. Drug resistant microbial pathogens today represent a serious global problem that requires the discovery of new and more effective antimicrobial agents. Macrozones are novel conjugates of azithromycin and thiosemicarbazides that shows very good antibacterial activity. Five new compounds **f1-f5** were prepared by conjugation of the 9a-( $\gamma$ -aminopropyl) azithromycin derivative and the newly synthesized thiosemicarbazides **e1-e5**. The synthesized compounds were purified by column chromatography. The structures of novel macrozones were proposed on the basis of recorded one- and two-dimensional NMR spectra and the MS spectra, respectively.

(71+XVII pages, 97 figures, 20 tables, 21 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, macrolide antibiotics, macrozones, NMR spectra, thiosemicarbazides, thiosemicarbazones

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Assistant mentor: Iva Habinovec, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Full Professor
  2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
  3. Dr. Željka Soldin, Full Professor
- Substitute: Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor

Date of exam: 13<sup>th</sup> February 2020

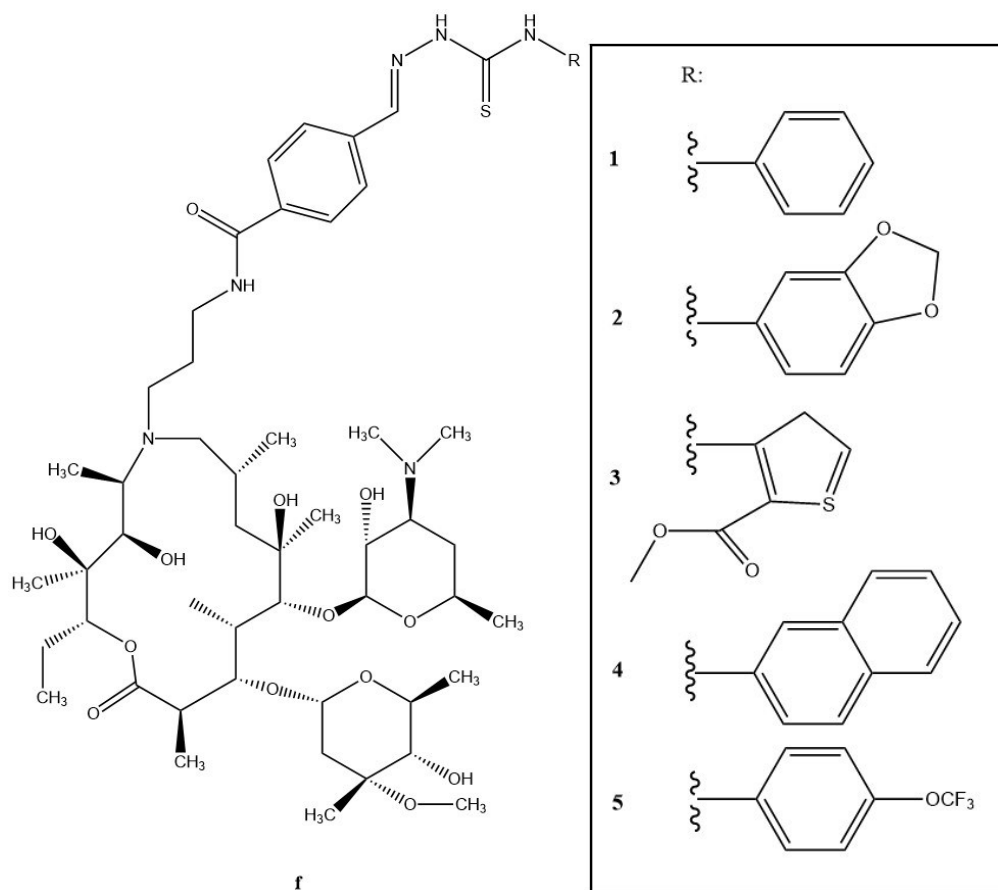


## § 1. UVOD

Bakterije pokazuju sve veću rezistenciju na postojeće antibiotike zbog čega se može povećati smrtnost čak i od običnih infekcija. Veliki potencijal za razvoj novih antibiotika pokazuju konjugati makrolidnih antibiotika. Makrolidni antibiotici, kao što je azitromicin, zbog svoje učinkovitosti imaju široku primjenu u liječenju infekcija dišnih puteva. Azitromicin je predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika nazvane azalidi zbog atoma dušika uvedenog u eritromicinski prsten. Zahvaljujući izrazito poboljšanim farmakokinetičkim i terapijskim svojstvima u odnosu na eritromicin, azitromicin je postao najpoznatiji i najčešće korišten antibiotik širokog spektra djelovanja. Unatoč tome, djelovanje antibiotika druge i treće generacije na Gram-negativne bakterijske sojeve, posebno na patogene dišnoga sustava, vrlo je slabo, stoga se javlja potreba za pripravom novih konjugata makrolidnih antibiotika.<sup>1</sup>

Makrozoni su novi konjugati azitromicina i derivata tiosemikarbazida koji pokazuju vrlo dobru antibakterijsku aktivnost *in vitro* na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Pokazalo se da tiosemikarbazoni i neki njihovi metalni kompleksi posjeduju protuinfektivne, protuupalne i protutumorske aktivnosti. Na tržištu su poznati antibiotici perklozon i tioacetazon koji se koriste u liječenju tuberkuloze.<sup>2-4</sup>

Cilj ovog diplomskog rada jest priprava i karakterizacija benzil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il-, 2-naftil- i *p*-trifluormetoksifenil-makrozona (Slika 1.). Spojevi će biti pripremljeni u nekoliko sintetskih koraka konjugacijom 9a-( $\gamma$ -aminopropil) derivata azitromicina s prethodno pripremljenim derivatima tiosemikarbazida. Pripremljeni makrozoni bit će izolirani kolonskom kromatografijom. Čistoća izoliranih spojeva bit će provjerena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Na temelju snimljenih jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR te spektara masa odredit će se strukture pripremljenih makrozona.



Slika 1. Strukturne formule novih pripremljenih makrozona **f1-f5**.

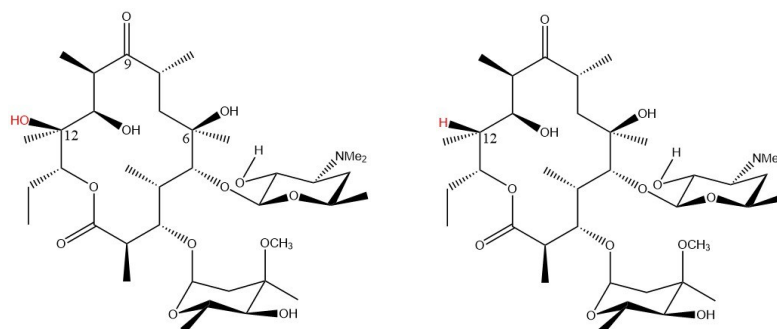
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici imaju širok spektar djelovanja. Djeluju kao inhibitori sinteze proteina tako da se vežu na bakterijsku ribosomsku podjedinicu 50S u ranoj fazi translacije. Klasificiraju se prema veličini makrocikličkog laktonskog prstena na 12-, 14-, 15- ili 16-eročlane prstenaste makrolide. Većina makrolida sadrži aminošećerne i/ili neutralne ostatke šećera koji su s laktonskim prstenom povezani glikozidnom vezom. Prvu generaciju čine prirodno pripremljeni spojevi, a to su: 12-eročlani melimicin, 14-eročlani pikromicin, eritromicin i oleandromicin te 16-eročlani karbomicin, neomicin i tilozin. Drugu generaciju čine polusintetski derivati kojima pripadaju 14-eročlani klaritromicin, roksitromicin, fluritromicin, diritromicin te 15-eročlani azitromicin.<sup>5-7</sup>

#### 2.1.1. Eritromicin

Eritromicin je najpoznatiji predstavnik prve generacije 14-eročlane skupine makrolida. Izoliran je 1950-ih godina iz mikroorganizma *Saccharopolyspora erythrea* koji se nalazi u tlu. Klinički su najpoznatiji eritromicin A i B koji se razlikuju u hidroksilnoj skupini na položaju atoma C12. (Slika 2.)



Slika 2. Strukturna formula eritromicina A i eritromicina B.

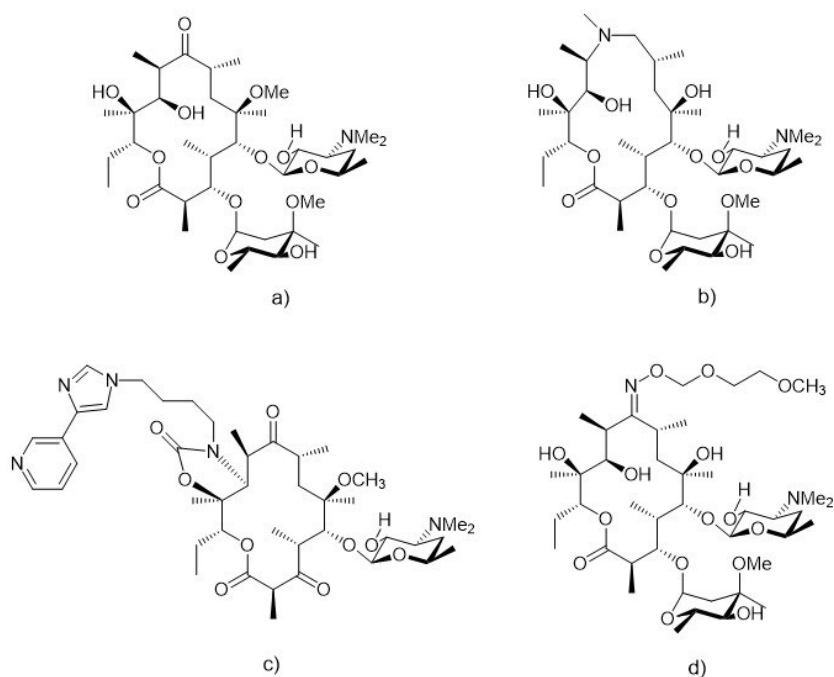
Zbog slabe biodostupnosti, nepredvidive farmakokinetike i niske stabilnosti u kiselom mediju razvijeni su novi derivati s poboljšanim svojstvima.

Klaritromicin, azitromicin, telitromicin i roksitromicin su polusintetski derivati eritromicina A. (Slika 3.)



Primarni način djelovanja im je sličan. Navedeni derivati vežu se na ribosomsku podjedinicu 50S i inhibiraju sintezu proteina. Međutim, male strukturne promjene uzrokuju promjene u djelovanju lijekova. Klaritromicin i azitromicin sadrže modifikacije na C6 ili C9 položaju laktonskog prstena. Ta dva derivata imaju dugi poluživot i povoljnu farmakokinetiku, što nije slučaj kod eritromicina.

Za razliku od eritromicina, klaritromicin je stabilan u kiselim uvjetima te ima rigidnu strukturu koja je ograničena na jedan konformer.



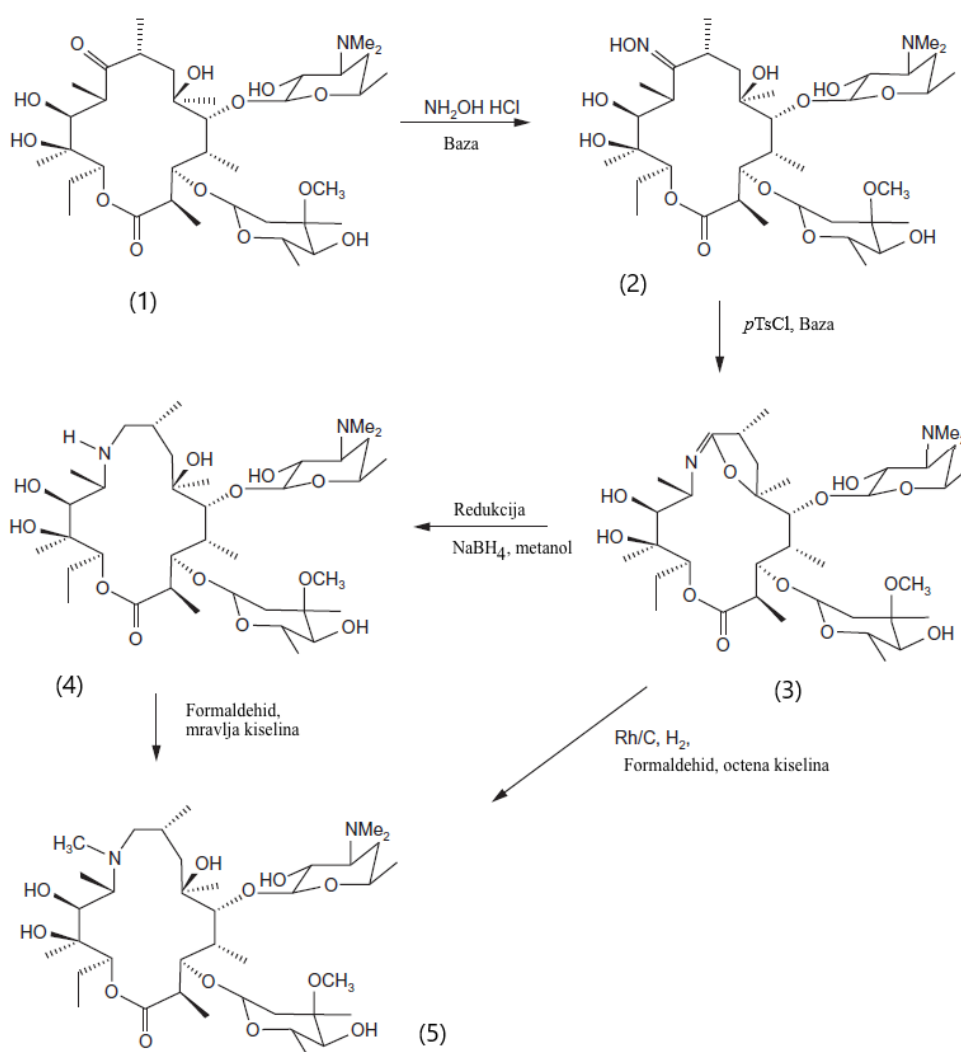
Slika 3. Strukturne formule derivata eritromicina A: a) klaritromicin; b) azitromicin; c) telitromicin; d) roksitromicin.

Eritromicin B nusprodukt je nastajanja eritromicina A. Budući da ne sadrži hidroksilnu skupinu na atomu C12, ne može se ciklizirati kao eritromicin A u smjeru 12-9. Nemogućnost ciklizacije u tom smjeru čini ga stabilnijim u kiselom mediju u odnosu na eritromicin A. 2`-estri eritromicina B također su mnogo stabilniji u kiselom mediju od onih eritromicina A koji se koriste kao pro-lijekovi u dječjoj medicini. Primjer takvog lijeka je eritromicin A-etil- sukcinat koji hidrolizira u crijevima i krvotoku dajući aktivan lijek. Nedostatak lijeka je gorak okus te kliničke suspenzije koj su osjetljive na hidrolizu pri skladištenju. Netopljivi derivat eritromicina B, enolni eter eritromicin B etil-sukcinata, u kiselim uvjetima prelazi u eritromicin B etil-sukcinat analogan eritromicin A etil-sukcinatu. Lijek je netopljiv u neutralnoj otopini zbog čega je stabilan tjednima, a u kiselom mediju želuca trenutno se pretvara u eritromicin B etil-sukcinat. Razlika u derivatima rezultat je razlike u ravnoteži reakcije nastajanja 6,9-enol etera. U slučaju eritromicina A ravnoteža je na strani enolnog etera koji je neaktivan dok je za eritromicin B na strani aktivnog spoja. Bez obzira na prednosti, zbog biodostupnosti i učinkovitosti eritromicina A, farmaceutska industrija i dalje je usmjerena samo na eritromicin A.<sup>5, 8</sup>

## 2.1.2. Sinteza azitromicina

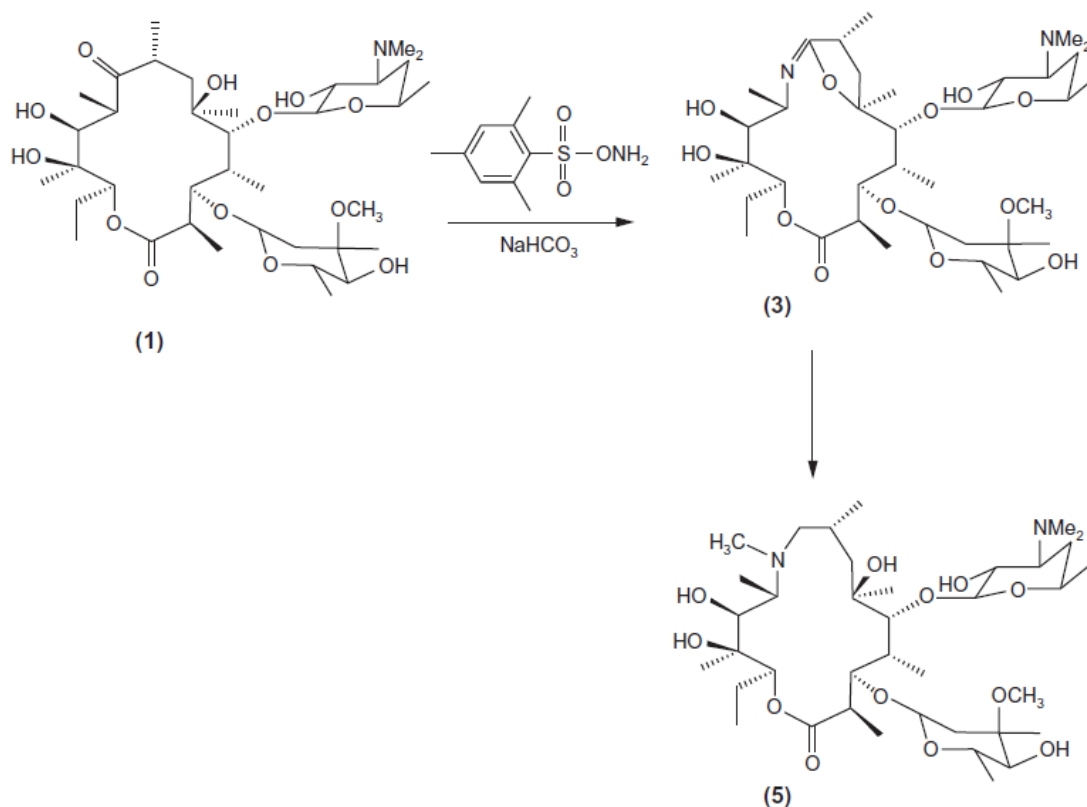
Azitromicin je predstavnik druge generacije 15-eročlanih makrolida, azalida. Nastaje uvođenjem atoma dušika u eritromicinski prsten (Slika 4.).

Tretiranjem eritromicina A (1) s hidroksilamin-hidrokloridom i bazom u metanolu pri temperaturi refluksa kroz 10 h nastaje oksim (2). Nakon izolacije i pročišćavanja oksima slijedi Beckmannova pregradnja. U vodenoj otopini acetona uz *p*-toluensulfonil-klorid i bazu kroz 2 h na 5 °C i potom 2 h na sobnoj temperaturi nastaje 6, 9-iminoeter (3). Nastali iminoeter reducira se u sekundarni amin (4) s natrijevim borhidridom u metanolu ili katalitičkim hidrogeniranjem u prisutnosti PtO<sub>2</sub> kao katalizatora i octene kiseline kao otapala.<sup>9-12</sup>



Slika 4. Priprava azitromicina iz 6, 9-iminoetera Beckmannovom pregradnjom.<sup>9</sup>

U drugom načinu pripreve azitromicina, iminoeter (3) se pripravlja u jednom koraku (Slika 5.). Eritromicin A (1) u acetonu tretira se *O*-mesitilensulfonil-hidroksilaminom kako bi se dobio mesitilen-sulfoniloksim. Mesitilen-sulfoniloksim dobiva se *in situ* iz eritromicina A koji se tretira vodenom otopinom natrijeva karbonata na 0 °C. Beckmannovom pregradnjom zatim nastaje 6,9-iminoeter (3). Redukcija iminoetera do azitromicina (5) odvija se uobičajenim tehnikama reduktivne metilacije.<sup>9</sup>

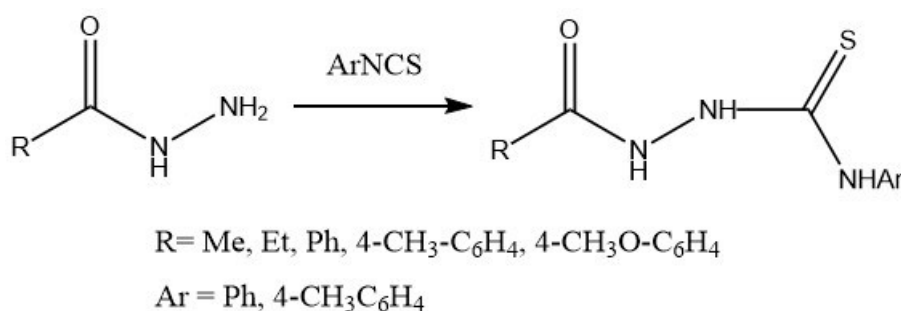


Slika 5. Alternativna metoda sinteze azitromicina.<sup>9</sup>

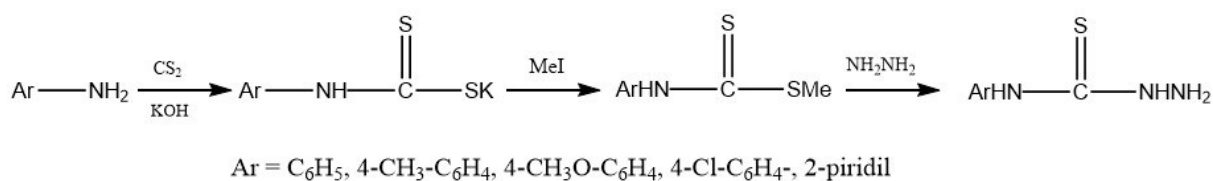
## 2.1.3. Sinteza i reakcije tiosemikarbazida

Tiosemikarbazidi se koriste u heterocikličkoj sintezi kao prekursori, a njihovi derivati kao međuprodukti za razvoj farmaceutski i biološki važnih molekula. Reakcijama tiosemikarbazida s molekulama koje sadrže C=O i C=N skupine dobivaju se biološki aktivni spojevi kao što su pirazol, tiazol, triazol, tiadiazol, oksadiazol, triazin i tiadiazin.

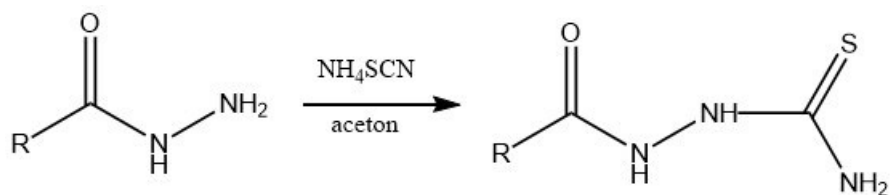
Opća metoda pripreve tiosemikarbazida polazi iz izotiocijanata ili ugljičnog disulfida kojima se dodaje amin ili ugljikohidrazin kao nukleofil. Reakcijom ugljikohidrazida s aril-izotiocijanatom pri različitim reakcijskim uvjetima (s NaOH, KOH, piridinom) nastaju 1,4-disupstituirani derivati tiosemikarbazida (Slika 6.). Bazno katalizirano dodavanje arilamina ugljičnom disulfidu daje kalijev arilkarbamoditioat. Arilkarbamoditioat u reakciji s metil-jodidom daje *N*-arilmetilditiokarbamat iz kojeg reakcijom hidrazinolize nastaje 4-ariltiosemikarbazid (Slika 7.). 1-aciltiosemikarbazidi nastaju u reakciji ugljikohidrazida s amonijevim tiocijanatom u acetonu, uz zagrijavanje<sup>13</sup> (Slika 8.).



Slika 6. Sinteza 1,4-disupstituiranog tiosemikarbazida.



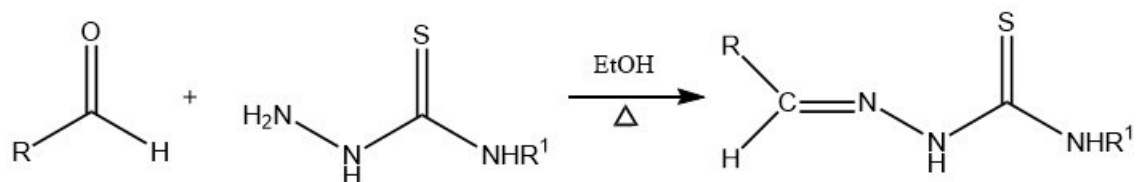
Slika 7. Sinteza 4-ariltiosemikarbazida.



R = Me, Et, cikloheksil, Ph, 4-CH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-

Slika 8. Sinteza 1-aroiltiosemikarbazida.

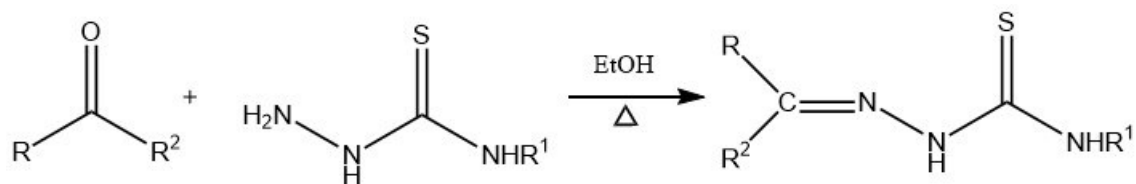
Tiosemikarbazidi sudjeluju u kondenzacijskim reakcijama s aldehidima i ketonima (Slika 9., Slika 10.) te u reakcijama sinteze heterocikličkih prstenova. U reakcije kondenzacije ulaze 4-supstituirani tiosemikarbazidi.



R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 4-CH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-tienil, 2-furil

R<sup>1</sup> = H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Slika 9. Reakcija tiosemikarbazida s aldehidima.



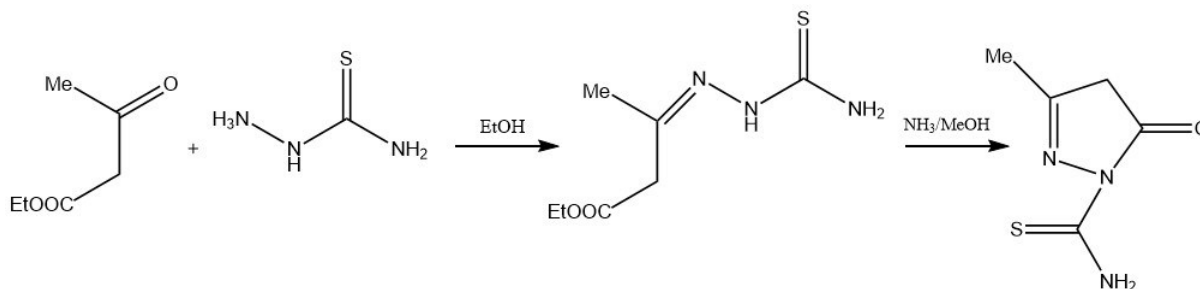
R = Me, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 4-CH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-tienil, 2-piridil

R = H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

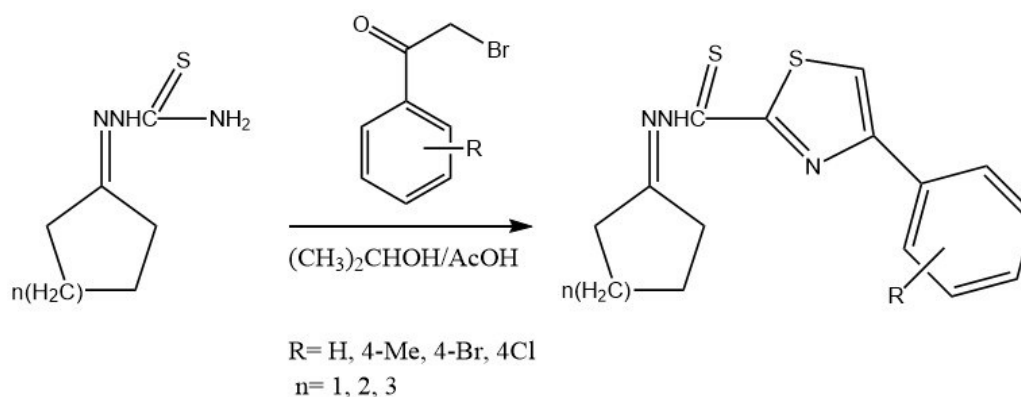
R<sup>2</sup> = Me, Ph

Slika 10. Reakcija tiosemikarbazida s ketonima.

Reakcije sinteze heterocikličkih prstena podrazumijevaju nastajanje pirazola, tiazola, triazola, oksadiazola i tiadiazina. Tako etil-acetoacetat u reakciji s tiosemikarbazidom daje tiosemikarbazon koji s amonijakom, u kipućem metanolu, daje 3-metil-1-tiokarbamoil-2-pirazolin-5-on (Slika 11.). 4-supstituirani derivati tiazola nastaju u reakciji tiosemikarbazona s  $\alpha$ -bromketonima (Slika 12.).

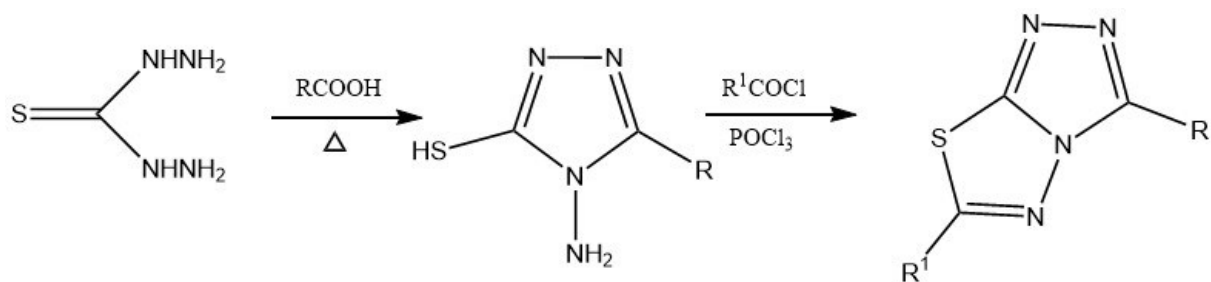


Slika 11. Sinteza 3-metil-1-tiokarbamoil-2-pirazolin-5-ona.



Slika 12. Sinteza 2-hidrazinotiazolin-4-ona.

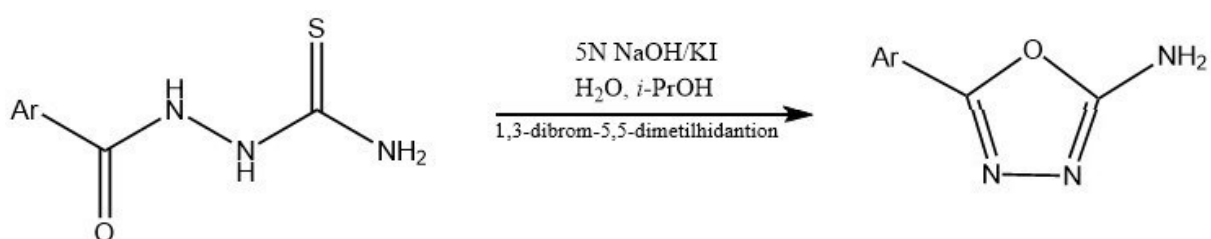
Reakcijom tiokarbhidrazida s alifatskom/aromatskom karboksilnom kiselinom nastaje 3-alkil/aril-4-amino-5-merkpto-1,2,4-triazol koji u reakciji s acetil-kloridom daje 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol (Slika 13.). Oksidacijom tiosemikarbazida pomoću 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoina u prisutnosti KI nastaje 5-supstituirani 2-amino-1,3,4-oksadiazol (Slika 14.). Zagrijavanjem aceton-cijanhidrina s tiosemikarbazidom te hidrolizom nastalog nitrila nastaje 2-metil-2-tiosemikarbazido-propionska kiselina. Nastala kiselina uz zagrijavanje u dioksanu s bornom kiselinom ciklizira do 2-amino-5,5-dimetil-1,3,4-tiadiazin-6-ona<sup>13</sup> (Slika 15.).



R = Me, Et, Pr, Ph, 4-CH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

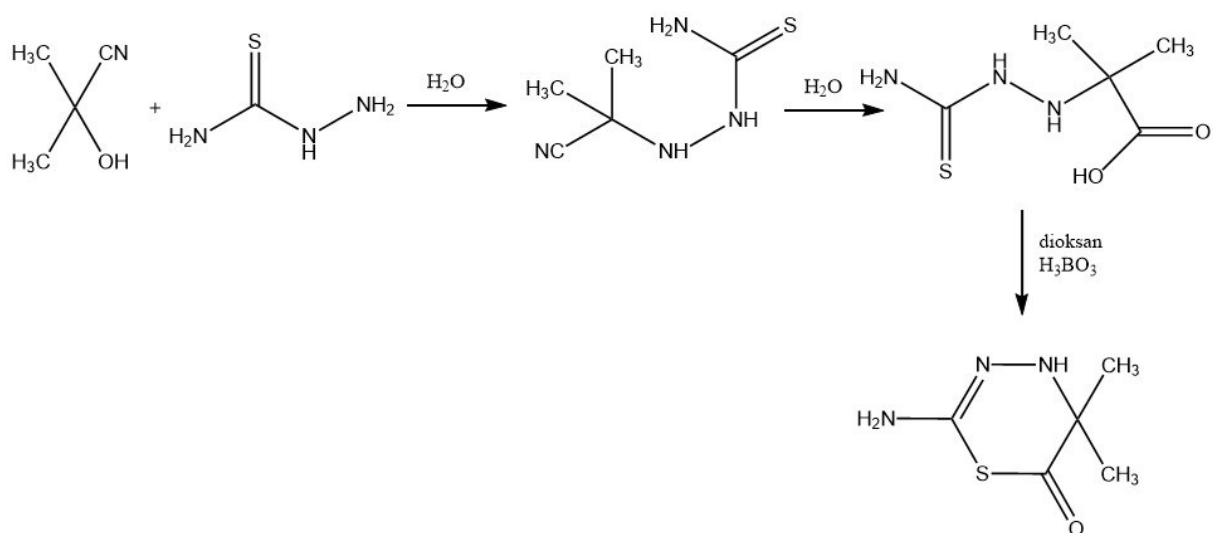
R<sup>1</sup> = Me, Et, Ph

Slika 13. Sinteza 1,2,4- triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazola.



Ar = Ph, 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, , , 

Slika 14. Sinteza 5-supstituiranog 2-amino-1,3,4-oksadiazola.

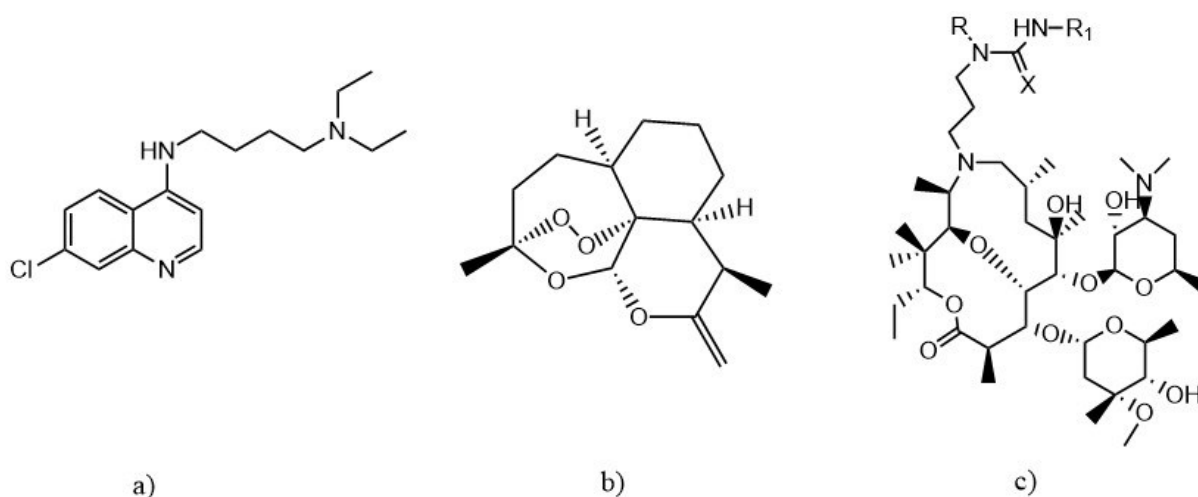


Slika 15. Sinteza 2-amino-5,5-dimetil-1,3,4-tiadiazin-6-ona.



## 2.2. Derivati 15-eročlanih makrolida

Malarija je zarazna bolest crvenih krvnih stanica i danas joj je izloženo oko 40 % svjetske populacije. Nalazi se u tropskim i subtropskim područjima i uzrokuje do 2,7 milijuna smrtnih slučajeva godišnje. Uzrokuju je četiri soja jednostaničnog organizma *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium falciparum* koji je najsmrtonosniji. Zbog otpornosti organizama na postojeće lijekove poput klorokina, potrebno je razviti nove, učinkovitije tretmane. Artemisinin i njegovi derivati su lijekovi koji se koriste za liječenje malarije kod rezistencije na klorokin (Slika 16.). Zbog širenja malarije u dijelove svijeta gdje je ona endemska, potrebno je pronaći sigurne, učinkovite i pristupačne lijekove bez križne rezistencije<sup>1</sup> sa standardnim antimalarijskim lijekovima. Azitromicin se pokazao kao dobar antibiotik protiv sva četiri soja *Plasmodium* i to *in vivo*, *in vitro*, u profilaksi<sup>2</sup> i u liječenju. Veću *in vitro* aktivnost pokazuju različiti derivati ureje i tioureje vezani na azitromicin.<sup>14, 15</sup>



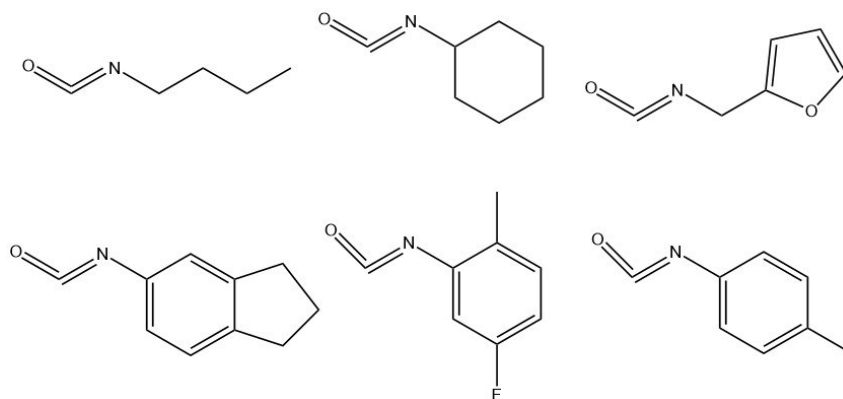
Slika 16. Strukturne formule: a) klorokina, b) artemisinina, c) derivata azitromicina s (tio)urejom.

<sup>1</sup> Mogućnost rezistencije na sličan lijek

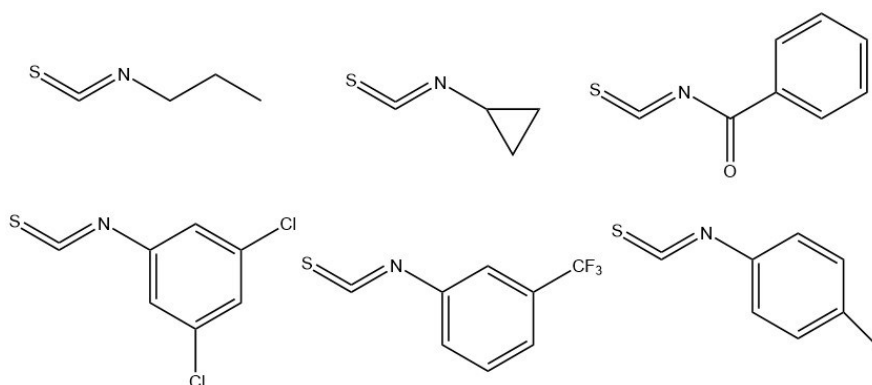
<sup>2</sup> Mjera za sprječavanje bolesti (npr. cijepljenjem), posljedica bolesti ili nesreća

## 2.2.1. Sinteza derivata azitromicina i (tio)ureje

Sinteza derivata 9a-aza-homoeritromicin-9a-N-( $\gamma$ -aminopropil)-ureje i 9a-aza-homoeritromicin-9a-N-( $\gamma$ -aminopropil)-tioureje izvedena je iz 9a-aza-homoeritromicin-a-propilamina i skupa različitih izocijanata i izotocijanata.<sup>14</sup>

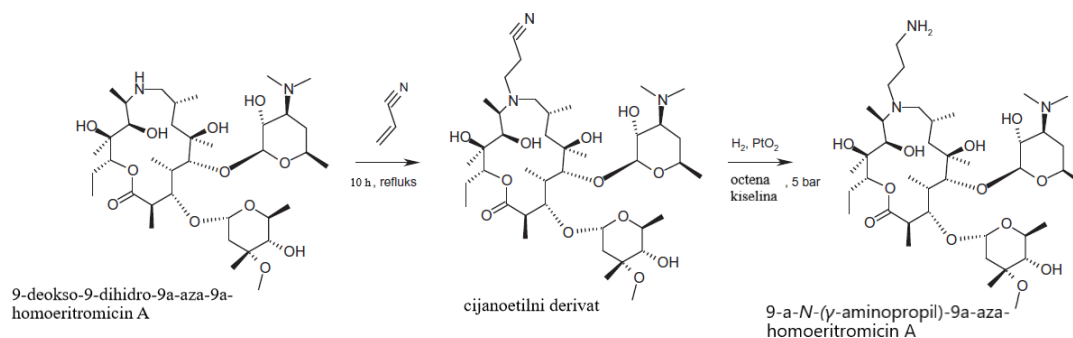


Slika 17. Strukturne formule molekula izocijanata korištenih za sintezu derivata ureje.



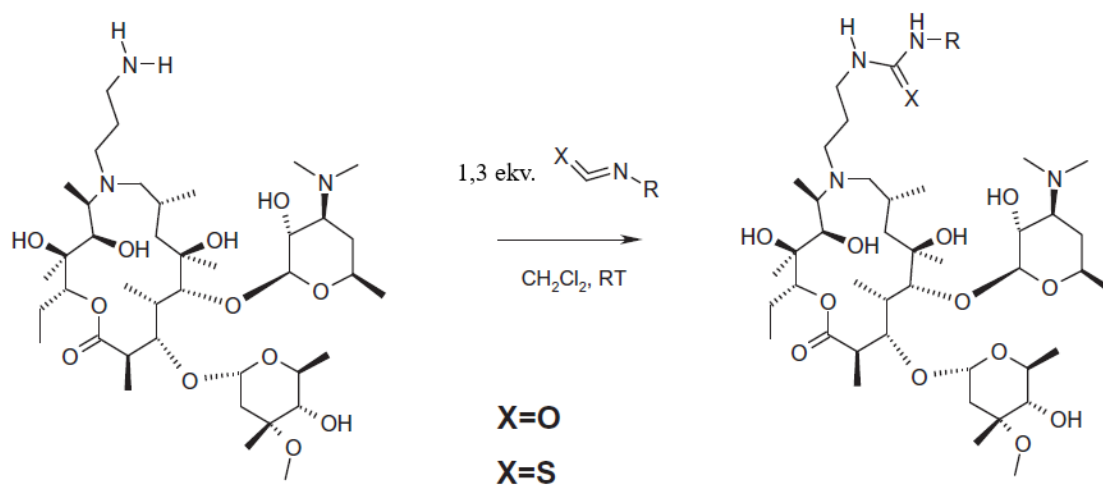
Slika 18. Strukturne formule molekula izotocijanata korištenih za sintezu derivata tioureje.

Prvi korak sinteze 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicina A je Michaelova adicija akrilonitrila na 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A. U drugom koraku se cijanoetilni derivat hidrogenira s PtO<sub>2</sub>, a kao otapalo se koristi octena kiselina (Slika 19.).



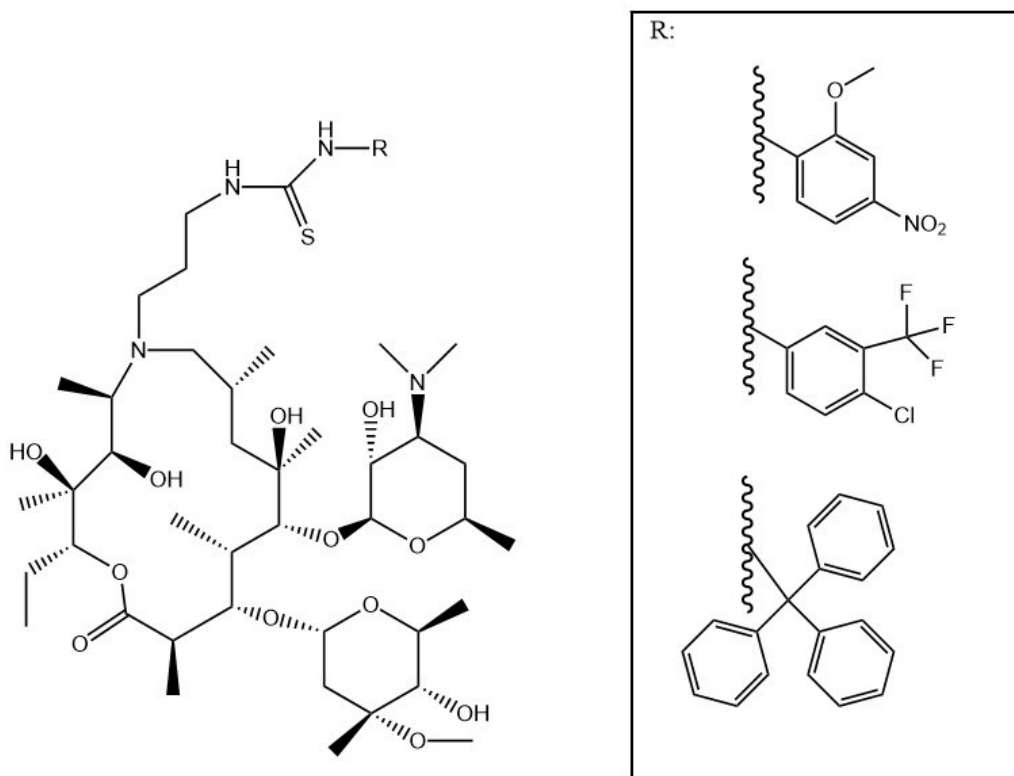
Slika 19. Sinteza 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicin A.<sup>14</sup>

Odgovarajući derivati azitromicina i (tio)ureje dobivaju se vezanjem izocijanata (Slika 17.), odnosno izotiocijanata (Slika 18.) na sintetizirani 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicin A pri sobnoj temperaturi u diklormetanu (Slika 20.).



Slika 20. Sinteza derivata azitromicina i ureje (X=O), odnosno tioureje (X=S).<sup>14</sup>

Sintezom su dobiveni derivati visoke čistoće. Korištenjem istih uvjeta sinteze pripravljeno je još 98 9a-*N*-supstituiranih 15-membranskih azalida od kojih je 91 spoj pokazao bolju *in vitro* aktivnost od azitromicina. Tri derivata pokazala su vrlo dobru aktivnost u inhibiciji rasta sojeva *P. Falciparum*, uključujući sojeve koji su otporni na lijekove<sup>14</sup> (Slika 21.).



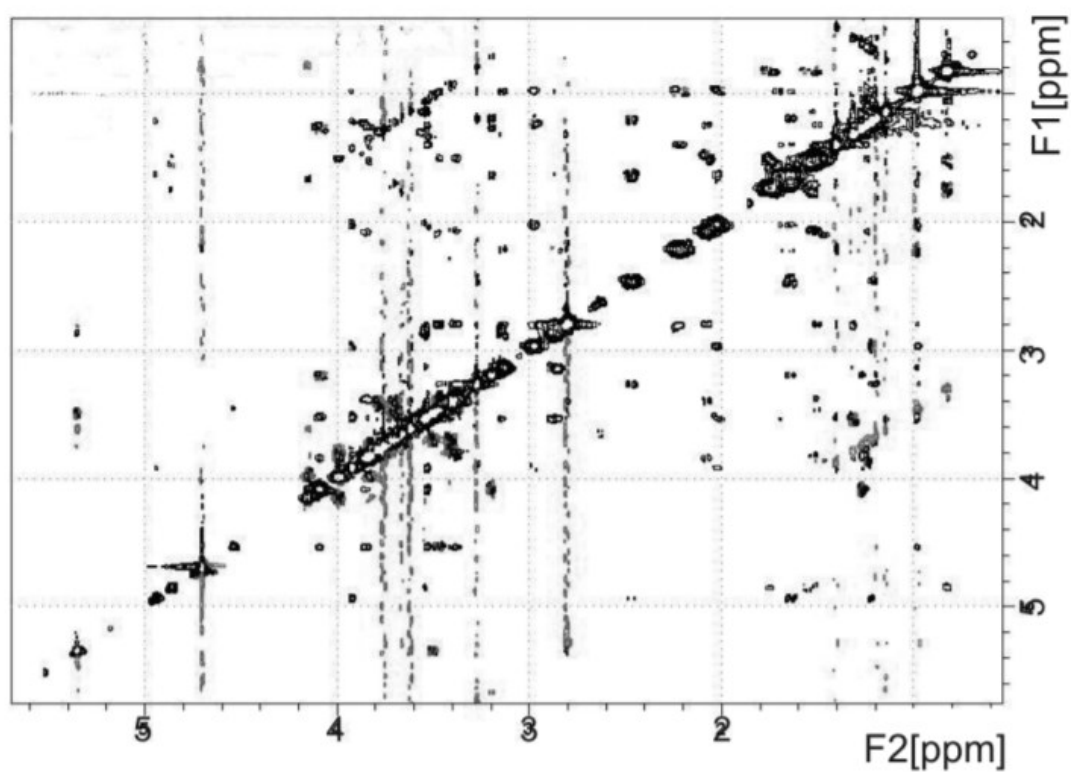
Slika 21. Strukturne formule novosintetiziranih spojeva koji pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost.

### 2.3. Interakcije makrolida

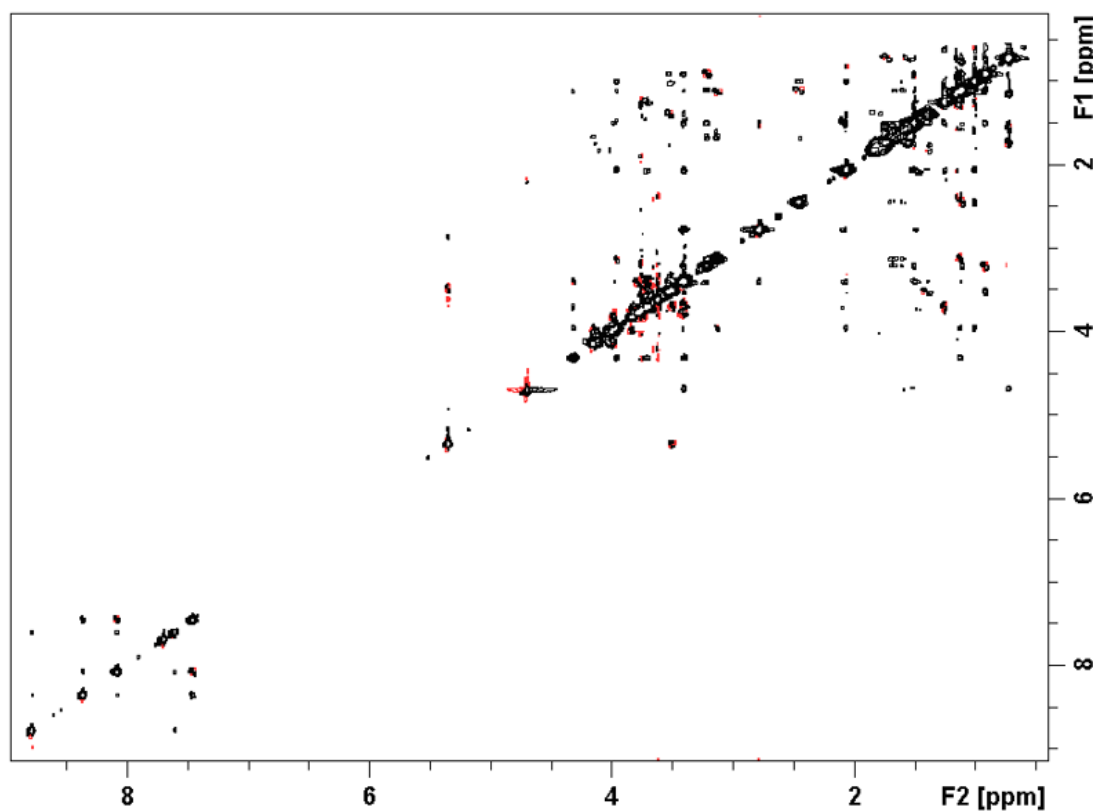
Dvije najčešće korištene metode za proučavanje kompleksa ligand-receptor su spektroskopija NMR i rendgenska difrakcija. Koristeći se jedno- i dvodimenzijskim tehnikama NMR u otopini se mogu dobiti informacije o strukturi ligand-receptor, interakcijama, svojstvima te o dinamici ispitivanih sustava. Nedostatak te tehnike je nemogućnost određivanja strukture velikih bioloških sustava kao što su makromolekule i njihovi kompleksi. Rentgenskom difrakcijom mogu se odrediti kristalne strukture koje su samo statički prikaz dinamičkog procesa koji uključuje različite vrste interakcija i pokretljivosti formiranog kompleksa. Metodama kao što su tr-NOESY (engl. *Transferred Nuclear Overhauser Effect*) i STD (engl. *Saturation Transfer Difference*) može se odrediti mjesto vezanja liganda na receptor, skupine na ligandu koje su u neposrednoj blizini mjesta vezanja te se mogu dobiti informacije o konformaciji makromolekule i liganda tj. kompleksa liganda s makromolekulom.<sup>16, 17</sup>

#### 2.3.1. Prijenosni nuklearni Overhauserov efekt (tr-NOE)

Prijenosni nuklearni Overhauserov efekt je metoda koja se primjenjuje za ligande s relativno malom sklonošću vezanju ( $K_d > 100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) i vremenom života nekoliko stotina milisekundi. Metoda je ograničena na relativno male i slabo vezujuće ligande te se dobivaju uprosječeni učinci NOE zbog čega se, bez dodatnih informacija, ne mogu odrediti točne udaljenosti protein-ligand. Priprava uzorka ključna je za uspješnost metode. Intenzitet signala ovisi o suvišku dodanog liganda zbog čega se u praksi primjenjuje 10 do 100 puta veća količina liganda u odnosu na makromolekulu te i nekoliko tisuća puta veća za veće sustave, kao npr. ribosom. Tr-NOESY ovisi o frakcijama slobodnog i vezanog liganda koje daju pozitivne i negativne signale NOE. Ukoliko je omjer liganda i proteina previsok, povećava se udio slobodnog liganda čiji pripadajući pozitivni NOE dovodi do smanjenja ili poništenja pojačanja tr-NOESY koji potječe od negativnog NOE učinka. Slobodni i vezani ligand imaju različito vrijeme korelacije ( $\tau_c$ ). Slobodni ligandi (male molekule) imaju male molekulske mase pa i kratko vrijeme korelacije te pokazuju male pozitivne NOE. Vezanjem liganda na receptor, ligand poprima svojstva makromolekule zbog čega pokazuje duže vrijeme korelacije i jake negativne NOE tj. prenesene NOE. S obzirom da se signali vezane vrste i slobodne makromolekule ne vide u spektru NMR, metoda se može upotrijebiti za komplekse s velikim biomolekulama kao što su ribosomi<sup>16, 17</sup> (Slika 22., Slika 23.).



Slika 22. Spektar Tr-NOE azitromicina vezanog u aktivnom mjestu ribosoma iz *E. Coli*.<sup>17</sup>



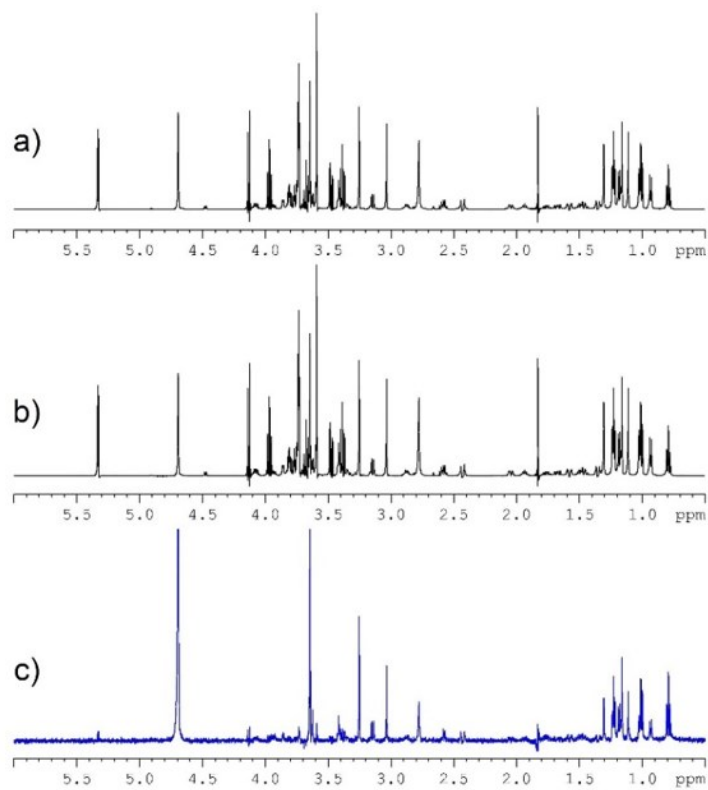
Slika 23. Spektar Tr-NOESY telitromicina vezanog u aktivnom mjestu ribosoma iz *E. Coli*.<sup>1</sup>

### 2.3.2. Metoda razlike prijenosa zasićenja (engl. *Saturation Transfer Difference*, STD)

Metoda STD omogućava brzu analizu procesa vezanja, probir biblioteke liganada i određivanje dijelova liganada koji su odgovorni za vezanje. Metoda se temelji na činjenici da za slabo vezujući ligand ( $K_d = 10^{-8} - 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) postoji izmjena između vezanog i slobodnog stanja liganda. Makromolekule imaju veliku mrežu protona povezanih dipol-dipol interakcijama preko kojih može doći do brzog prijenosa zasićenja. Tijekom zasićenja dolazi do prijenosa magnetizacije s jezgre makromolekule na jezgru vezanog liganda. Najjači signal u spektru imat će protoni liganda koji su prostorno najbliži protonima makromolekule dok će udaljeniji protoni liganda imati slabiji signal jer se manje zasićuju. Stupanj zasićenosti pojedinog protona liganda ovisit će o udaljenosti od površine makromolekule i može se iskoristiti za određivanje dijelova liganda koji se vežu za aktivno mjesto makromolekule, a zovemo ih epitopi (mapiranje epitopa). Metoda uključuje oduzimanje spektra u kojemu je makromolekula selektivno zasićena (*on-resonance* spektar koji sadrži samo rezonancije makromolekule), i čiji je intenzitet signala označen s  $I_{SAT}$ , od spektra snimljenog bez zasićenosti makromolekule (*off-resonance* spektar) čiji je intenzitet signala  $I_0$ . (1)

$$I_{STD} = I_0 - I_{SAT} \quad (1)$$

Ostali prisutni spojevi koji se ne vežu na receptor imat će jednake intenzitete signala u oba spektra te neće biti vidljivi nakon oduzimanja spektara<sup>1, 17, 18</sup> (Slika 24.).



Slika 24. a) „On resonance“ b) „Off resonance“ c) spektar STD NMR kompleksa oleandomicin-ribosom (*E.coli*).<sup>1</sup>

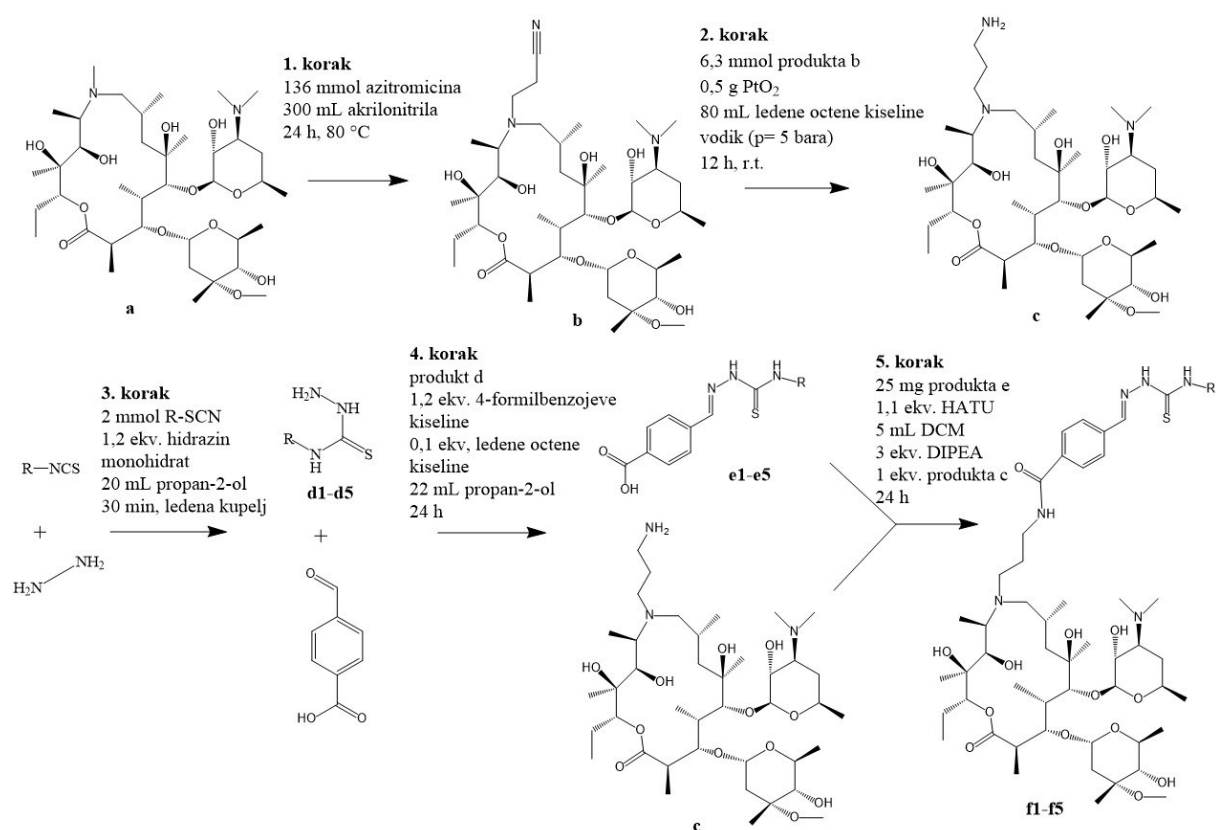


## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Opći postupak priprave makrozona

Sinteza benzil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il-, 2-naftil- i *p*-trifluormetoksifenil-makrozona provedena je u pet koraka<sup>19-21</sup> (Slika 25.).

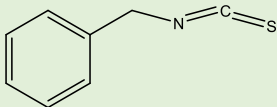
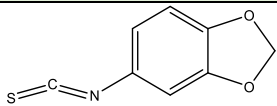
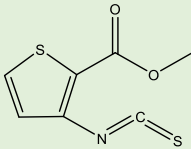
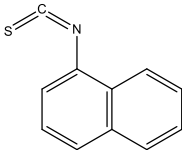
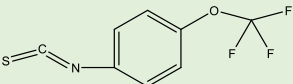


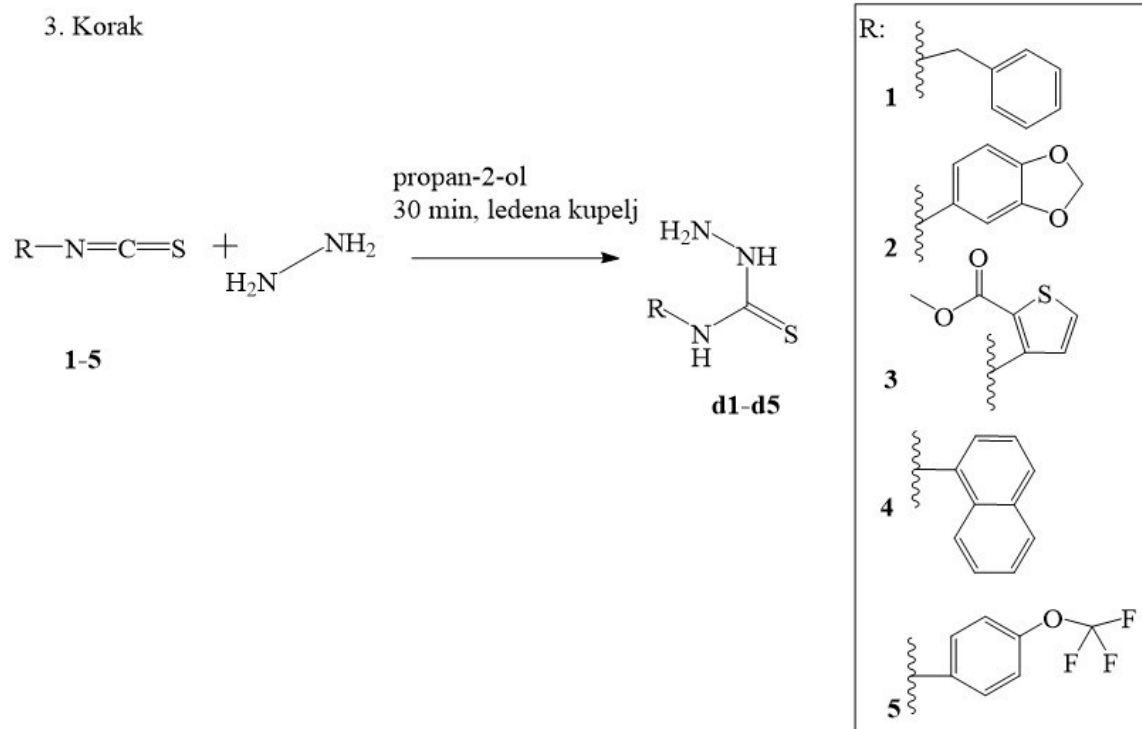
Slika 25. Shematski prikaz sinteze makrozona **f1-f5**.

Prva dva koraka uključuju pripremu prekursora **c**, 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicina A. Prekursor je pripravljen u tvrtci Fidelta d.o.o.<sup>14</sup>

Treći korak sinteze je reakcija izotiocijanata **1-5** navedenih u Tablici 1. s hidrazin-monohidratom u propan-2-olu pri čemu nastaju odgovarajući *N*-arilhidrazin-karbotioamidi, odnosno tiosemikarbazoni **d1-d5** (Slika 26.). Produkti trećeg koraka koriste se dalje u reakciji s 4-formilbenzojevom kiselinom kako bi se uvela karboksilna skupina u molekulu te pripravili tiosemikarbazidi **e1-e5** (4. korak). Zadnji korak je reakcija amidacije između prekursora **c**, 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicina A, sintetiziranog u drugom koraku, i odgovarajućeg tiosemikarbazida **e1-e5** sintetiziranog u četvrtom koraku pri čemu nastaju konačni produkti **f1-f5**. Sve kemikalije i otapala korištena u sintezi bila su analitičke ili HPLC čistoće te su navedena u Tablici 2.

Tablica 1. Izotiocijanati korišteni za sintezu tiosemikarbazona

Spoj	Strukturna formula	Mr	$\rho / \text{gcm}^{-3}$	$t_v / ^\circ\text{C}$	$t_t / ^\circ\text{C}$	Proizvođač
benzil-izotiocijanat ( <b>1</b> )		149,21	1,12	243		Acros Organics
3,4-metilendioksifenil-izotiocijanat ( <b>2</b> )		179,20				Fluorochem
metil-3-izotiocijanatotiofen-2-karboksilat ( <b>3</b> )		199,24			57-59	Fluorochem
1-naftil-izotiocijanat ( <b>4</b> )		185,24			55,5-57	Acros Organics
4-(trifluorometoksi)fenil-izotiocijanat ( <b>5</b> )		219,18	1,35			Alfa Aesar

Slika 26. Sinteza tiosemikarbazona **d1-d5**.

Tablica 2. Kemikalije i otapala korištena u sintezi makrozona te neka njihova svojstva

Spoj	Molekulska formula	Mr	$\rho / \text{g cm}^{-3}$	$t_v / ^\circ\text{C}$	$t_t / ^\circ\text{C}$	Proizvođač
Hidrazin monohidrat	$\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50,06		120-121	-52	Sigma Aldrich
Propan-2-ol	$\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$	60,10	0,785	82-83	-90	J. T. Baker
4-formilbenzojeva kiselina	$\text{HO}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{CHO}$	150,13		332,6	245	Aldrich Chemistry
Ledena octena kiselina	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	60,05	1,05			Gram-mol
Diklormetan (DCM)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	84,93	1,322- 1,324	39-40,5		T.T.T. Doo
1-[bis(dimetilamino)metilen]- 1H-1,2,3-triazolo[4,5- b]piridinijev-3-oksidi heksafluorofosfat (HATU)	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_6\text{OP}$	380,23				Acros Organics
<i>N,N</i> -diizopropiletilamin (DIPEA)	$((\text{CH}_3)_2\text{CH}_2)\text{NC}_2\text{H}_5$	129,24	0,742			Acros Organics

3.1.2. *Općeniti postupak priprave tiosemikarbazona (N-arilhidrazin-karbotioamida)*

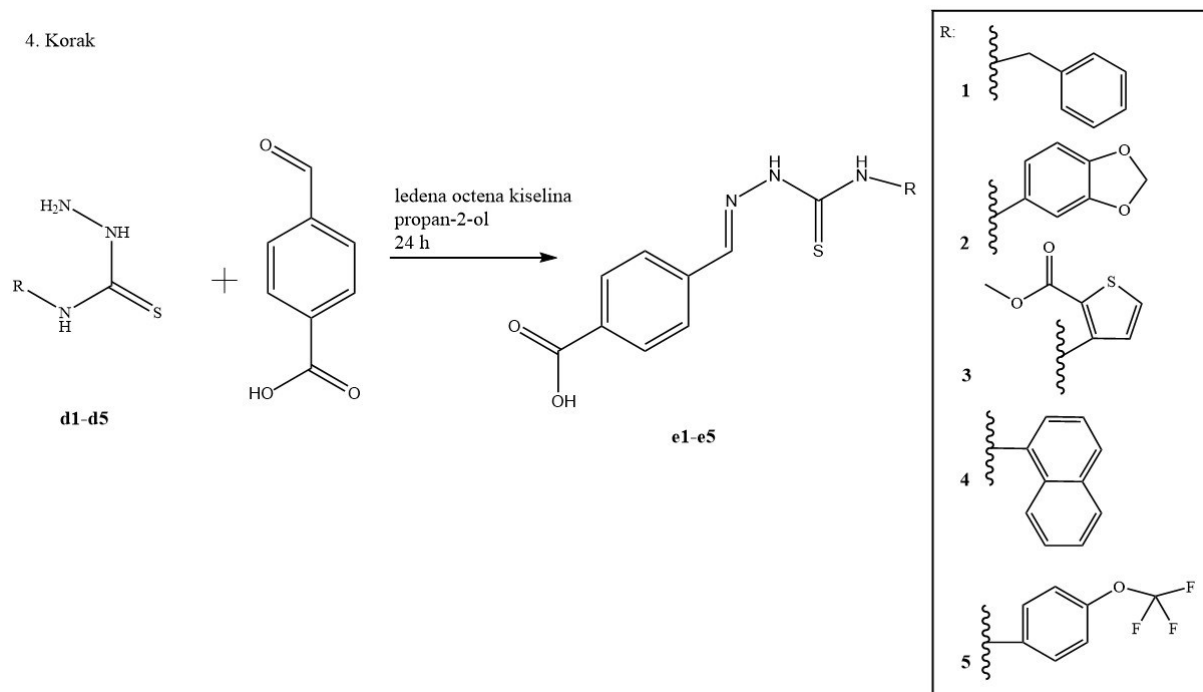
Izotiocijanat **1 - 5** (2 mmol) se dodaje u okruglu tikvicu gdje se nalazi smjesa propan-2-ola (20 mL) i hidrazin-monohidrata (1,2 ekvivalenta; 0,23 mL). Smjesa se miješa magnetskom mješalicom u ledenoj kupelji pri čemu dolazi do taloženja kristala bijele boje. Nakon 30 min nastali talog filtrira se pod sniženim tlakom preko Büchnerovog lijevka i suši oko 15 min. Mase polaznih spojeva za sintezu, kao i mase nastalih produkata **d1-d5**, navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz masa i volumena izotiocijanata korištenih u sintezi tiosemikarbazona **d1-d5** te mase dobivenih produkata

Reaktant	<i>m</i> / g	<i>V</i> / mL	Ime produkta	Masa produkta / g	$\eta$ / %
<b>1</b>	-	0,265	<i>N</i> -benzil-hidrazin-karbotioamid ( <b>d1</b> )	0,216	59,6
<b>2</b>	0,358	-	<i>N</i> -(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)hidrazin-karbotioamid ( <b>d2</b> )	0,335	79,3
<b>3</b>	0,316	-	Metil-3-(hidrazinkarbotioamido)tiofen-2-karboksilat ( <b>d3</b> )	0,312	67,4
<b>4</b>	0,37	-	<i>N</i> -(naftalen-1-il)hidrazin-karbotioamid ( <b>d4</b> )	0,231	53,1
<b>5</b>	-	0,324	<i>N</i> -(4-(trifluormetoksi)fenil)hidrazin-karbotioamid ( <b>d5</b> )	0,172	34,3

### 3.1.3. Općeniti postupak priprave tiosemikarbazida (4-((2-aryl-karbamotioilhidraziniliden)metil)benzojeve kiseline)

Tiosemikarbazon **d1 –d5** (1,44 mmol) se dodaje u propan-2-ol (22 mL) u okruglu tikvicu i započinje se miješanje magnetskom mješalicom. Potom se redom dodaju ledena octena kiselina (0,1 ekvivalent) i 4-formilbenzojeva kiselina (1,2 ekvivalenta). Smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 24 h. Taloži žuti produkt (**e1 –e5**) koji se filtrira pod sniženim tlakom preko Büchnerovog lijevka koristeći filter-papir plavu vrpцу (Slika 27.). Produkt se ispire propan-2-olom (3 x 3 mL) i osuši pod vakuumom. Mase polaznih spojeva za sintezu, kao i mase nastalih produkata navedene su u Tablici 4.



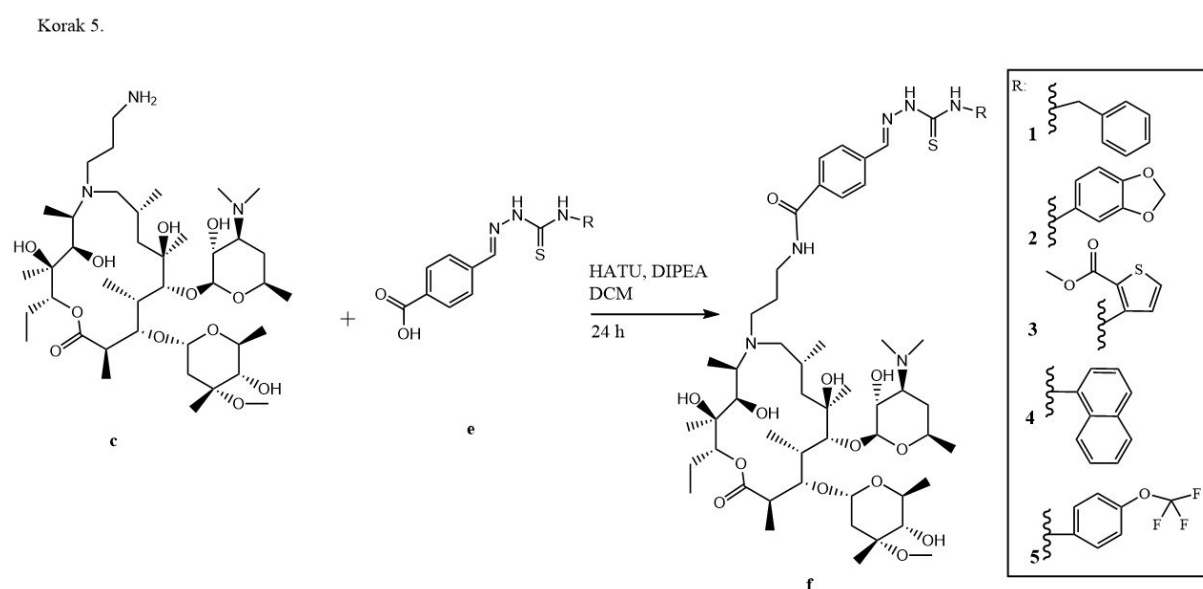
Slika 27. Sinteza tiosemikarbazida **e1-e5**.

Tablica 4. Prikaz masa i volumena tiosemikarbazona korištenih u sintezi tiosemikarbazida te mase produkata i iskorištenja reakcija

Reaktanti	<i>m</i> / g	<i>V</i> / $\mu$ L	Ime produkta	<i>m</i> / g	$\eta$ / %
<b>d1</b>	0,213	-	4-((2-(benzilkarbamotioil)hidraziniliden)metil) benzojeva kiselina ( <b>e1</b> )	0,314	85,3
4-formilbenzojeva kiselina	0,211	-			
Ledena octena kiselina		6,70			
<b>d2</b>	0,332	-	4-((2-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il-karbamotioil)hidraziniliden)metil) benzojeva kiselina ( <b>e2</b> )	0,460	79,7
4-formilbenzojeva kiselina	0,303	-			
Ledena octena kiselina		9,52			
<b>d3</b>	0,308	-	4-((2-((3-(metoksikarbonil)tiofen-2-il)karbamotioil)hidraziniliden)metil) benzojeva kiselina ( <b>e3</b> )	0,413	85,7
4-formilbenzojeva kiselina	0,239	-			
Ledena octena kiselina		7,59			
<b>d4</b>	0,228	-	4-((2-(naftalen-1-il-karbamotioil)hidraziniliden)metil) benzojeva kiselina ( <b>e4</b> )	0,332	90,5
4-formilbenzojeva kiselina	0,189	-			
Ledena octena kiselina		6,0			
<b>d5</b>	0,169	-	4-((2-((4-(trifluormetoksi)fenil)karbamotioil)hidraziniliden)metil)benzojeva kiselina ( <b>e5</b> )	0,112	43,4
4-formilbenzojeva kiselina	0,121	-			
Ledena octena kiselina		3,85			

## 3.1.4. Općeniti postupak pripreve makrozona

U okruglu tikvicu se dodaje odgovarajući tiosemikarbazid **e1** –**e5** (25 mg) pripravljen u 4. koraku, zatim HATU (1,1 ekvivalent), DIPEA (3 ekvivalenta) i diklormetan (5 mL). Otopina se miješa 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega se dodaje prekursor 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicin A. Tako pripravljena smjesa se dodatno miješa na sobnoj temperaturi 24 h. Na kraju se reakcijska smjesa upari na rotacijskom uparivaču pri čemu se dobiju žuti, ljepljivi talozi makrozona, **f1** –**f5**, (Slika 28.). Iznimka je makrozon **f3** koji istaloži iz reakcijske smjese pa se filtrira pod sniženim tlakom preko Büchnerovog lijevka i posuši.

Slika 28. Sinteza makrozona **f1**-**f5**.

Tablica 5. Prikaz masa i volumena tiosemikarbazida korištenih u sintezi makrozona te mase reakcijskih smjesa

<b>Reaktanti</b>	<i>m / g</i>	<i>V / mL</i>	<b>Produkti</b>	<i>Masa reakcijske smjese / g</i>
<b>e1</b>	0,025	-	<b>f1</b>	0,184
HATU	0,033	-		
DIPEA	-	0,042		
Prekursor <b>c</b>	0,062	-		
<b>e2</b>	0,025	-	<b>f2</b>	0,246
HATU	0,032	-		
DIPEA	-	0,039		
Prekursor <b>c</b>	0,059	-		
<b>e3</b>	0,025	-	<b>f3</b>	0,063
HATU	0,028	-		
DIPEA	-	0,036		
Prekursor <b>c</b>	0,053	-		
<b>e4</b>	0,025	-	<b>f4</b>	0,177
HATU	0,030	-		
DIPEA	-	0,041		
Prekursor <b>c</b>	0,055	-		
<b>e5</b>	0,025	-	<b>f5</b>	0,090
HATU	0,027	-		
DIPEA	-	0,034		
Prekursor <b>c</b>	0,051	-		



### 3.1.5. Pročišćavanje makrozona

Sintetizirani makrozoni **f1-f5** pročišćeni su kromatografijom na stupcu silika-gela uz gradijentno eluiranje diklormetanom i smjesom otapala  $\varphi$  (DCM, metanol, amonijak) = 90 : 15 : 1,5 (skraćeno ime  $E^+$ ). Kolona je napunjena silika-gelom mase 100 puta veće od mase reakcijske smjese makrozona **f1 –f5** i isprana s DCM čiji je volumen bio jednak visini stupca silika-gela. Makrozoni, čije su mase navedene u Tablici 3.5, otopljeni su u maloj količini diklormetana i nanoseni na stupac silika-gela. Eluiranje je započeto čistim diklormetanom, nakon čega je gradijent povećavan kroz frakcije smjesom otapala  $E^+$  za 5 %. Eluat svake frakcije provjeravan je tankoslojnom kromatografijom. Na aluminijsku pločicu obloženu tankim slojem silika-gela eluat je nanosen kapilarom. Pločica je razvijana u staklenoj komori, a kao eluens korišten je  $E^+$ . Za detekciju razvijene pločice korištena je lampa UV uz valne duljine detekcije 254 nm te 365 nm. Spojevi su također detektirani prskanjem pločice 10 %-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu.

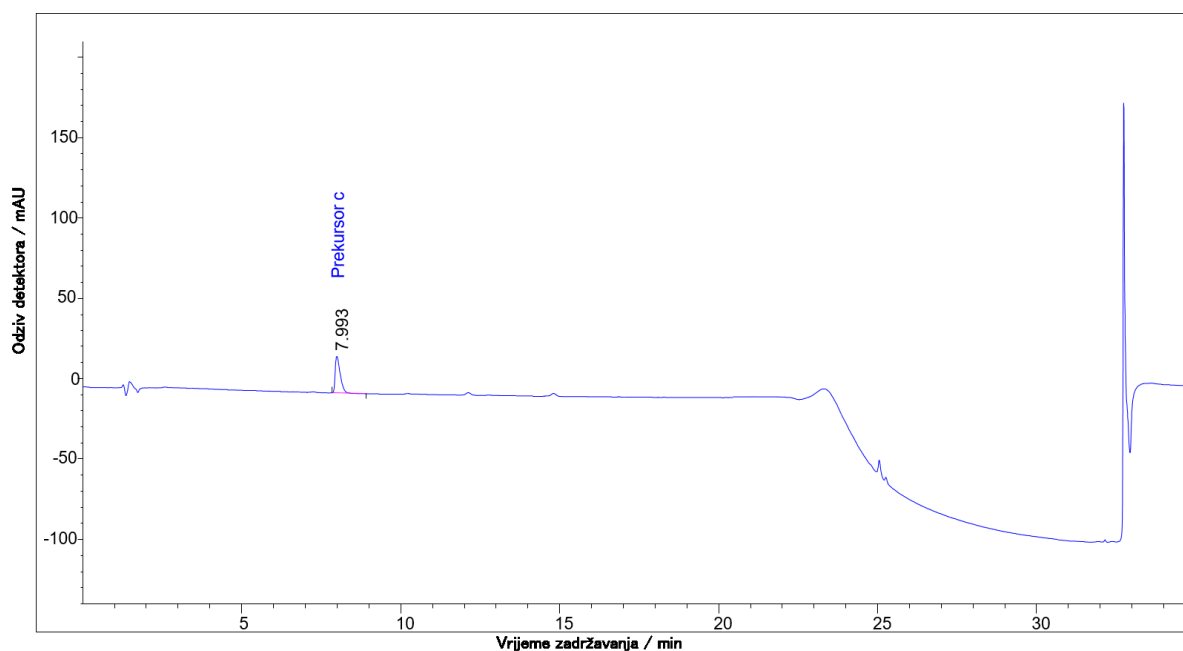
Čistoća izoliranih spojeva provjerena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Kromatogrami su snimljeni na tekućinskom kromatografu Agilent 1260 Infinity opremljenom kvaternom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatiranim prostorom za kolonu te detektorom s nizom fotodioda. Korištena je kromatografska kolona Waters XBridge Phenyl, dimenzija 150 mm × 4,6 mm, s promjerom čestica punila 3,5  $\mu\text{m}$ . Spojevi su eluirani gradijentno smjesom acetonitrila i pufera (10 mmol dm<sup>-3</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH=10 podešen otopinom amonijaka). Valna duljina detekcija bila je 210 nm. Volumen injektiranja bio je 15  $\mu\text{L}$ . Uzorci makrozona za analizu HPLC pripremljeni su otapanjem reakcijske smjese te izoliranog spoja u acetonitrilu do konačne masene koncentracije 5 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.1.6. Karakterizacija sintetiziranih spojeva

Strukture pripremljenih spojeva određene su na temelju snimljenih spektara masa te jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR. Spektri masa snimljeni su na spektrometru Waters UPLC ESI MS uz ionizaciju elektroraspršenjem. Spektri NMR snimljeni su na spektrometru Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend s 5 mm BBO (engl. *broadband*) direktnom Prodigy krio-probom i z-gradijentnom zavojnicom pri 298 K. Sintetizirani tiosemikarbazoni **1d–5d** i tiosemikarbazidi **e1–e5** pripremljeni su otapanjem 3 mg spoja u 500 µL DMSO-*d*6 dok su makrozoni **f1–f5** pripremljeni otapanjem 3 mg spoja u 600 µL acetonitrila-*d*3.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

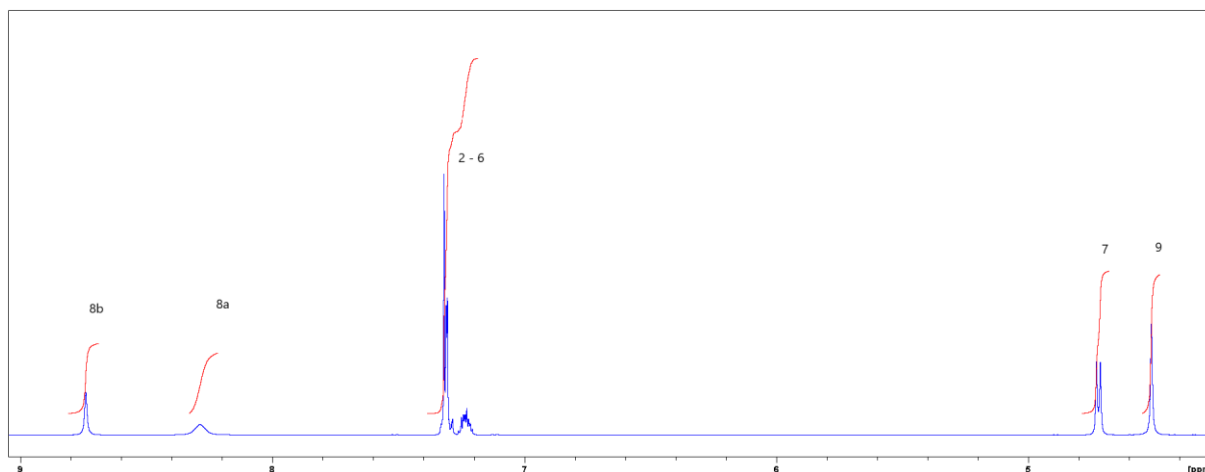
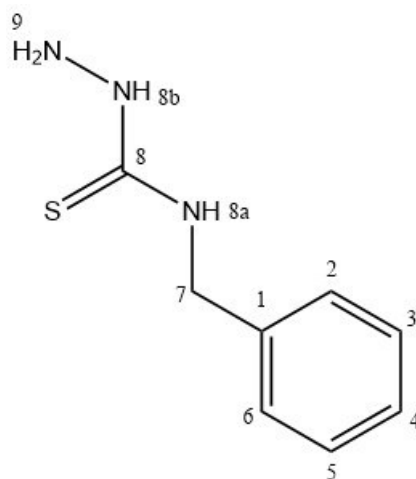
Sinteza makrozona provedena je u pet sintetskih koraka. Prekursor **c**, 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicin A, sintetiziran u tvrtci Fidelta, analiziran je tehnikom HPLC prije upotrebe za sintezu konačnog produkta u 5. koraku. Kromatogram prekursora **c** prikazan je na slici 4. Reakcijom odabranih izotiocijanata **1** – **5** s hidrazinom u propan-2-olu pripremljeni su tiosemikarbazoni **d1**–**d5**. Reakcija je brza, a produkti talože unutar 30 min u obliku kristala bijele boje. Iskorištenje reakcije bilo je od 34 % za spoj **d5** do 78 % za spoj **d2**. Pripremljeni tiosemikarbazoni **d1**–**d5** korišteni su u idućem koraku za sintezu tiosemikarbazida. Reakcijom 4-formilbenzojeve kiseline i spojeva **d1**–**d5** u propan-2-olu uz dodatak ledene octene kiseline kroz 24 h istaložili su produkti žute boje **e1**–**e5**. Prinos opisane reakcije bio je od 43 % za spoj **e5** do 90 % za spoj **e4**. Reakcijom amidacije između prekursora **c** i tiosemikarbazida **e1**–**e5** uz dodatak HATU i DIPEA u diklormetanu sintetizirani su makrozoni **f1**–**f5**. Prisutnost konačnog produkta, makrozona, u reakcijskoj smjesi potvrđena je tehnikom LC-MS. Dobiveni spojevi pročišćeni su kromatografijom na stupcu, a čistoća produkta provjerena je tehnikom HPLC. Strukture svih produkata određene su snimanjem spektara NMR.



Slika 29. Kromatogram prekursora **c**, 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicina A, masene koncentracije 0,02 mg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.1. Benzil-makrozon (f1)

Za sintezu benzil-makrozona, **f1**, prvo je bilo potrebno sintetizirati odgovarajući tiosemikarbazon, **d1**, a zatim tiosemikarbazid, **e1**. Reakcijom spoja **1** (0,265 mL) s hidrazin-monohidratom (0,23 mL) u propan-2-olu istaložio je produkt bijele boje (216 mg). Iskorištenje reakcije bilo je 60 %. Struktura spoja **d1** potvrđena je snimanjem spektra  $^1\text{H}$  NMR (Slika 30., Tablica 6.).

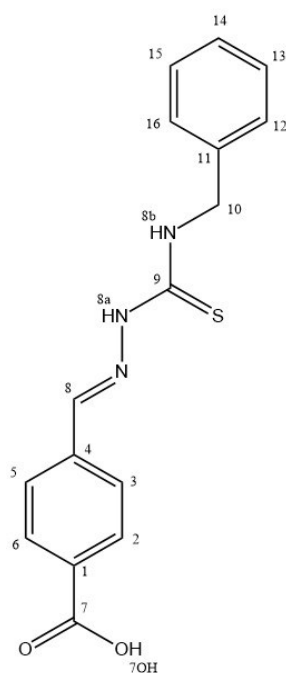


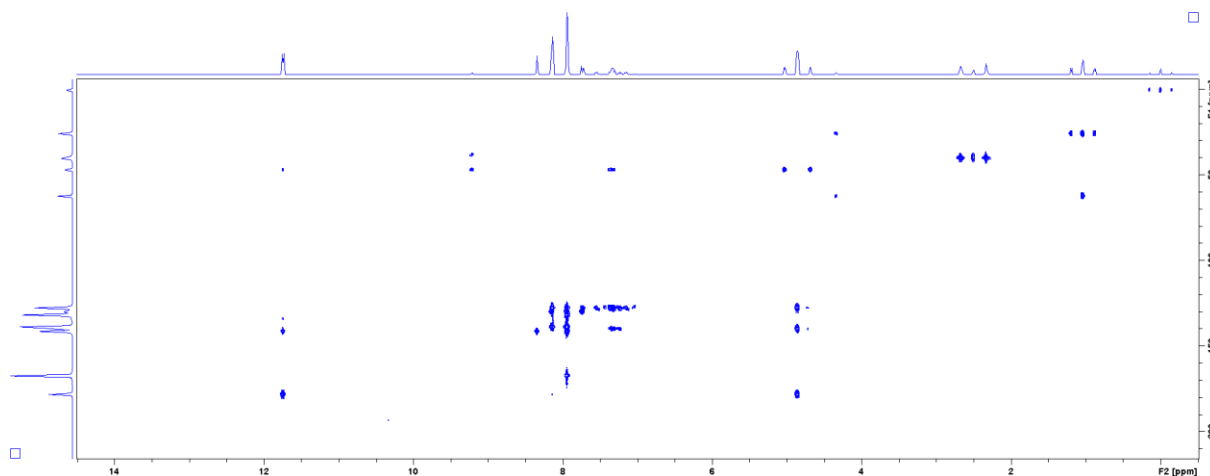
Slika 30. Strukturna formula i uži dio spektara  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona **d1** snimljen u  $\text{DMSO-}d_6$  pri 298 K.

Tablica 6. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  za spoj **d1** asignirani u DMSO-*d*6

Spoj d1	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	-
2	7,31
3	7,28
4	7,23
5	7,28
6	7,31
7	4,73
8	-
8a	8,28
8b	8,74
9	4,51

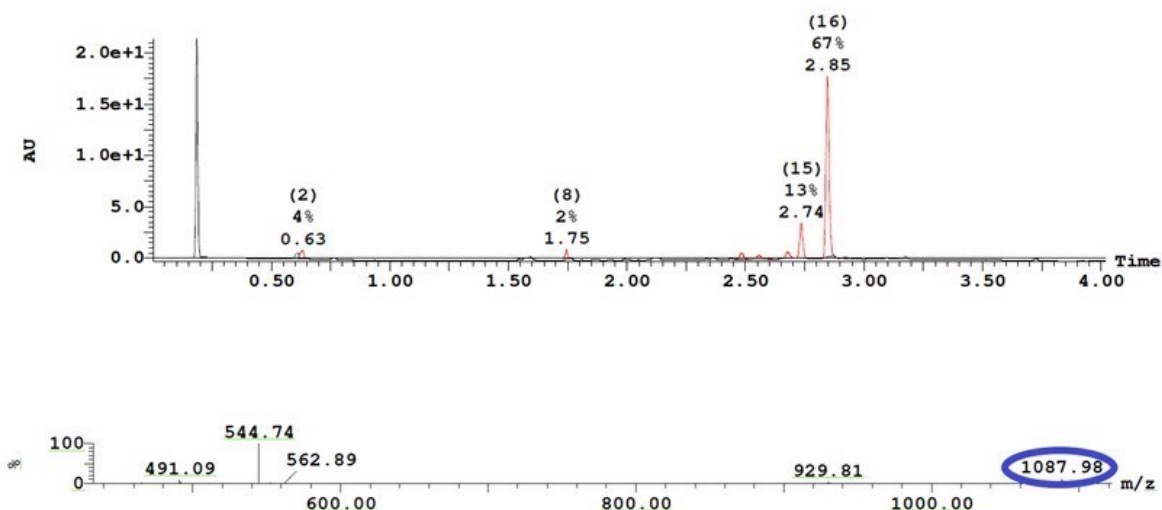
Reakcijom 4-formilbenzojeve kiseline (211 mg) i spoja **d1** (213 mg) uz dodatak ledene octene kiseline (6,7  $\mu\text{L}$ ) pripremljen je tiosemikarbazid **e1** (314 mg) čija je struktura prikazana na Slici 31. Prinos reakcije bio je 85 %. Struktura spoja **e1** potvrđena je snimanjem jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR (Slika 32., Dodatak D1 – D3). Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **e1** prikazani su u Tablici 7.

Slika 31. Strukturna formula spoja **e1**.

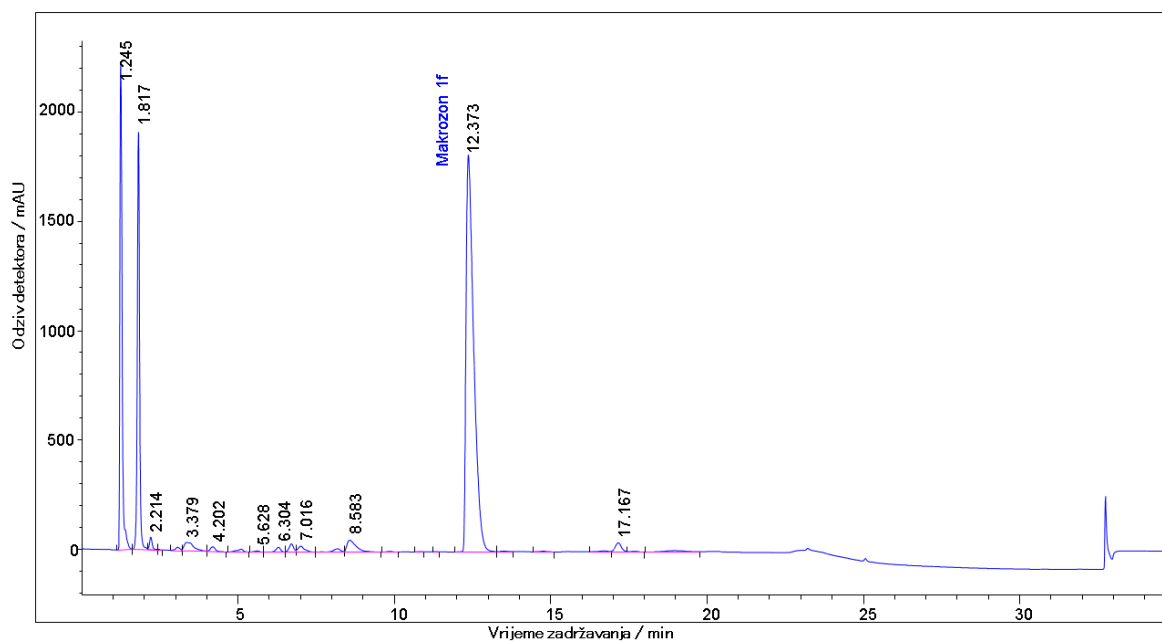
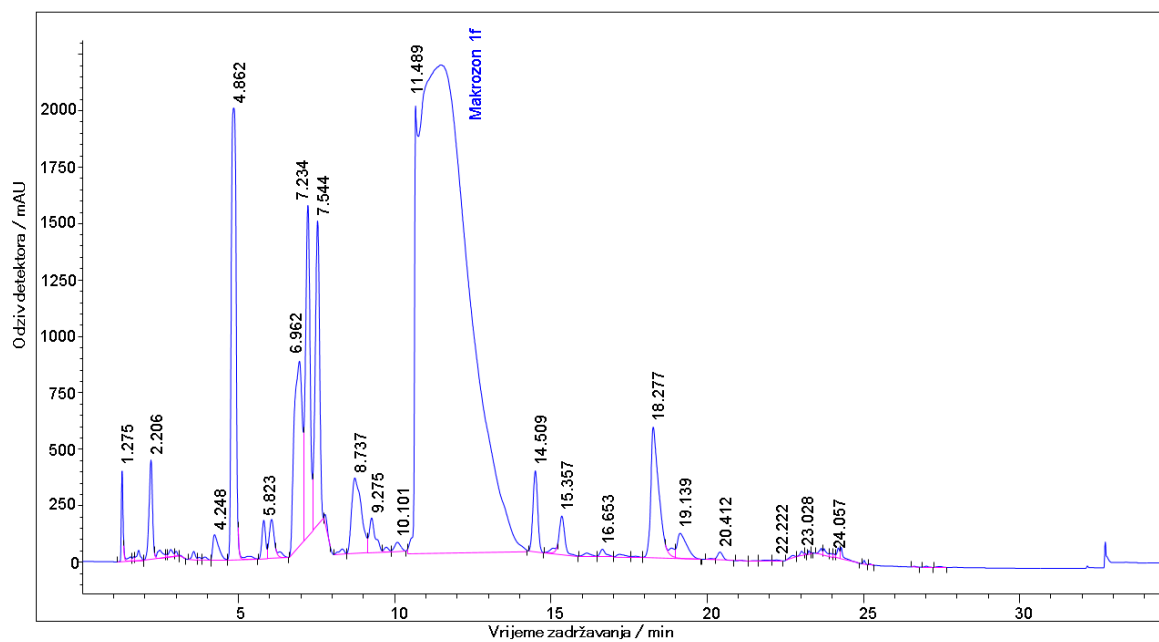
Slika 32. Spektar HMBC spoja **e1** snimljen u DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 298 K.Tablica 7. Kemijski pomaci <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C za spoj **e1** asignirani u DMSO-*d*<sub>6</sub>

Spoj <b>e1</b>		
Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm
1	-	131,6
2	7,95	130,7
3	7,95	127,7
4	-	140,6
5	7,95	127,7
6	7,95	130,7
7	-	167,7
7OH	13,05	-
8	8,14	141,8
8a	11,76	-
8b	9,23	-
9	-	177,7
10	4,85	47,3
11	-	139,9
12	7,35	127,4
13	7,33	129,9
14	7,24	127,1
15	7,33	129,2
16	7,35	127,4

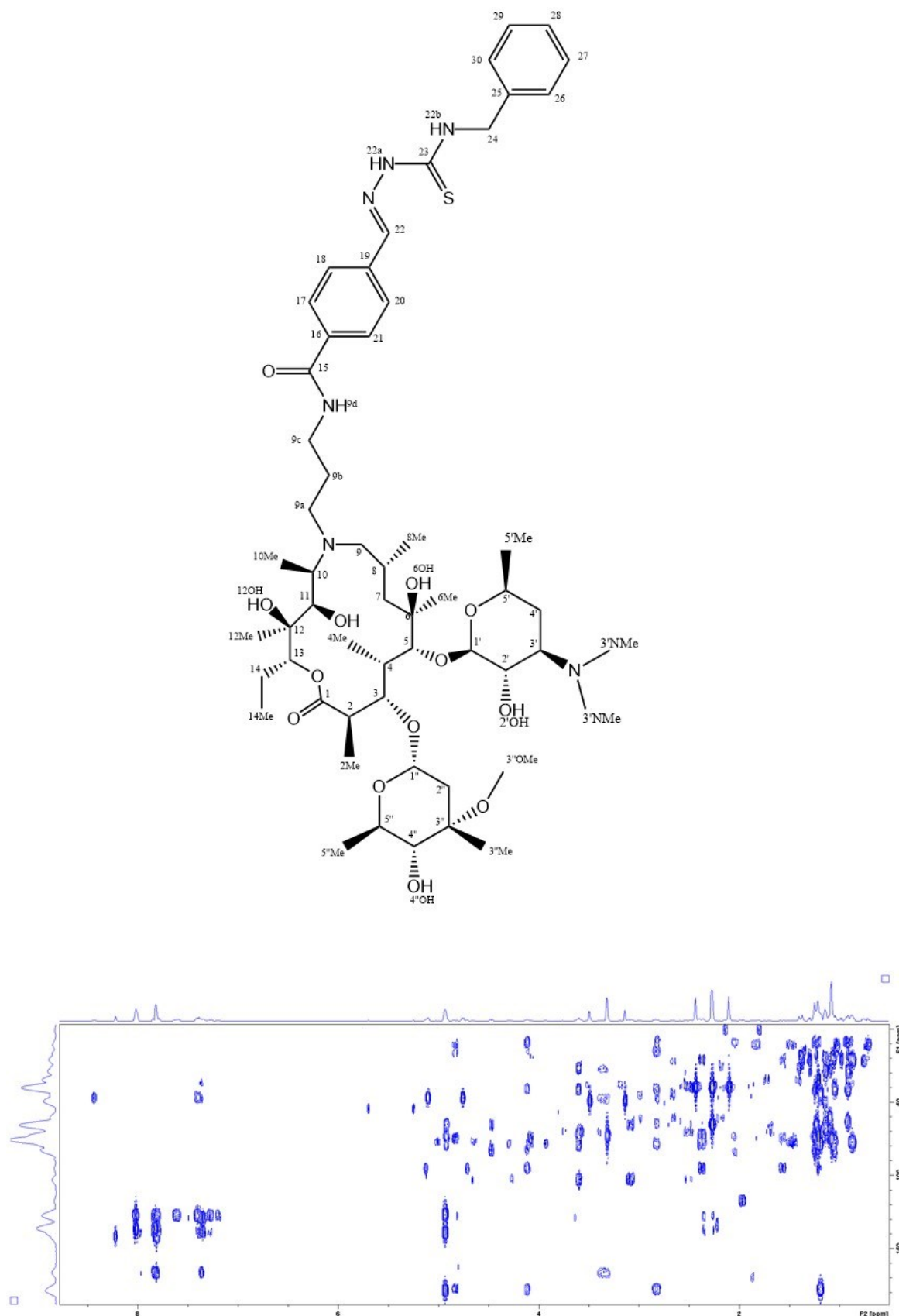
Reakcijom amidacije između spoja **e1** i prekursora **c** uz HATU i DIPEA u diklormetanu pripremljen je konačni produkt **f1**. Reakcijska smjesa analizirana je tehnikom LC-MS i potvrđena je prisutnost spoja **f1** u smjesi. Spektar masa za spoj **f1** prikazan je na Slici 33. Kromatogram reakcijske smjese prikazan je na Slici 34. Nakon pročišćavanja reakcijske smjese kromatografijom na stupcu frakcije su također analizirane tehnikom HPLC. Reprezentativni kromatogram odabrane frakcije prikazan je na Slici 35. Metodom normalizacije pikova određeno je da je udio spoja **f1** u toj frakciji 69,18 %. Struktura spoja **f1** predložena je na temelju snimljenih spektara NMR (Slika 36., Dodatak D4 – D6). U Tablici 8. prikazani su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f1** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .



Slika 33. Spektar masa makrozona **f1**.

Slika 34. Kromatogram reakcijske smjese spoja **f1**.Slika 35. Kromatogram spoja **f1** nakon pročišćavanja, frakcija 19.



Slika 36. Spektar HMBC i predložena struktura spoja **f1**.

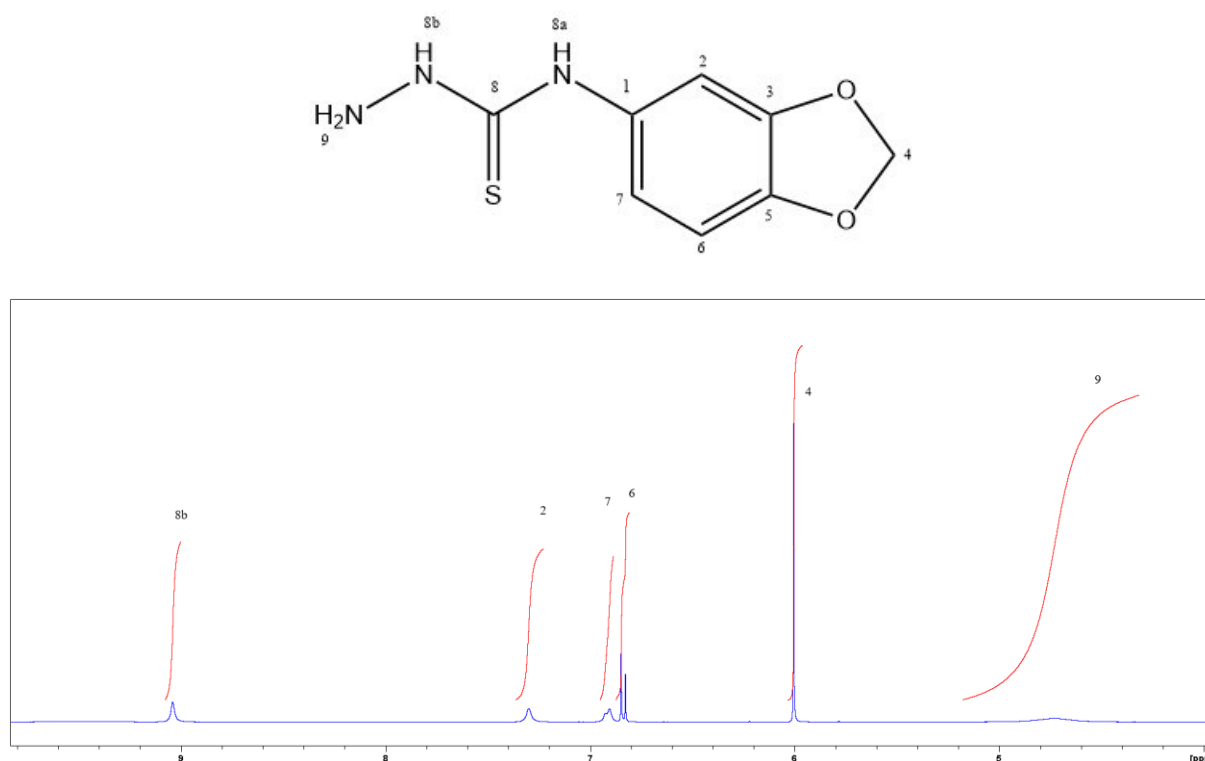
Tablica 8. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f1** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ 

Spoj		Makrozon f1			
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	177,56	17; 21	7,83	127,63
2	2,81	48,84	18; 20	7,81	127,33
2Me	1,19	14,55	19	-	136,60
3	4,10	78,43	22	8,01	141,72
4	2,03	40,87	22a	- <sup>a</sup>	-
4Me	1,04	9,12	22b	8,44	-
5	3,58	83,09	23	-	178,90
6	-	73,86	24	4,92	47,07
6Me	1,24	27,05	25	-	138,80
6OH	- <sup>a</sup>	-	26; 30	7,39	127,33
7eq; 7ax	1,53; 1,46	41,32	27; 29	7,35	128,39
8	1,97	28,16	28	7,26	127,05
8Me	0,90	22,06	1'	4,46	102,55
9eq; 9ax	2,64; 2,16	63,71	2'	3,07	70,82
9a	3,03; 2,60	47,72	2'OH	- <sup>a</sup>	-
9b	1,85; 1,73	27,21	3'	2,49	65,32
9c	3,34	37,95	3'NMe <sub>2</sub>	2,27	37,79
9d	7,36	-	4'eq; 4'ax	1,68; 1,10	28,86
10	2,81	60,67	5'	3,58	68,11
10Me	1,09	8,73	5'Me	1,13	20,89
11	3,66	74,71	1''	4,91	95,27
11OH	- <sup>a</sup>	-	2''eq; 2''ax	2,36; 1,54	34,71
12	-	74,66	3''	-	73,00
12Me	1,07	16,92	3''Me	1,20	20,64
12OH	- <sup>a</sup>	-	3''OMe	3,31	48,90
13	4,83	77,33	4''	2,95	78,09
14eq; 14ax	1,81; 1,47	21,17	4''OH	- <sup>a</sup>	-
14Me	0,87	10,59	5''	4,07	65,32
15	-	166,50	5''Me	1,22	18,10
16	-	136,60			

-<sup>a</sup> nije asignirano

#### 4.2. Benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozon (f2)

Kako bi se sintetizirao benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozon, **f2**, bilo je potrebno prvo sintetizirati odgovarajući tiosemikarbazon, **d2**, te tiosemikarbazid, **e2**. Reakcijom spoja **2** (358 mg) s hidrazin-monohidratom (0,23 mL) u propan-2-olu nastaje produkt **d2** bijele boje (335 mg). Iskorištenje reakcije bilo je 79 %, a struktura spoja **d2** potvrđena je snimanjem spektra  $^1\text{H}$  NMR (Slika 37., Tablica 9.).



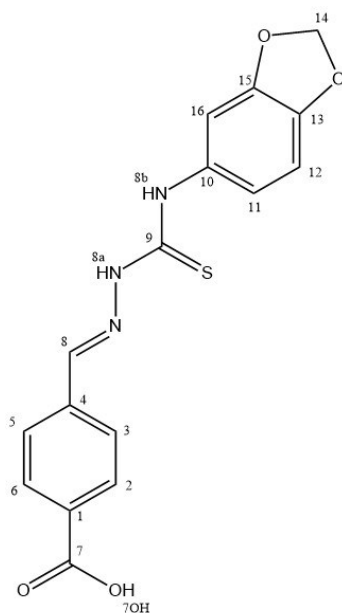
Slika 37. Struktura i uži dio spektra  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona **d2** snimljen u DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 298 K.

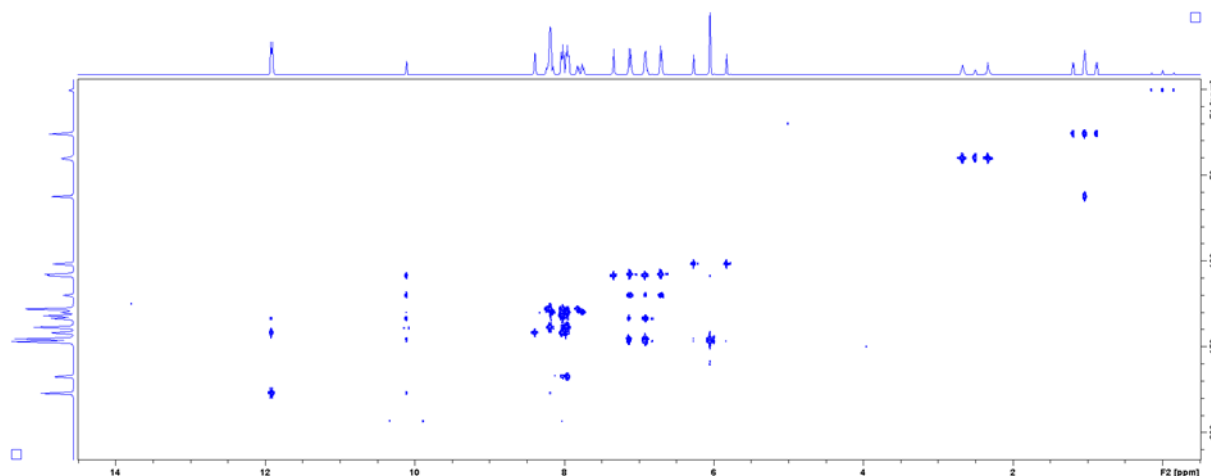
Tablica 9. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  za spoj **d2** asignirani u DMSO-*d*6

Spoj d2	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	-
2	7,29
3	-
4	6,0
5	-
6	6,82
7	6,90
8	-
8a	- <sup>a</sup>
8b	9,03
9	4,72

<sup>a</sup> nije asignirano

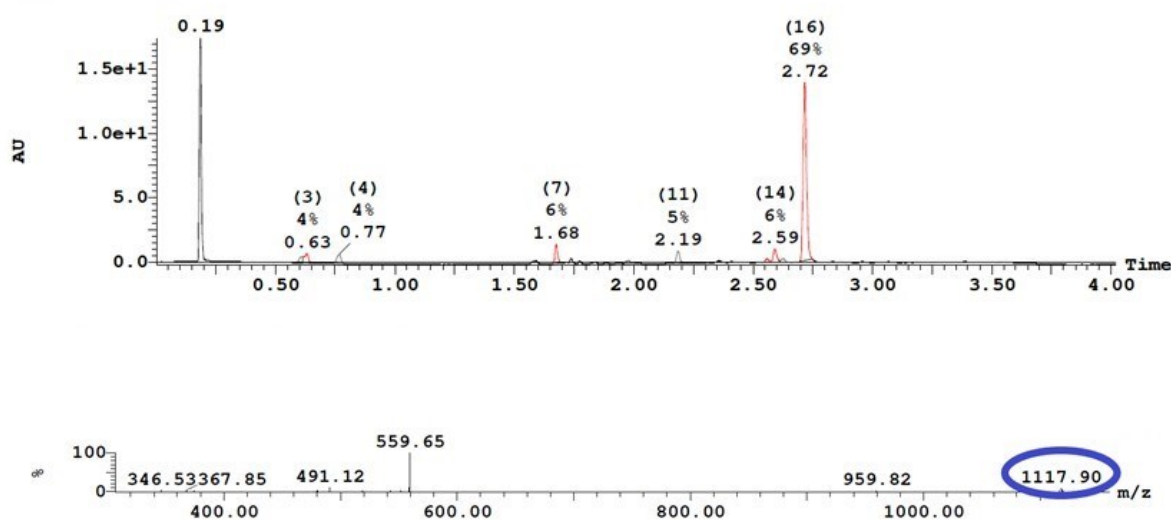
Reakcijom spoja **d2** (332 mg) i 4-formilbenzojeve kiseline (303 mg) uz dodatak ledene octene kiseline (9,5  $\mu\text{L}$ ) pripremljen je tiosemikarbazid **e2** (460 mg). Prinos reakcije bio je 79 %. Struktura spoja prikazana je na Slici 38. i potvrđena je snimanjem jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR (Slika 39., Dodatak D7 - D10). Kemijski pomaci spoja **e2** prikazani su u Tablici 10.

Slika 38. Strukturna formula spoja **e2**.

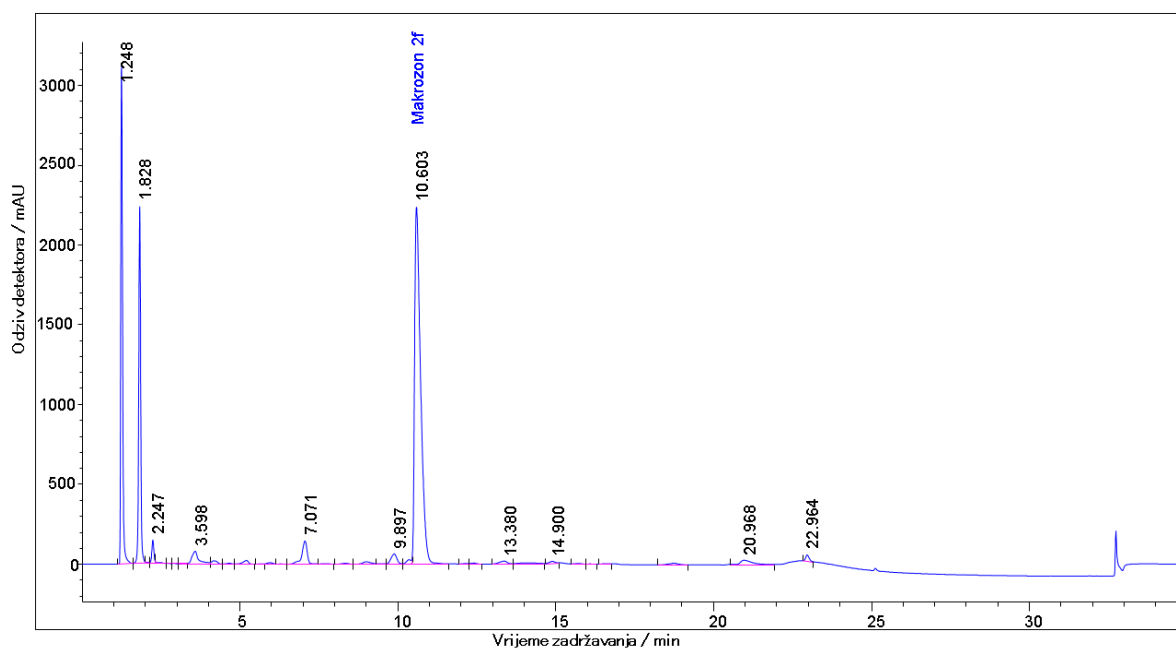
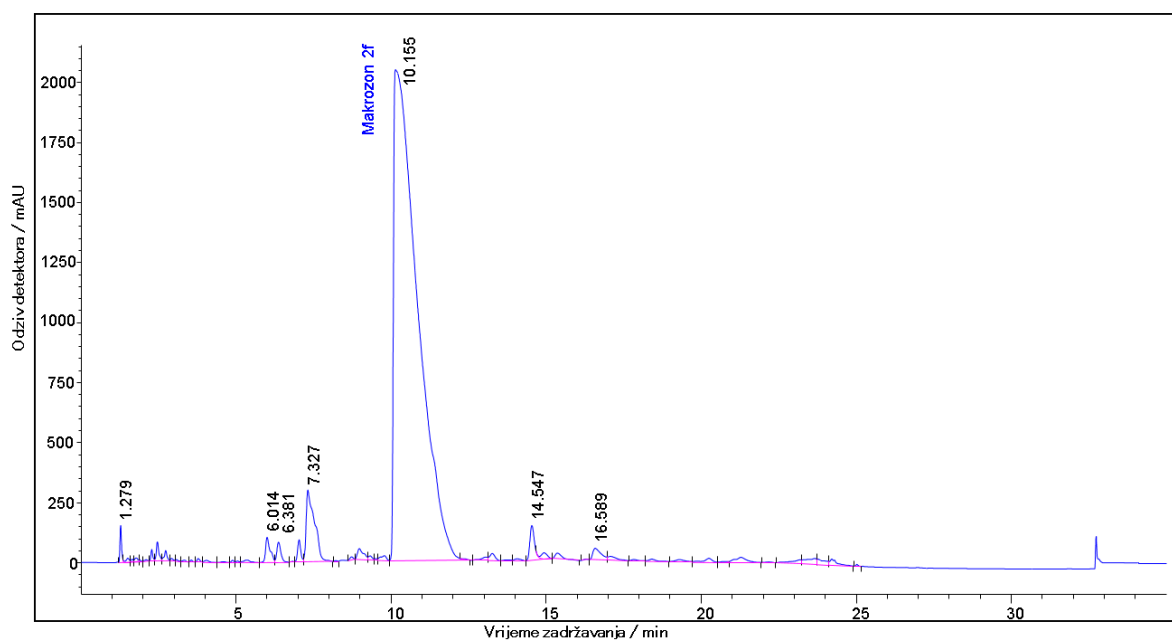
Slika 39. Spektar HMBC spoja **e2** snimljen u DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 298 K.Tablica 10. Kemijski pomaci <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C za spoj **e2** asignirani u DMSO-*d*<sub>6</sub>

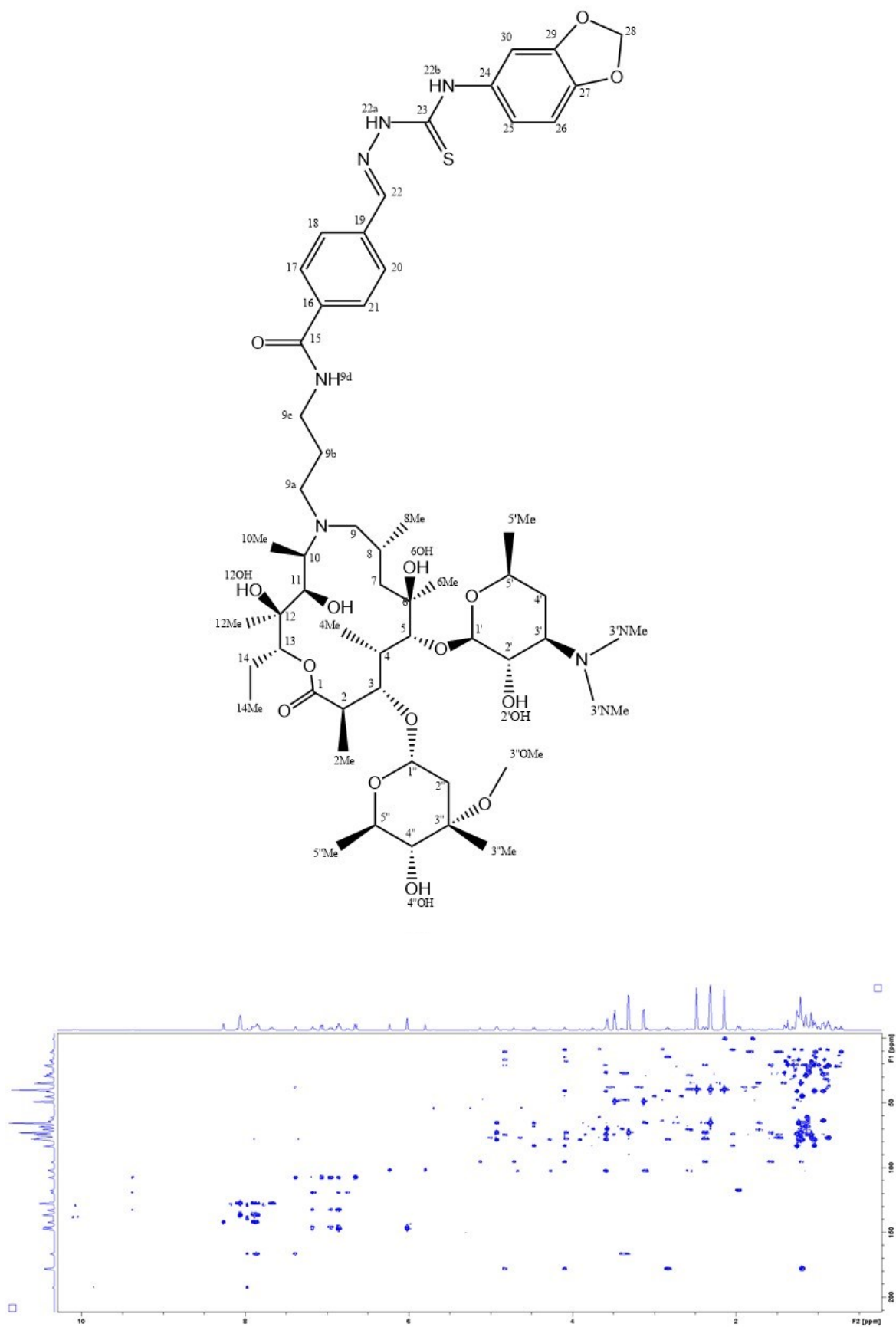
Spoj <b>e2</b>		
Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm
1	-	133,4
2	8,01	130,2
3	7,97	128
4	-	138,9
5	7,97	128
6	8,01	130,2
7	-	167,6
7OH	13,03	-
8	8,19	142
8a	11,92	-
8b	10,11	-
9	-	177,1
10	-	132
11	6,92	120,2
12	6,91	108,6
13	-	145,4
14	6,05	101,7
15	-	147,2
16	7,13	108,1

Konačni produkt **f2** pripremljen je reakcijom amidacije između tiosemikarbazida **e2** (25 mg) i prekursora **c** uz HATU i DIPEA u diklormetanu. Prisutnost spoja **f2** u smjesi potvrđena je tehnikom LC-MS. Spektar masa za spoj **f2** prikazan je na Slici 40. Kromatogram reakcijske smjese prikazan je na Slici 41. Reakcijska smjesa pročišćena je kromatografijom na stupcu nakon čega su frakcije analizirane tehnikom HPLC. Reprezentativni kromatogram odabrane frakcije prikazan je na Slici 42. Metodom normalizacije pikova određeno je da je udio spoja **f2** u toj frakciji 85,36 %. Struktura spoja **f2** predložena je na temelju snimljenih spektara NMR (Slika 43., Dodatak D10 – D13). Tablica 11. prikazuje kemijske pomake  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f2** asignirane u acetonitrilu- $d_3$ .



Slika 40. Spektar masa makrozone **f2**.

Slika 41. Kromatogram reakcijske smjese spoja **f2**.Slika 42. Kromatogram spoja **f2** nakon pročišćavanja, frakcija 28.

Slika 43. Spektar HMBC i predložena struktura spoja **f2**.



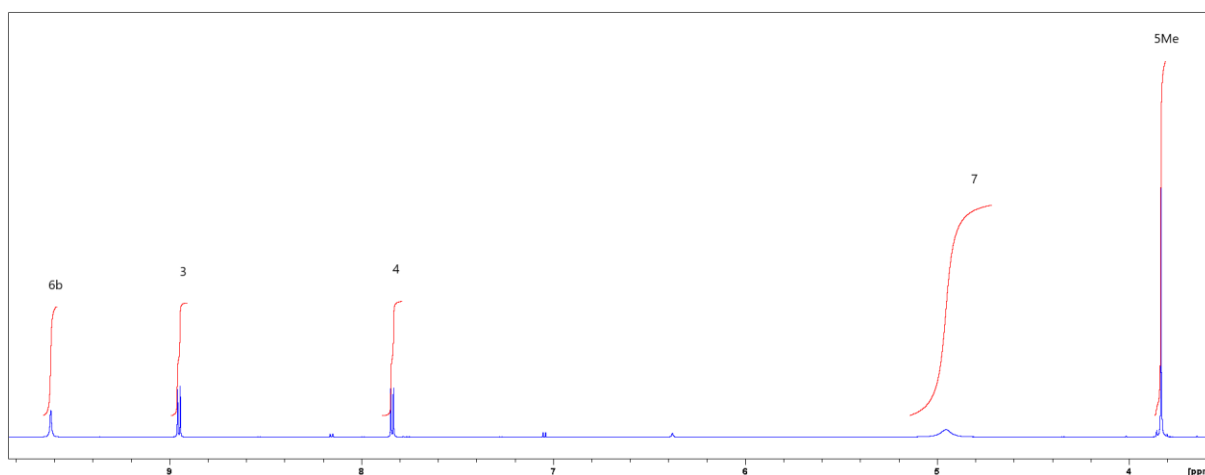
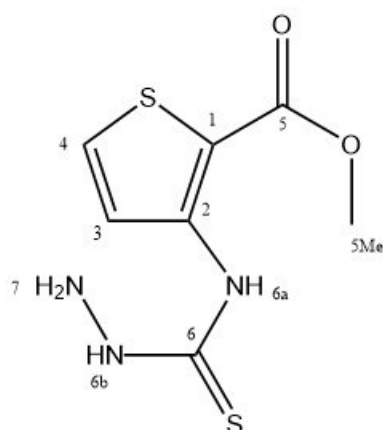
Tablica 11. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f2** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ 

Spoj			Makrozon f2		
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	177,79	18; 20	7,86	127,46
2	2,80	44,80	19	-	136,45
2Me	1,17	14,64	22	8,03	142,02
3	4,06	78,73	22a	- <sup>a</sup>	-
4	2,01	40,82	22b	9,35	-
4Me	1,01	9,04	23	-	- <sup>a</sup>
5	3,55	83,25	24	-	132,77
6	-	74,09	25	6,92	119,29
6Me	1,23	26,65	26	6,83	107,26
6OH	- <sup>a</sup>	-	27	-	147,22
7eq; 7ax	1,53, 1,45	41,02	28	5,99	101,68
8	1,98	27,89	29	-	145,74
8Me	0,91	21,93	30	7,15	107,60
9eq; 9ax	2,71; 2,22	63,69	1'	4,43	102,65
9a	3,06; 2,64	47,93	2'	3,07	70,76
9b	1,87; 1,74	27,00	2'OH	- <sup>a</sup>	-
9c	3,34	37,94	3'	2,54	63,54
9d	7,36	-	3'NMe <sub>2</sub>	2,28	39,63
10	2,86	61,15	4'eq; 4'ax	1,69; 1,11	28,89
10Me	1,10	8,59	5'	3,57	68,21
11	3,64	74,54	5'Me	1,12	20,81
11OH	- <sup>a</sup>	-	1''	4,89	95,42
12	-	74,83	2''eq; 2''ax	2,34; 1,54	34,61
12Me	1,05	16,89	3''	-	72,76
12OH	- <sup>a</sup>	-	3'Me	1,18	20,70
13	4,78	77,09	3''OMe	3,28	48,88
14eq; 14ax	1,79, 1,43	21,27	4''	2,94	77,83
14Me	0,84	10,39	4''OH	- <sup>a</sup>	-
15	-	166,47	5''	4,04	65,34
16	-	136,15	5''Me	1,21	18,01
17; 21	7,82	127,46			

-<sup>a</sup> nije asignirano

### 4.3. Metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozon (f3)

Za sintezu metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozona, **f3**, prvo je sintetiziran odgovarajući tiosemikarbazon, **d3**, a zatim tiosemikarbazid, **e3**. Reakcijom spoja **3** (0,316 g) s hidrazin monohidratom (0,23 mL) u propan-2-olu istaložio je produkt **d3** bijele boje (312 mg). Iskorištenje reakcije bilo je 67 %. Struktura spoja **d3** potvrđena je snimanjem spektra  $^1\text{H}$  NMR (Slika 44.) Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  za spoj **d3** prikazani su u Tablici 12.



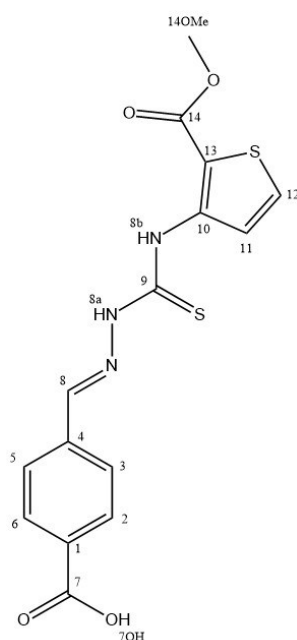
Slika 44. Strukturna formula i uži dio spektara  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona **d3** snimljen u  $\text{DMSO-}d_6$  pri 298 K.

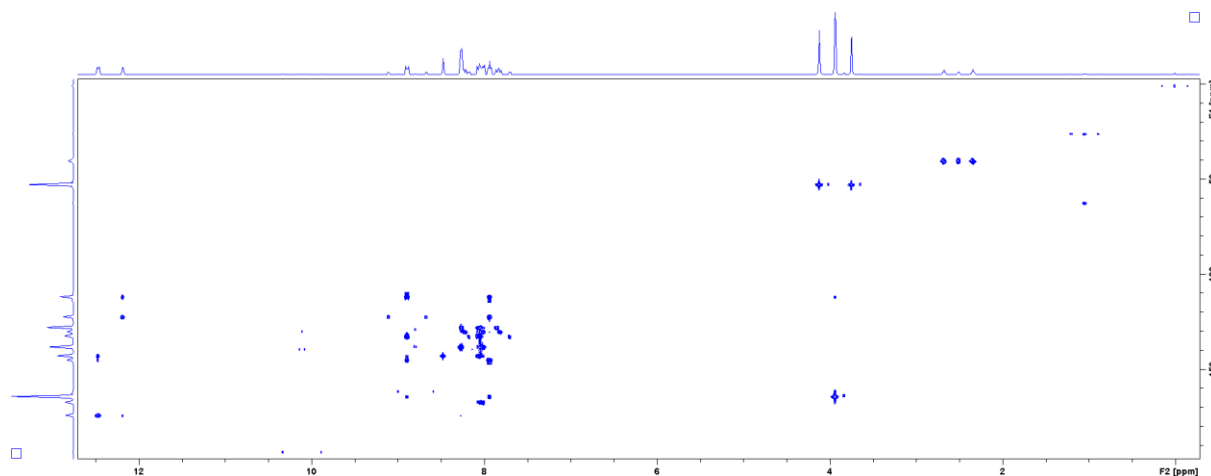
Tablica 12. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  za spoj **d3** asignirani u DMSO-*d*6

Spoj <b>d3</b>	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	-
2	-
3	8,94
4	7,84
5	-
5Me	3,82
6	-
6a	- <sup>a</sup>
6b	9,61
7	4,95

<sup>a</sup> nije asignirano

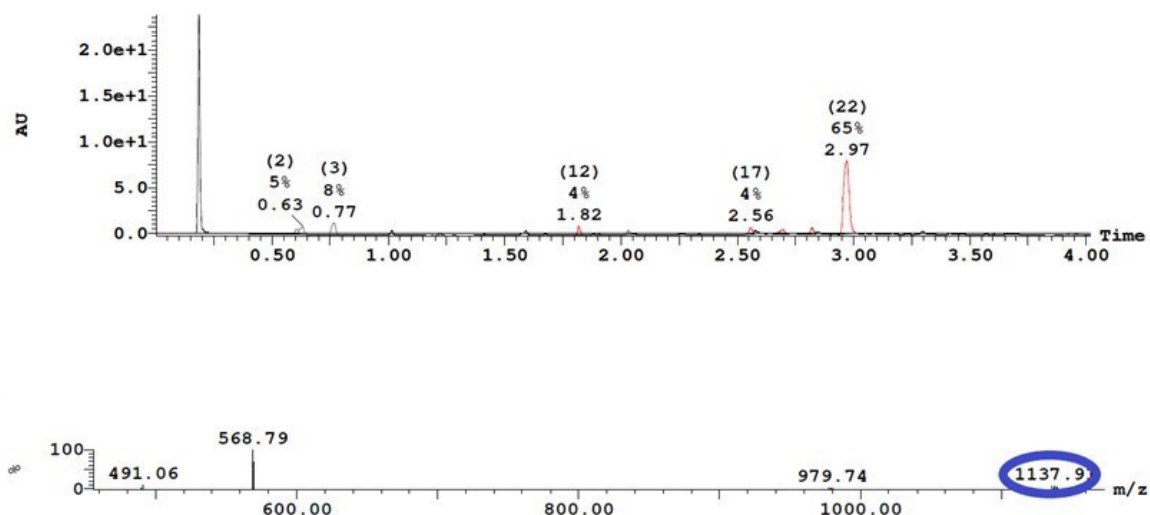
Reakcijom 4-formilbenzojeve kiseline (239 mg) i spoja **d3** (308 mg) uz dodatak ledene octene kiseline (7,6  $\mu\text{L}$ ) pripremljen je tiosemikarbazid **e3** (413 mg) čija je struktura prikazana na Slici 45. Prinos reakcije bio je 86 %. Struktura spoja **e3** potvrđena je snimanjem jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR (Slika 46., Dodatak D14 – D16). Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **e3** prikazani su u Tablici 13.

Slika 45. Strukturna formula tiosemikarbazida **e3**.

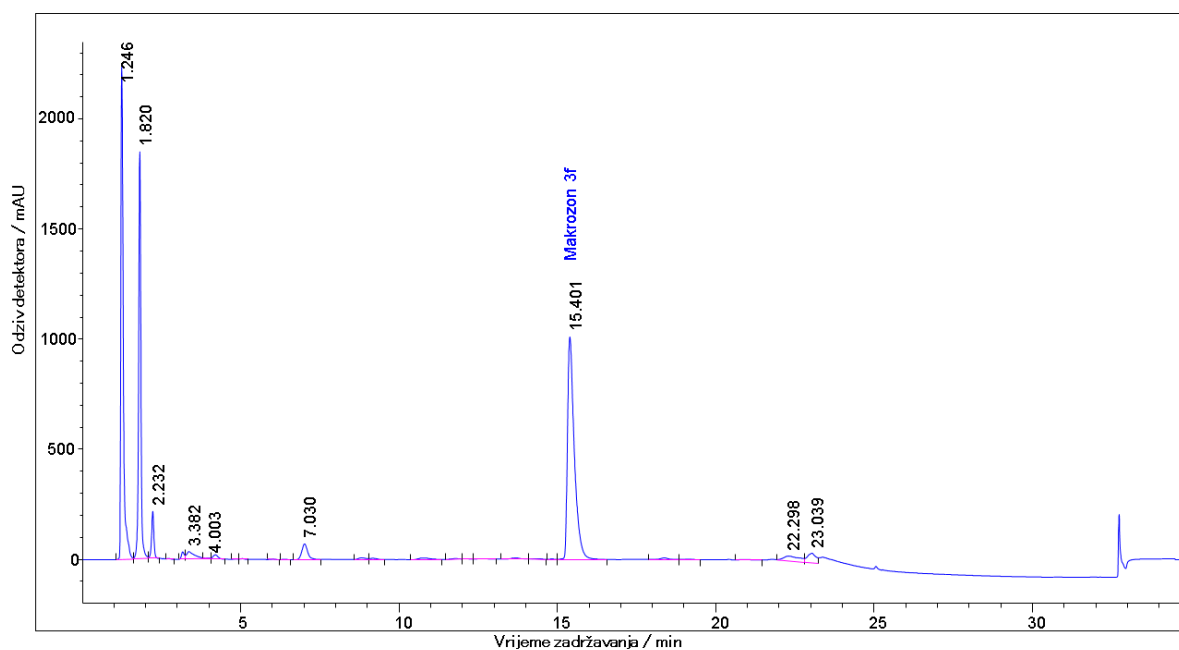
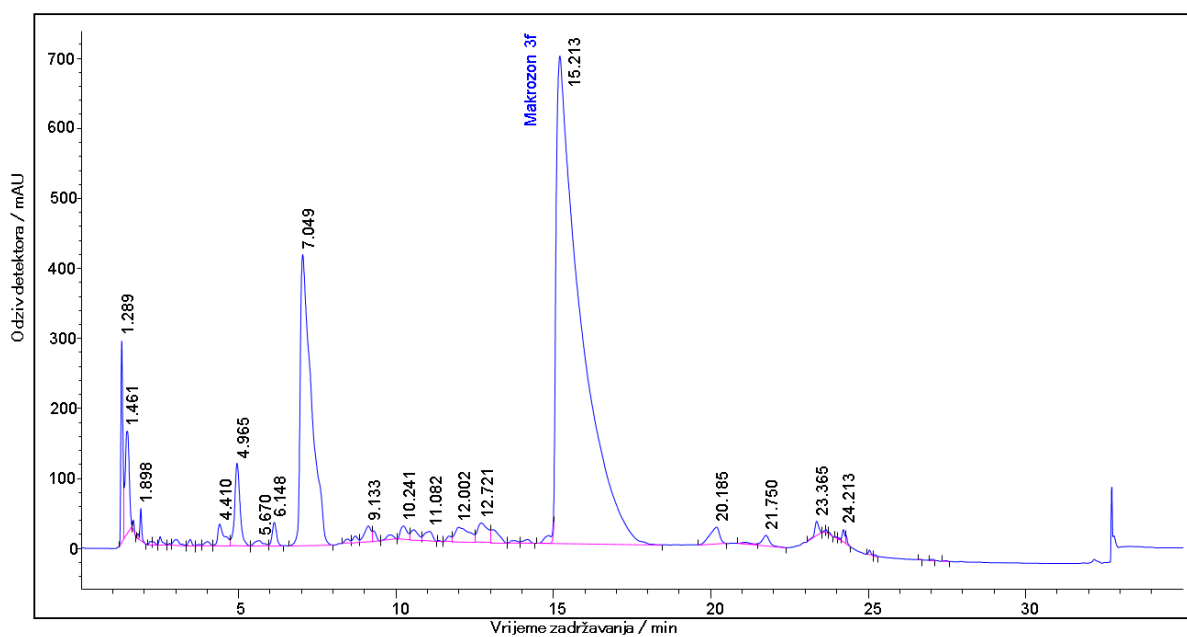
Slika 46. Spektar HMBC spoja **e3** snimljen u DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 298 K.Tablica 13. Kemijski pomaci <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C za spoj **e3** asignirani u DMSO-*d*<sub>6</sub>

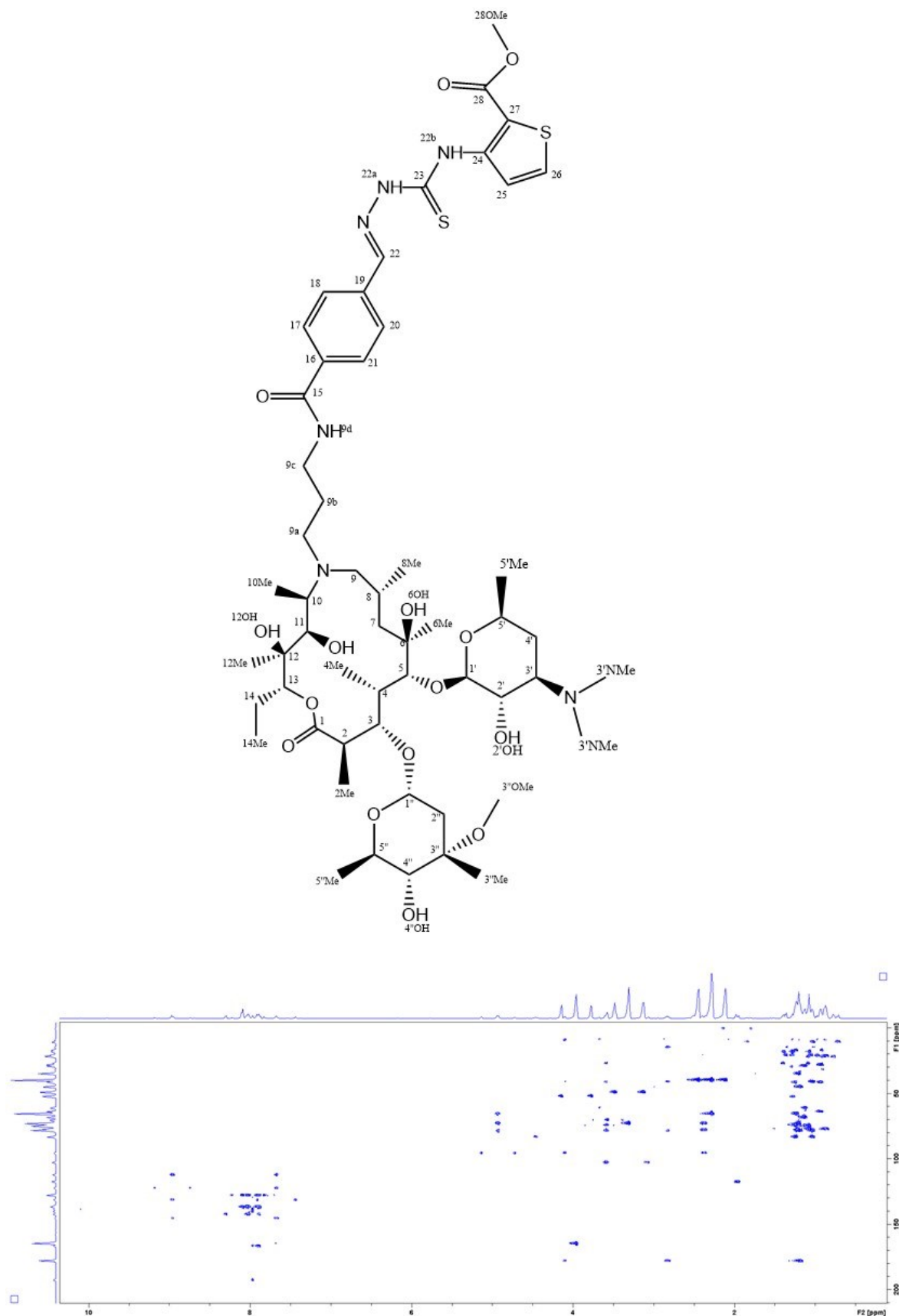
Spoj <b>e3</b>		
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	132,8
2	8,02	128,3
3	8,07	131,4
4	-	145,2
5	8,07	128,3
6	8,02	131,4
7	-	173,3
7OH	13,13	-
8	8,26	143,8
8a	12,47	-
8b	12,18	-
9	-	175,7
10	-	141,9
11	8,89	122,6
12	7,93	131,9
13	-	113,0
14	-	168,2
14OMe	3,93	53,3

Reakcijom amidacije između spoja **e3** i prekursora **c** uz HATU i DIPEA u diklormetanu pripremljen je konačni produkt **f3**. Prisutnost spoja **f3** u reakcijskoj smjesi potvrđena je pomoću tehnike LC-MS. Slika 47. prikazuje spektar masa za spoj **f3**. Reakcijska smjesa, kao i frakcije pročišćene kromatografijom na stupcu, analizirane su tehnikom HPLC. Kromatogram reakcijske smjese prikazan je na Slici 48. dok je na Slici 49. prikazan reprezentativni kromatogram odabrane frakcije. Metodom normalizacije pikova određeno je da je udio spoja **f3** u toj frakciji 64,62 %. Struktura spoja **f3** predložena je na temelju snimljenih spektara NMR (Slika 50., Dodatak D17 – D19). U Tablici 14. prikazani su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f3** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .



Slika 47. Spektar masa makrozona **f3**.

Slika 48. Kromatogram reakcijske smjese spoja **f3**.Slika 49. Kromatogram spoja **f3** nakon pročišćavanja, frakcija 18.

Slika 50. Spektar HMBC i predložena struktura spoja **f3**.

Tablica 14. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **3f** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ 

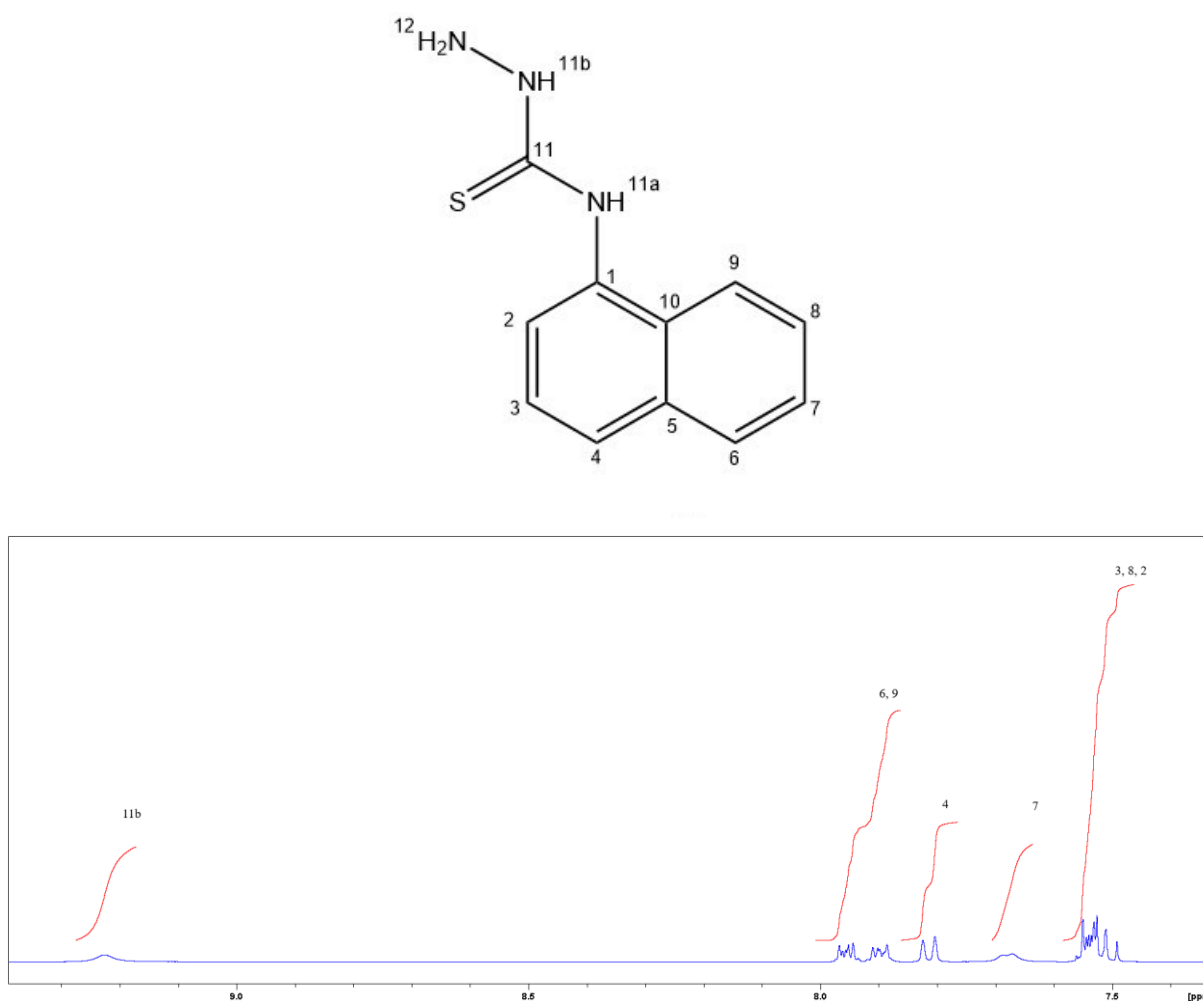
Spoj		Makrozon f3			
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	178,02	17; 21	7,90	127,68
2	2,83	44,83	18; 20	8,03	127,59
2Me	1,19	14,58	19	-	136,62
3	4,11	78,54	22	8,10	142,31
4	2,05	40,93	22a	- <sup>a</sup>	-
4Me	1,03	8,96	22b	- <sup>a</sup>	-
5	3,59	83,16	23	-	- <sup>a</sup>
6	-	74,21	24	-	145,60
6Me	1,24	26,79	25	8,96	122,21
6OH	- <sup>a</sup>	-	26	7,69	131,21
7eq; 7ax	1,55; 1,48	41,39	27	-	112,31
8	2,01	27,95	28	-	164,47
8Me	0,92	21,90	28OMe	3,97	51,75
9eq; 9ax	2,74; 2,23	64,01	1'	4,46	102,66
9a	3,07; 2,68	47,73	2'	3,09	71,02
9b	1,91; 1,78	27,03	2'OH	- <sup>a</sup>	-
9c	3,37	37,95	3'	2,53	65,33
9d	- <sup>a</sup>	-	3'Nme <sub>2</sub>	2,28	39,71
10	2,86	61,02	4'eq; 4'ax	1,69; 1,10	28,87
10Me	1,12	8,58	5'	3,58	68,11
11	3,67	74,54	5'Me	1,14	20,86
11OH	- <sup>a</sup>	-	1''	4,95	95,36
12	-	74,92	2''eq; 2''ax	1,58; 2,39	34,44
12Me	1,07	16,66	3''	-	72,91
12OH	- <sup>a</sup>	-	3''Me	1,20	20,64
13	4,81	77,07	3''OMe	3,30	48,80
14eq; 14ax	1,83; 1,47	21,33	4''	2,97	77,88
14Me	0,86	10,48	4''OH	- <sup>a</sup>	-
15	-	166,48	5''	4,09	65,47
16	-	136,30	5''Me	1,24	17,92

<sup>a</sup> nije asignirano



#### 4.4. 2-naftil-makrozon (f4)

Za sintezu 2-naftil-makrozona, **f4**, prvo je bilo potrebno sintetizirati odgovarajući tiosemikarbazon, **d4**, a zatim tiosemikarbazid, **e4**. Reakcijom spoja **4** (0,370 g) s hidrazin monohidratom (0,23 mL) u propan-2-olu istaložio je produkt bijele boje (231 mg) uz iskorištenje reakcije od 53 %. Struktura tiosemikarbazona **d4** potvrđena je snimanjem spektra  $^1\text{H}$  NMR (Slika 51., Tablica 15.).



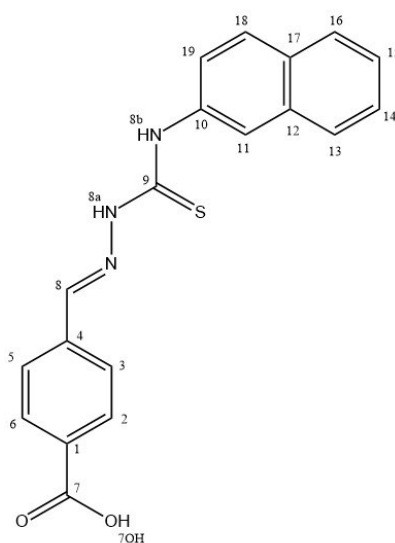
Slika 51. Struktura i užii dio spektra  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona **d4** snimljen u DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 298 K.

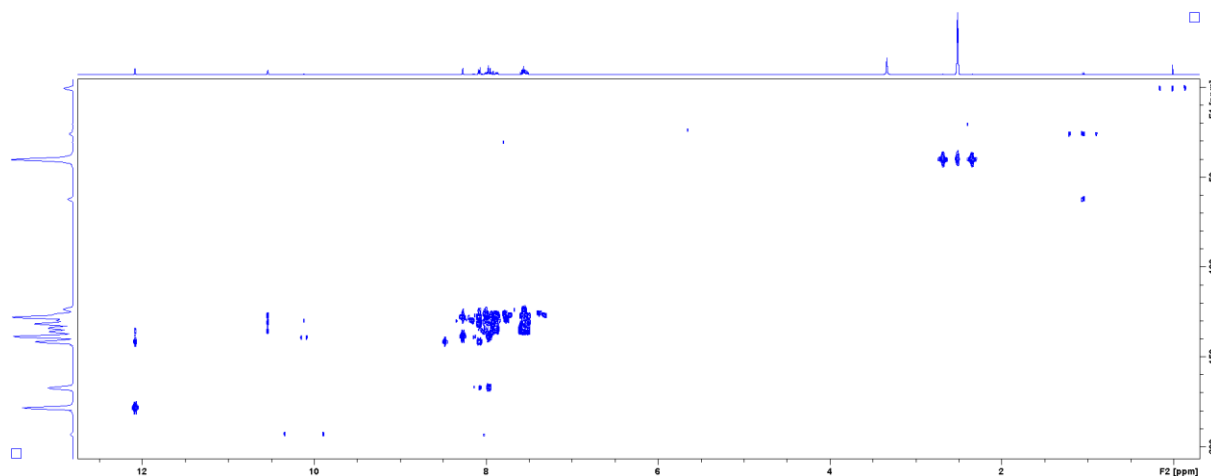
Tablica 15. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  za spoj **d4** asignirani u DMSO- $d_6$ 

Spoj 4d	
Atom	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) / ppm
1	-
2	7,49
3	7,55
4	7,80
5	-
6	7,96
7	7,68
8	7,52
9	7,91
10	-
11	-
11a	- <sup>a</sup>
11b	9,22
12	-

<sup>a</sup> nije asignirano

Reakcijom spoja **d4** (228 mg) s 4-formilbenzojevom kiselinom (189 mg) uz dodatak ledene octene kiseline (6,0  $\mu\text{L}$ ) pripremljen je tiosemikarbazid **e4** (332 mg) čija je struktura prikazana na Slici 52. Prinos reakcije bio je 90 %. Struktura spoja **e4** potvrđena je snimanjem jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR (Slika 53., Dodatak D20 – D22). Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **e4** prikazani su u Tablici 16.

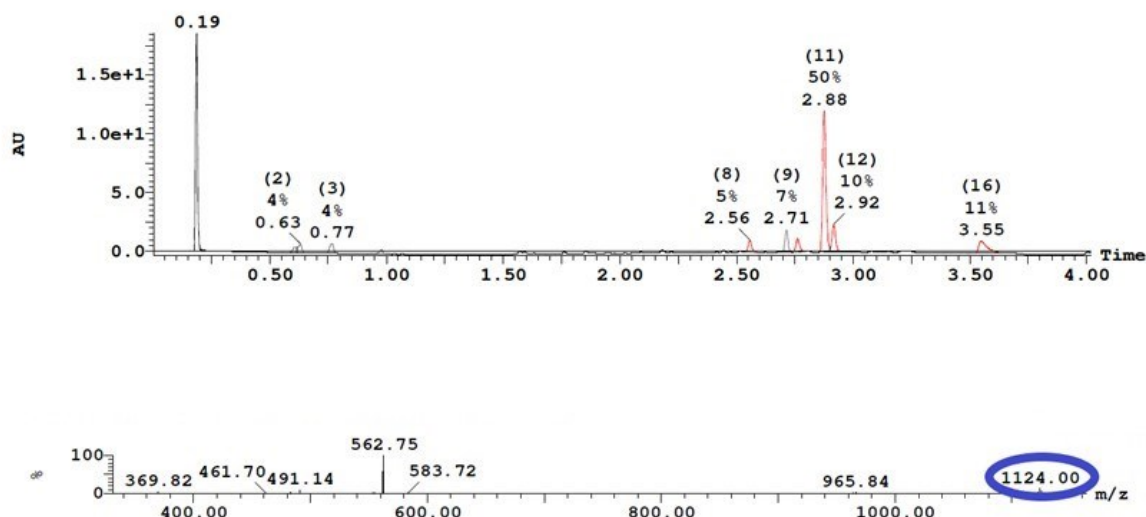
Slika 52. Strukturna formula spoja **e4**.

Slika 53. Spektar HMBC spoja **e4** snimljen u DMSO-*d*6 pri 298 K.Tablica 16. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **e4** asignirani u DMSO-*d*6

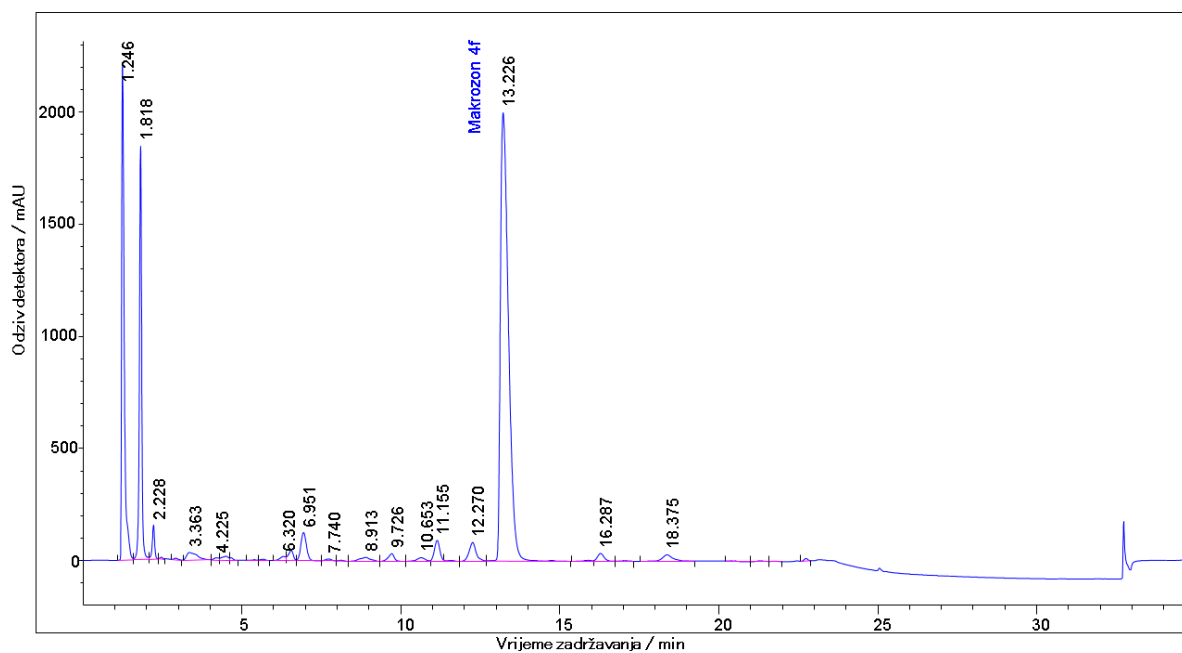
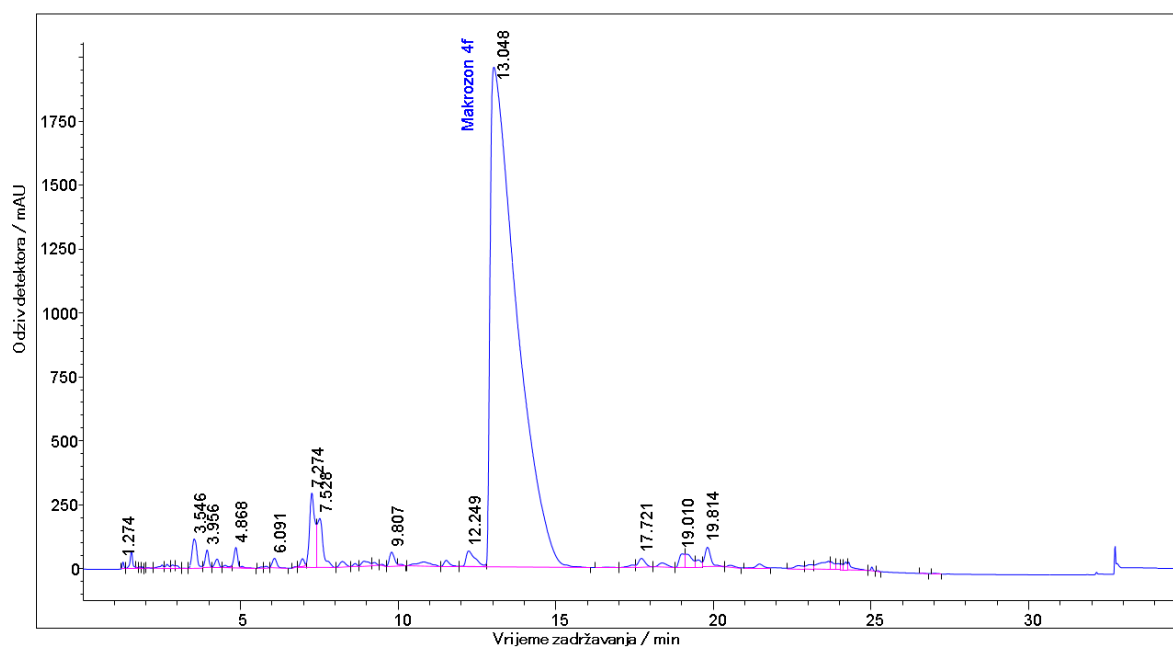
Spoj <b>e4</b>		
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
1	-	130,7
2	8,08	130,4
3	7,99	128,3
4	-	142
5	7,99	128,3
6	8,08	130,4
7	-	179
7OH	12,08	-
8	8,26	141,8
8a	10,53	-
8b	10,11	-
9	-	193,8
10	-	139,6
11	7,5	126,2
12	-	131,3
13	7,94	124,8
14	7,57	125,7
15	7,52	126,8
16	7,97	127
17	-	126,9
18	7,55	127,8
19	7,87	123,4

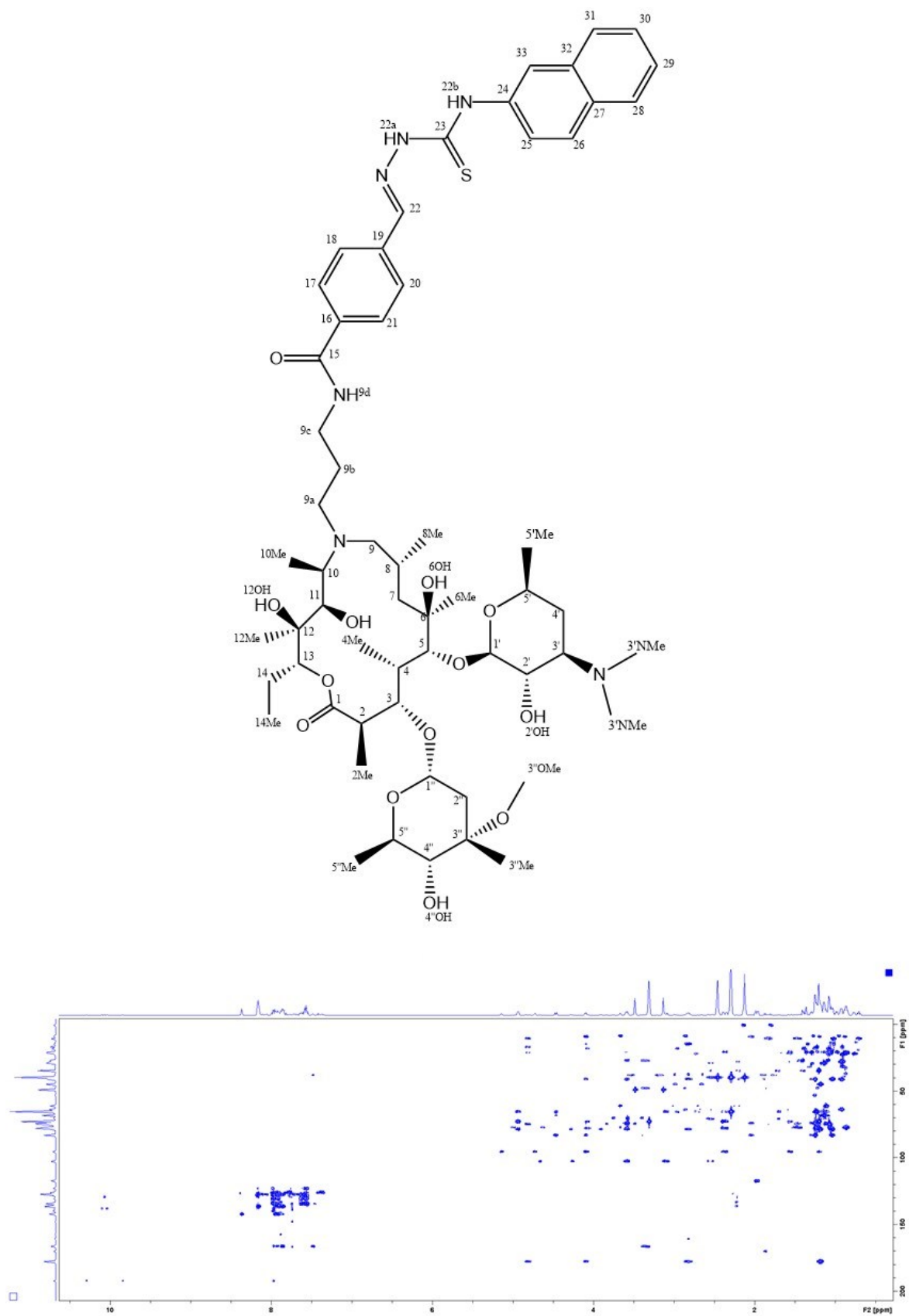
Konačni produkt **f4** pripremljen je reakcijom amidacije između spoja **e4** i prekursora **c** uz HATU i DIPEA u diklormetanu. Tehnikom LC-MS potvrđena je prisutnost spoja **f4** u reakcijskoj smjesi. Spektar masa za spoj **f4** prikazan je na Slici 54., a kromatogram reakcijske smjese nakon analize tehnikom HPLC na Slici 55. Reakcijska smjesa pročišćena je kromatografijom na stupcu nakon čega su frakcije analizirane tehnikom HPLC. Reprezentativni kromatogram odabrane frakcije prikazan je na Slici 56. Metodom normalizacije pikova određeno je da je udio spoja **f4** u toj frakciji 84,62 %. Struktura spoja **f4** predložena je na temelju snimljenih spektara NMR (Slika 57., Dodatak D23 – D25).

Tablica 17. prikazuje kemijske pomake  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f4** asignirane u acetonitrilu- $d_3$ .



Slika 54. Spektar masa makrozona **f4**.

Slika 55. Kromatogram reakcijske smjese spoja **f4**.Slika 56. Kromatogram spoja **f4** nakon pročišćavanja, frakcija 22.

Slika 57. Spektar HMBC i predložena struktura spoja **f4**.

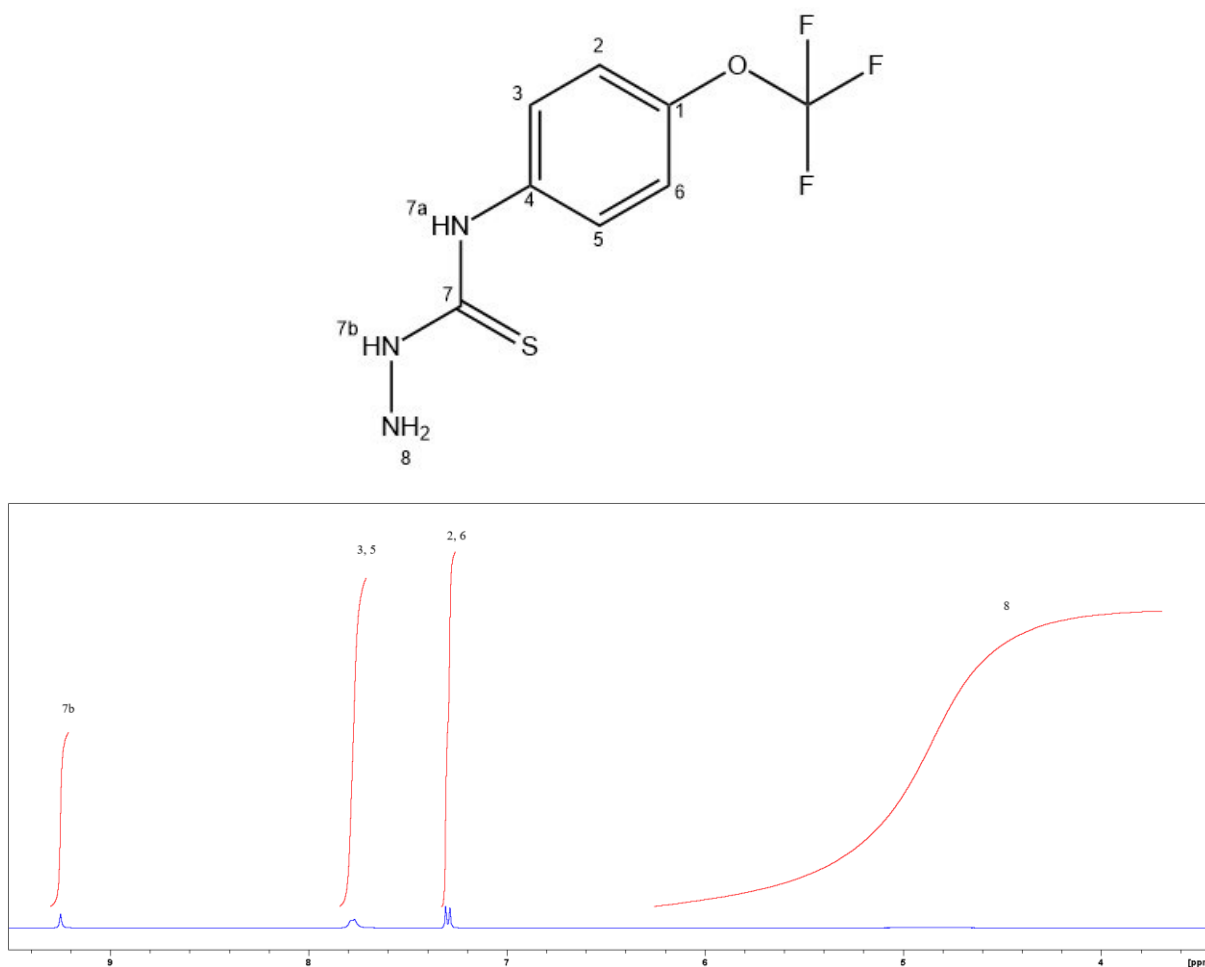
Tablica 17. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f4** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ 

Spoj			Makrozon f4		
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	178,5	19	-	137,1
2	2,80	44,0	22	8,15	142,1
2Me	1,19	21,7	22a	- <sup>a</sup>	-
3	4,10	78,4	22b	8,38	-
4	2,02	40,87	23	-	192,5
4Me	1,04	9,1	24	-	37,6
5	3,58	82,9	25	7,56	126,8
6	-	77,1	26	-	134,5
6Me	1,24	26,8	27	7,85	126,0
6OH	- <sup>a</sup>	-	28	7,62	125,7
7eq; 7ax	1,53; 1,46	39,9	29	7,58	126,8
8	1,97	27,8	30	7,90	127,5
8Me	0,90	20,7	31	-	126,2
9eq; 9ax	2,65; 2,18	65,7	32	7,61	125,7
9a	3,03; 2,61	47,5	33	7,86	127,5
9b	1,85; 1,73	26,8	1'	4,45	102,55
9c	3,35	38,9	2'	3,09	70,82
9d	7,46	-	2'OH	- <sup>a</sup>	-
10	2,80	61,2	3'	2,50	65,32
10Me	1,10	8,6	3'NMe <sub>2</sub>	2,28	37,79
11	3,66	74,3	4'eq; 4'ax	1,68; 1,10	28,86
11OH	- <sup>a</sup>	-	5'	3,58	68,11
12	-	77,8	5'Me	1,12	20,89
12Me	1,07	16,7	1''	4,92	95,27
12OH	- <sup>a</sup>	-	2''eq; 2''ax	2,34; 1,54	34,71
13	4,82	77,9	3''	-	73,00
14eq; 14ax	1,81; 1,47	21,7	3''Me	1,20	20,64
14Me	0,87	10,6	3''OMe	3,30	48,90
15	-	166,4	4''	2,95	78,09
16	-	136,4	4''OH	- <sup>a</sup>	-
17; 21	7,64	127,5	5''	4,07	65,32
18; 20	7,99	128,1	5''Me	1,22	18,10

<sup>a</sup> nije asignirano

#### 4.5. *p*-trifluorometoksifenil-makrozon (f5)

Kako bi se sintetizirao *p*-trifluorometoksi-makrozon, **f5**, potrebno je sintetizirati odgovarajući tiosemikarbazon, **d5** te tiosemikarbazid, **e5**. Reakcijom spoja **5** (0,324 mL) s hidrazin monohidratom (0,23 mL) u propan-2-olu nastaje produkt bijele boje (172 mg) uz iskorištenje reakcije od 34 %. Struktura spoja **d5** potvrđena je snimanjem spektra  $^1\text{H}$  NMR i prikazana je na Slici 58., a u Tablici 18. prikazana je asignacija u DMSO-*d*<sub>6</sub>.



Slika 58. Struktura i užii dio spektra  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona **d5** snimljen u DMSO-*d*<sub>6</sub> pri 298 K.

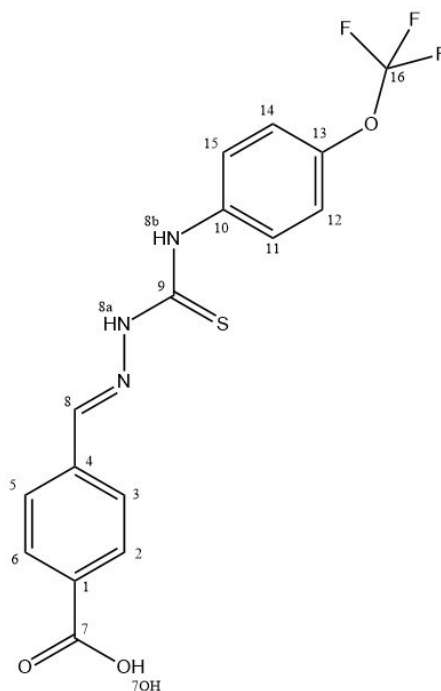


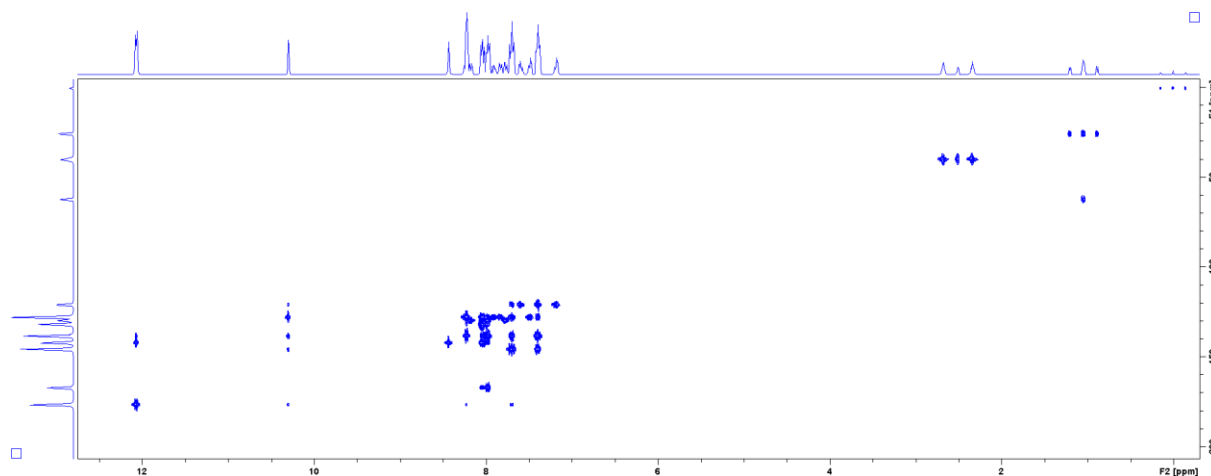
Tablica 18. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  za spoj **d5** asignirani u DMSO-*d*6

Spoj <b>d5</b>	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	-
2	7,28
3	7,77
4	-
5	7,77
6	7,28
7	-
7a	- <sup>a</sup>
7b	9,25
8	4,82

<sup>a</sup> nije asignirano

Reakcijom spoja **d5** (169 mg) i 4-formilbenzojeve kiseline (121 mg) uz dodatak ledene octene kiseline (3,8  $\mu\text{L}$ ) pripremljen je tiosemikarbamid **e5** (112 mg). Prinos reakcije bio je 43 %. Struktura spoja prikazana je na Slici 59. i potvrđena je snimanjem jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR (Slika 60., Dodatak D26 – D29). Kemijski pomaci spoja **e5** prikazani su u Tablici 19.

Slika 59. Strukturna formula spoja **e5**.

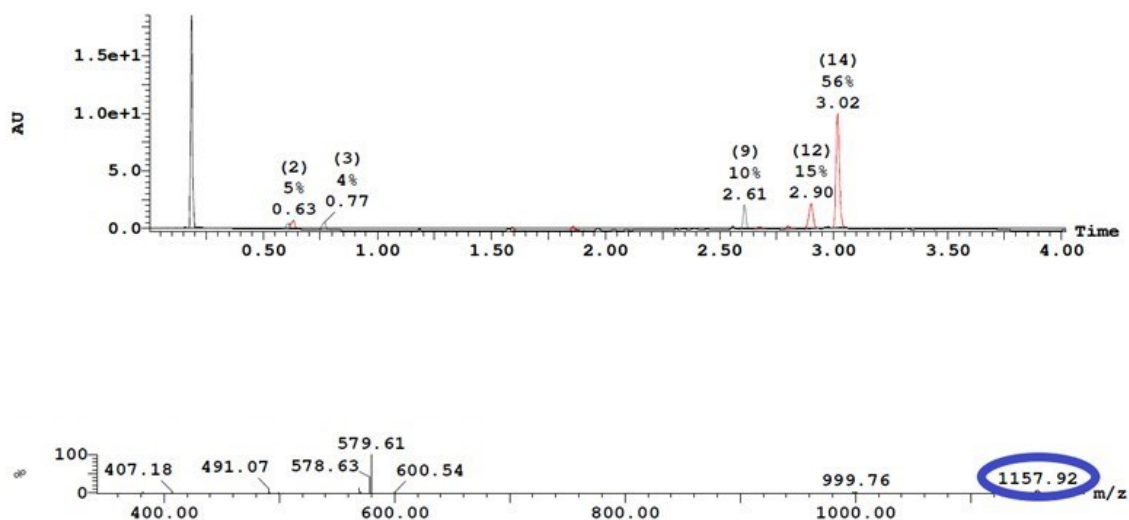
Slika 60. Spektar HMBC spoja e5 snimljen u DMSO-*d*6 pri 298 K.Tablica 19. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj e5 asignirani u DMSO-*d*6

Spoj e5		
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	138,5
2	7,96	129,9
3	8,04	128,2
4	-	138,7
5	8,04	128,2
6	7,96	129,9
7	-	167,6
7OH	13,09	-
8	8,22	142,6
8a	12,07	-
8b	10,29	-
9	-	176,9
10	-	132,1
11	7,68	128,2
12	7,40	121,3
13	-	146,0
14	7,40	121,3
15	7,68	128,2
16	-	- <sup>a</sup>

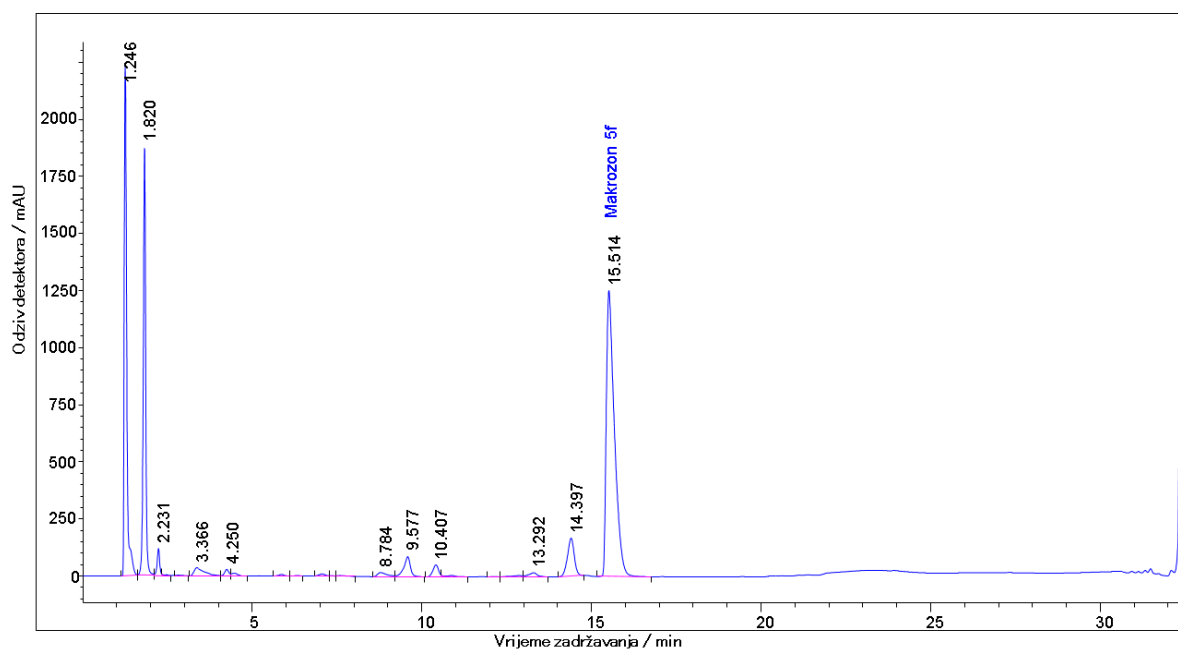
<sup>a</sup> nije asignirano

Reakcijom amidacije između spoja **e5** i prekursora **c** uz HATU i DIPEA u diklormetanu pripremljen je konačni produkt **f5**. Reakcijska smjesa analizirana je tehnikom LC-MS i potvrđena je prisutnost spoja **f5** u smjesi. Spektar masa za spoj **f5** prikazan je na Slici 61. Kromatogram reakcijske smjese prikazan je na Slici 62. Nakon pročišćavanja reakcijske smjese kromatografijom na stupcu frakcije su također analizirane tehnikom HPLC. Reprezentativni kromatogram odabrane frakcije prikazan je na Slici 63. Metodom normalizacije pikova određeno je da je udio spoja **f5** u toj frakciji 94,24 %. Struktura spoja **f5** predložena je na temelju snimljenih spektara NMR (Slika 64., Dodatak D30 – D32).

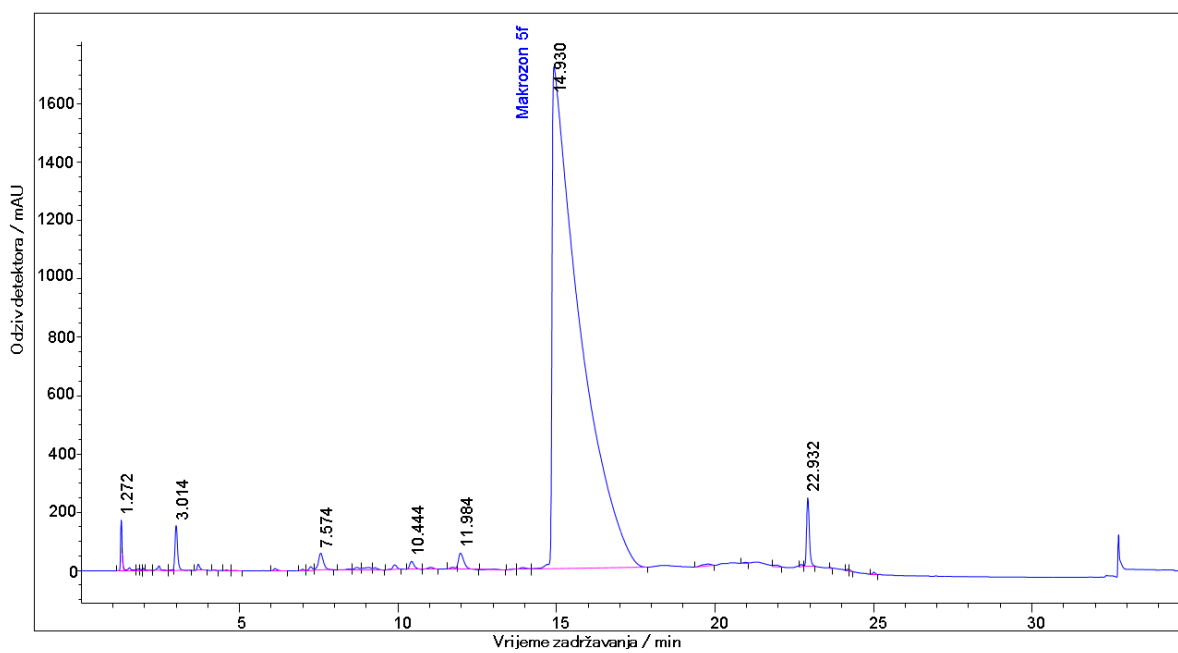
U Tablici 20. prikazani su kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f5** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ .



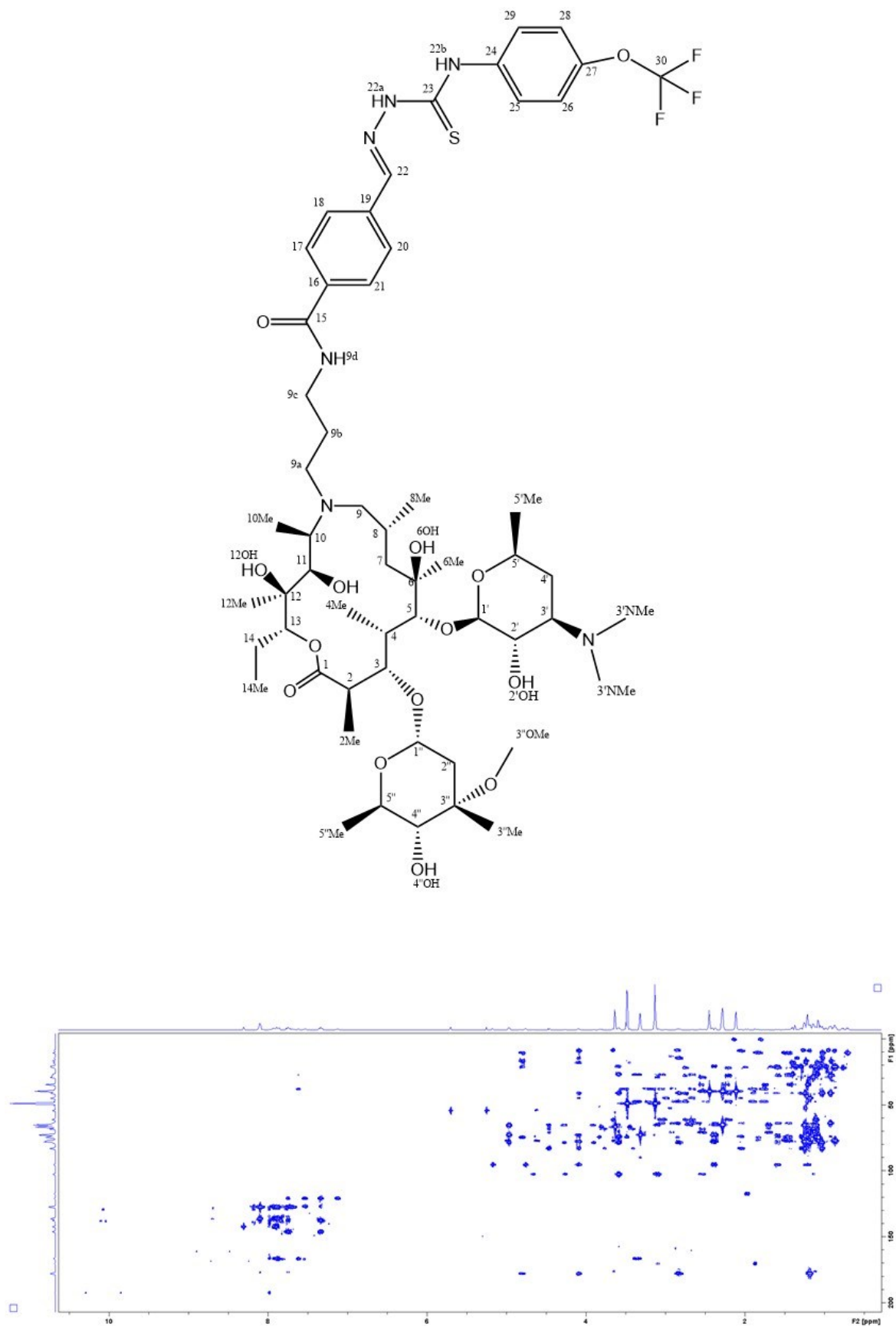
Slika 61. Spektar masa makrozona **f5**.



Slika 62. Kromatogram reakcijske smjese spoja f5.



Slika 63. Kromatogram spoja f5 nakon pročišćavanja, frakcija 17.1.

Slika 64. Spektar HMBC i predložena struktura spoja **f5**.

Tablica 20. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  za spoj **f5** asignirani u acetonitrilu- $d_3$ 

Spoj			Makrozon f5		
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
1	-	178,10	17; 21	7,91	127,56
2	2,84	44,87	18; 20	7,87	127,48
2Me	1,18	14,52	19	-	136,43
3	4,09	78,80	22	8,09	142,50
4	2,05	41,00	22a	- <sup>a</sup>	-
4Me	1,02	8,99	22b	- <sup>a</sup>	-
5	3,58	83,20	23	-	- <sup>a</sup>
6	-	74,06	24	-	137,87
6Me	1,26	26,81	25; 29	7,44	127,17
6OH	- <sup>a</sup>	-	26; 28	7,33	120,76
7eq; 7ax	1,58; 1,45	41,19	27	-	146,27
8	1,99	27,95	30	-	- <sup>a</sup>
8Me	0,92	21,86	1'	4,45	102,70
9eq; 9ax	2,73; 2,20	64,00	2'	3,10	71,04
9a	3,05; 2,65	47,61	2'OH	- <sup>a</sup>	-
9b	1,89; 1,76	27,12	3'	2,54	65,28
9c	3,35	37,99	3'NMe <sub>2</sub>	2,27	39,40
9d	7,61	-	4'eq; 4'ax	1,71; 1,14	29,08
10	2,84	61,24	5'	3,59	68,11
10Me	1,11	8,42	5'Me	1,14	20,85
11	3,65	74,42	1''	4,96	95,30
11OH	- <sup>a</sup>	-	2''eq; 2''ax	2,38; 1,59	34,62
12	-	74,67	3''	-	72,89
12Me	1,07	16,93	3''Me	1,21	20,65
12OH	- <sup>a</sup>	-	3''OMe	3,31	48,85
13	4,80	77,20	4''	2,98	77,92
14eq; 14ax	1,83; 1,46	21,27	4''OH	- <sup>a</sup>	-
14Me	0,86	10,64	5''	4,09	65,47
15	-	166,73	5''Me	1,24	18,06
16	-	136,14			

-<sup>a</sup> nije asignirano

Nakon pročišćavanja reakcijskih smjesa makrozona kromatografijom na stupcu te provjere svih frakcija tankoslojnom kromatografijom, najčišće frakcije, koje su sadržavale makrozone, analizirane su tehnikom HPLC. Analiza odabranih frakcija novosintetiziranih makrozona tehnikom HPLC pokazala je da je čistoća izoliranih spojeva od 64 % za spoj **f3** do 94 % za spoj **f5**. Većina sintetiziranih spojeva nije izolirana uz zadovoljavajući stupanj čistoće, stoga se može zaključiti da pokretna faza  $E^+$ , koja je korištena za eluiranje spojeva, nije najpogodnija za pročišćavanje makrozona. U daljnjim istraživanjima potrebno je optimirati uvjete za pročišćavanje makrozona kromatografijom na stupcu ili primijeniti automatizirane tehnike za izolaciju i pročišćavanje poput ekstrakcije na čvrstoj fazi, semipreparativne kromatografije ili tehnike LC-SPE.

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu uspješno su pripremljeni i strukturno okarakterizirani benzil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il-, 2-naftil- i *p*-trifluorometoksifenil-makrozoni **f1-f5**. Makrozoni su sintetizirani u nekoliko sintetskih koraka. Prvo je pripremljen prekursor **c**, 9a-*N*-( $\gamma$ -aminopropil)-9a-aza-homoeritromicin A. Priprema derivata tiosemikarbazida odvijala se kroz dva koraka. Reakcijom benzil-izotiocijanata (**1**), 3,4-metilendioksifenil-izotiocijanata (**2**), metil-3-izotiocijanatotiofen-2-karboksilata (**3**), 1-naftil-izotiocijanata (**4**) i 4-(trifluorometoksi)fenil-izotiocijanata (**5**) s hidrazin monohidratom u propan-2-olu pripremljeni su tiosemikarbazoni **d1-d5**. Iskorištenje reakcije bilo je od 34 % za spoj **d5** do 78 % za spoj **d2**. Tiosemikarbazoni **d1-d5** su u reakciji s 4-formilbenzojevom kiselinom i ledenom octenom kiselinom dali tiosemikarbazide **e1-e5**. Prinos opisane reakcije bio je od 43 % za spoj **e5** do 90 % za spoj **e4**. Produkti reakcija potvrđeni su snimanjem spektara NMR. Benzil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il-, 2-naftil- i *p*-trifluorometoksifenil-makrozoni **f1-f5** pripremljeni su reakcijom amidacije između prekursora **c** i tiosemikarbazida **e1-e5**. Tehnikom LC-MS potvrđena je prisutnost pojedinog makrozona u reakcijskoj smjesi. Nakon pročišćavanja pripremljenih spojeva, snimljeni su jedno- i dvodimenzijски spektri NMR te su predložene strukture novosintetiziranih makrozona. Čistoća izoliranih spojeva bila je od 64 % za spoj **f3** do 94 % za spoj **f5**. U daljnjim istraživanjima potrebno je optimirati uvjete za pročišćavanje makrozona kromatografijom na stupcu ili primijeniti automatizirane tehnike za izolaciju i pročišćavanje poput ekstrakcije na čvrstoj fazi, semipreparativne kromatografije ili tehnike LC-SPE.

Pročišćeni makrozoni dalje će se koristiti za ispitivanje antibakterijske aktivnosti na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve te, ukoliko pokažu zadovoljavajuće rezultate, bit će korišteni za daljnja istraživanja.



## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

COSY – engl. *Correlation Spectroscopy*

DCM – diklormetan

DEPT – engl. *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*

DIPEA - *N,N*-diizopropiletilamin

DMSO - dimetilsulfoksid

HATU - 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3-oksidi

heksafluorofosfat

HMBC – engl. *Heteronuclear multiple bond correlation*

HSQC – engl. *Heteronuclear single quantum coherence*

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

STD - engl. *Saturation Transfer Difference*

tr-NOE - prijenosni nuklearni Overhauserov efekt

tr-NOESY – engl. *Transferred Nuclear Overhauser Effect*

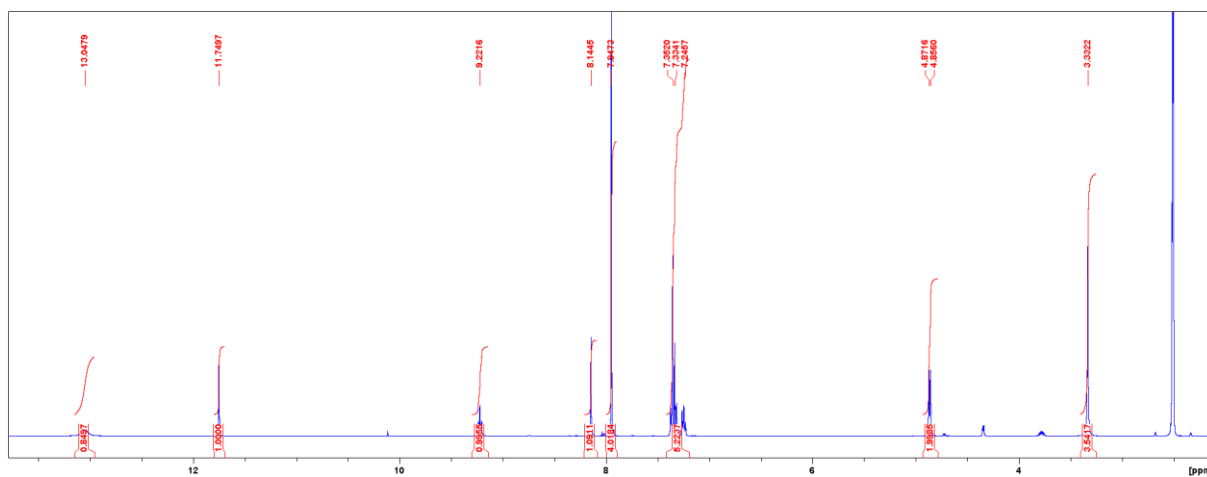
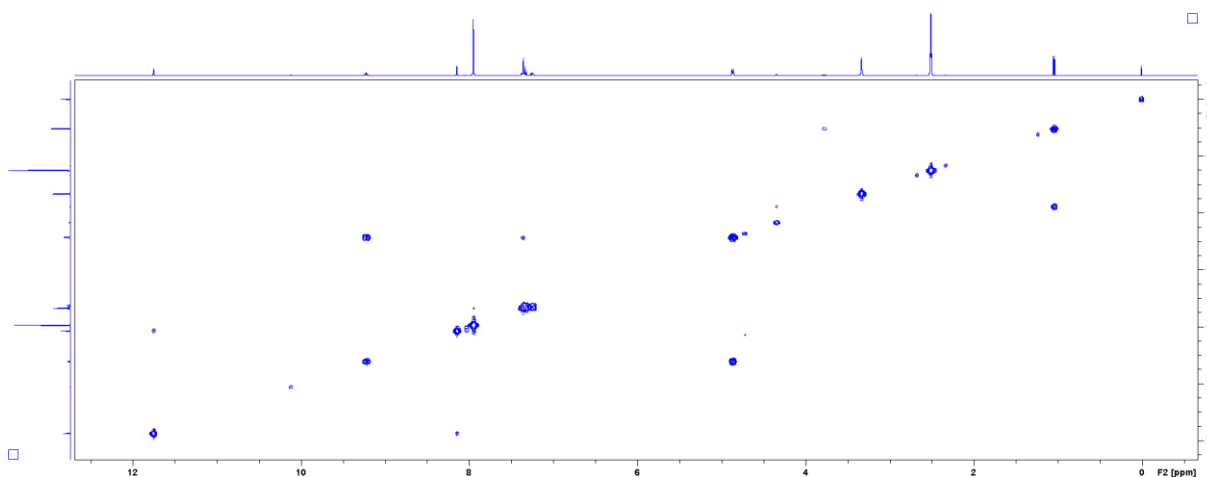
$\delta$  / ppm – kemijski pomak

## § 7. LITERATURNI IZVORI

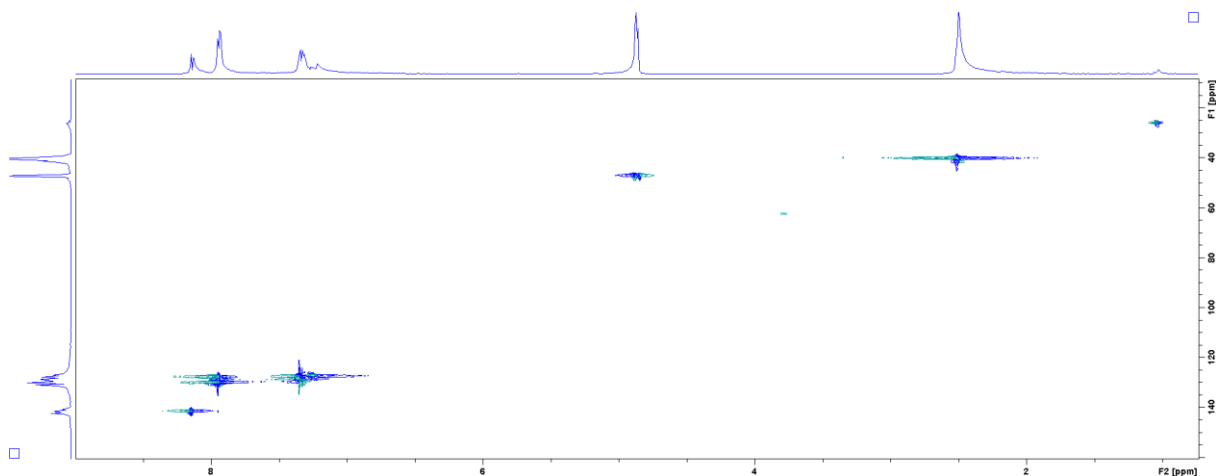
1. B. Arsić, P. Novak, M. G. Rimoli, J. Barber, G. Kragol and F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018.
2. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz and F. Motamedi–Sedeh, *JbiSE* 5 (2012) 39–42.
3. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak and N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3459.
4. 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.
5. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol* **174** (2017) 2967–2983.
6. W. Schönfeld, H. A. Kirst, *Macrolide Antibiotics*, Birkhäuser, Basel, 2002, str. 73–92.
7. S. Mutak, *J. Antibiot.* **60** (2) (2007) 85–122.
8. P. Tyson, A. Hassanzadeh, M. N. Mordi, D. G. Allison, V. Marquez, J. Barber, *Med. Chem. Commun.* **2** (2011) 331–336.
9. A. H. H. Bakheit, B. M. H. Al-Hadiya, A. A. Abd-Elgalil, u H. Brittain (ur.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 39, Academic Press, 2014, str. 1–40.
10. R. Vardanyan, V. Hruby, *Synthesis of Best-Seller Drugs*, Elsevier, San Diego, 2016, str. 573–625.
11. Z. Banić Tomišić, *Kem. Ind.* **60** (12) (2011) 603–617.
12. G. Lazarevski, G. Kobrehel, B. Metelko, H. Duddeck, *J. Antibiot.* **49** (10) (1996) 1066–1069.
13. M. A. Metwally, S. Bondock, H. El-Azap, E. M. Kandeel, *J. Sulfur Chem.* **32** (2011) 489–519.
14. A. Hutinec, R. Rupčić, D. Žiher, K. S. Smith, W. Milhous, W. Ellis, C. Ohrt, Z. Ivezić Schönfeld, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2011) 1692–1701.
15. M. Bukvić Krajačić, N. Kujundžić, M. Dumić, M. Cindrić, K. Brajša, B. Metelko, P. Novak, *J. Antibiot.* **58** (2005) 380–389.
16. <https://glycopedia.eu/e-chapters/NMR-for-Structural-Glycoscience-35/Transferred-NOESY-EXperiments-tr> (datum pristupa 20. kolovoz 2019.)
17. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (4) (2008) 165–173.

18. A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega, E. J. Cabrita, *J. Chem. Educ.* **88** (2011) 990–994.
19. L. F. Sgobbi, V. D. Pinho, M. F. Cabral, A. C. B. Burtoloso, S. A. S. Machado, *Sens. Actuators B*, **182** (2013) 211–216.
20. P. C. Tang, G. McMahon, J. Y. Ramphal, *Novel Heteroaryl Compounds for the Modulation of Protein Tyrosine Enzyme Related Cellular Signal Transduction*, WO 9856376, 1998.
21. N. P. Barton, H. Hobbs, S. T. Hodgson, Y. M. L. Lacroix, P. A. Procopiou, *CC. Chemokine Receptor 4 Antagonists*, WO 2012025473, 2012.

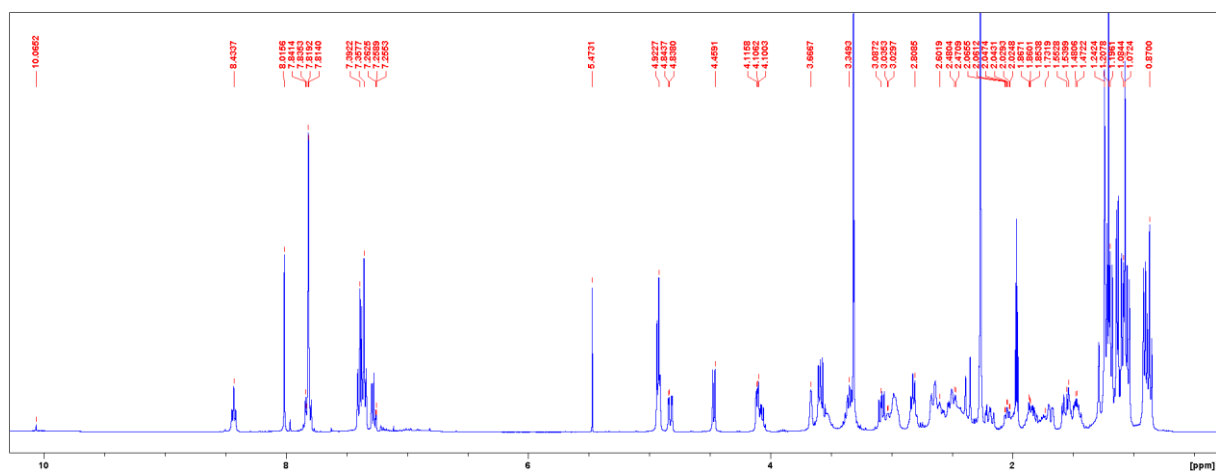
## § 8. DODATAK

D1. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja e1.

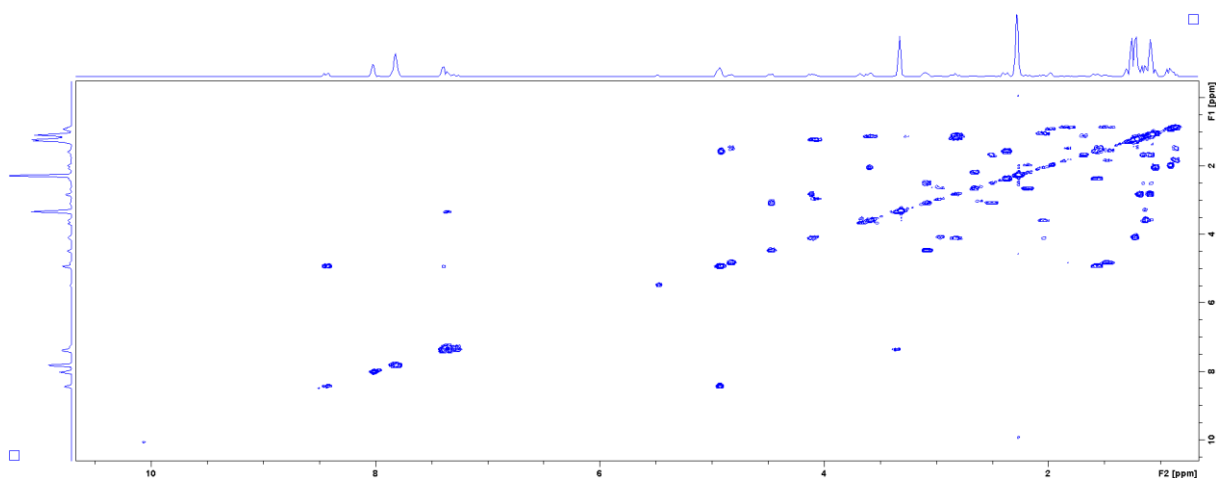
D2. Spektar COSY spoja e1.



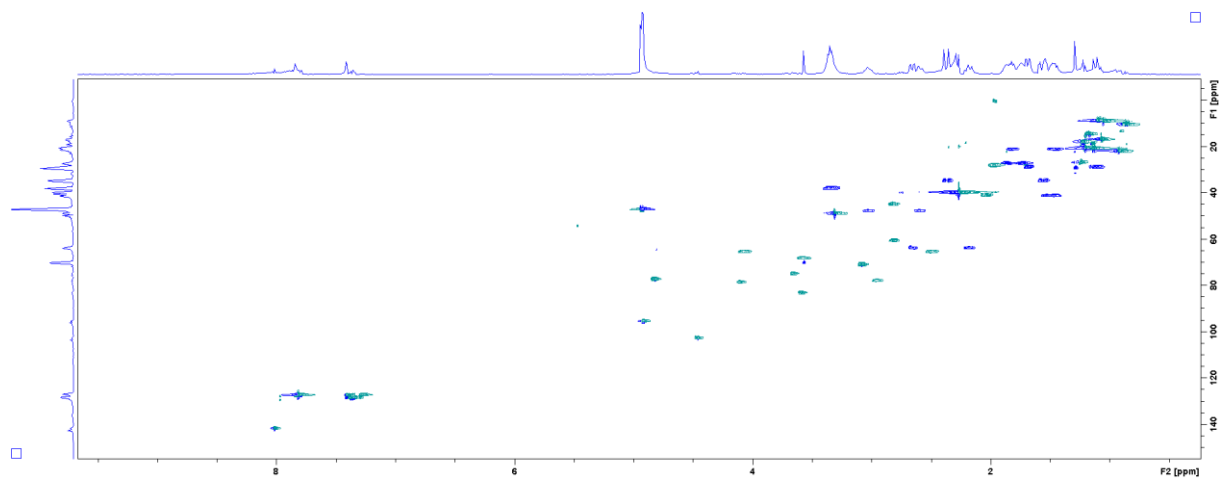
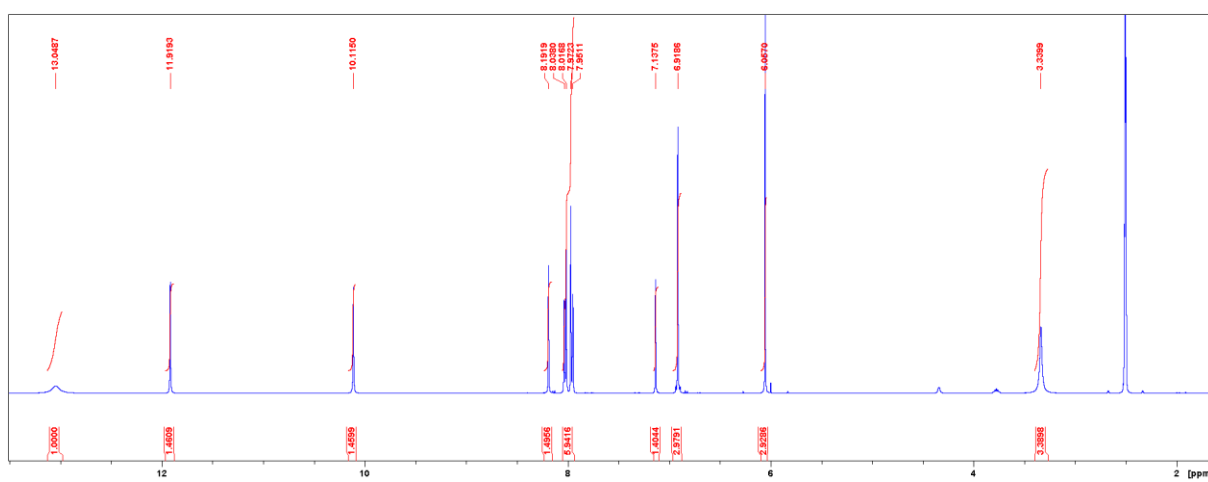
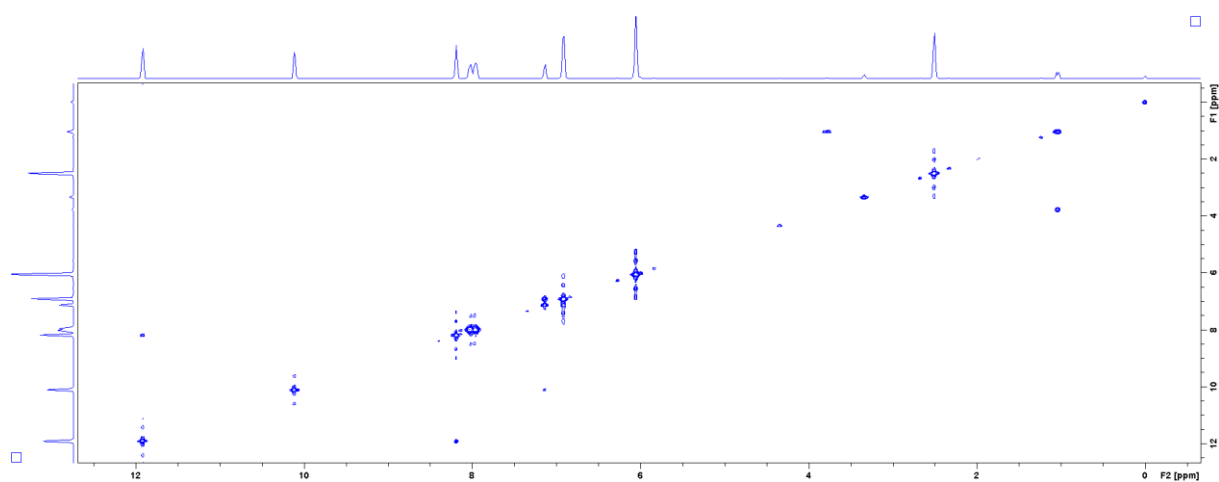
D3. Spektar HSQC spoja **f1**.

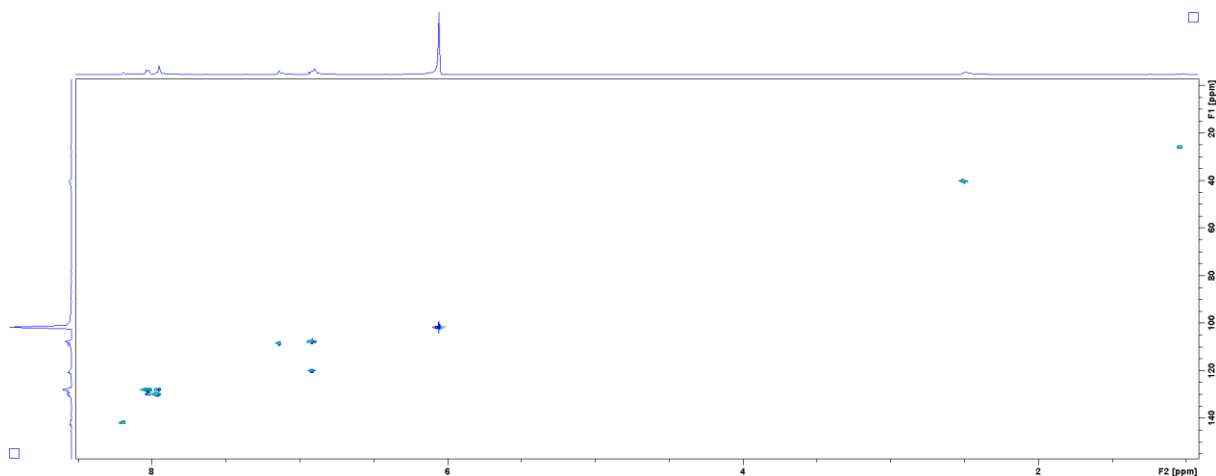


D4. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **f1**.

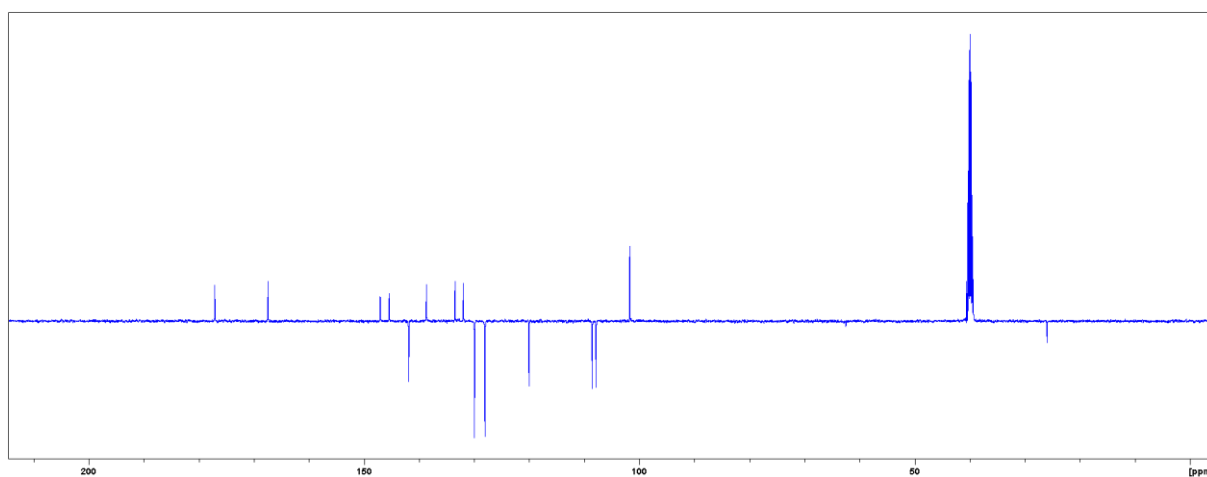


D5. Spektar COSY spoja **f1**.

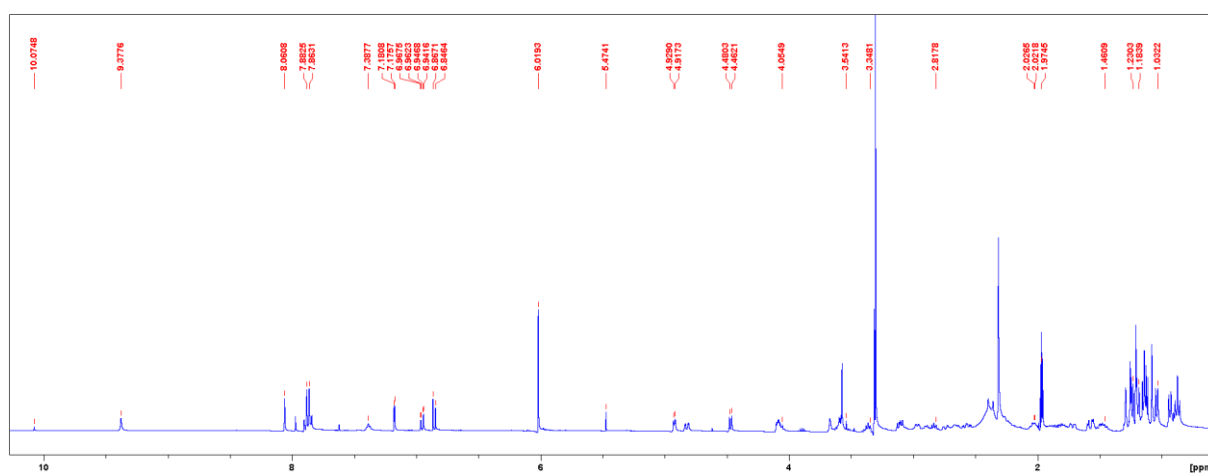
D6. Spektar HSQC spoja **f1**.D7. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **e2**.D8. Spektar COSY spoja **e2**.



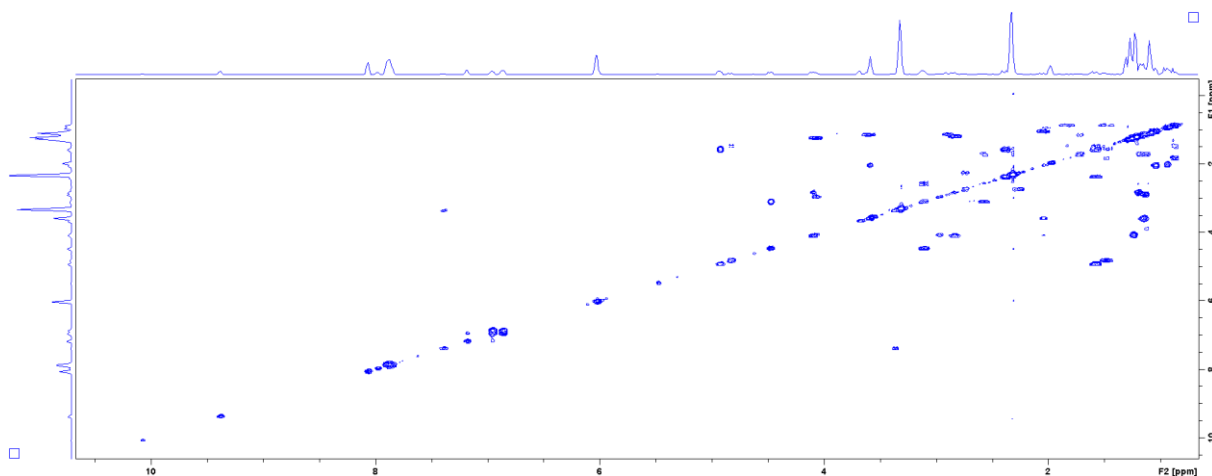
D9. Spektar HSQC spoja e2.



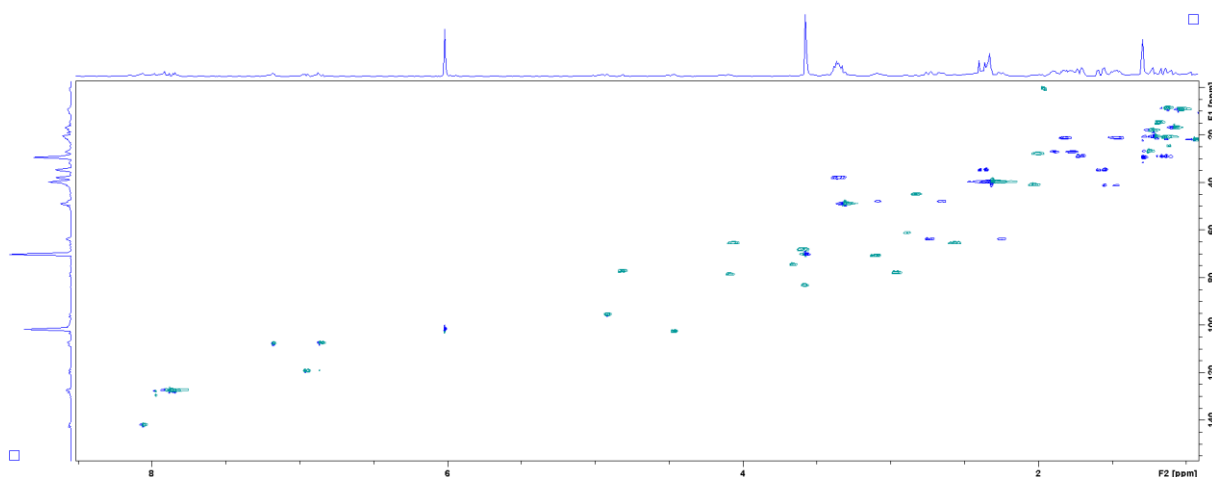
D10. Spektar DEPTQ spoja e2.



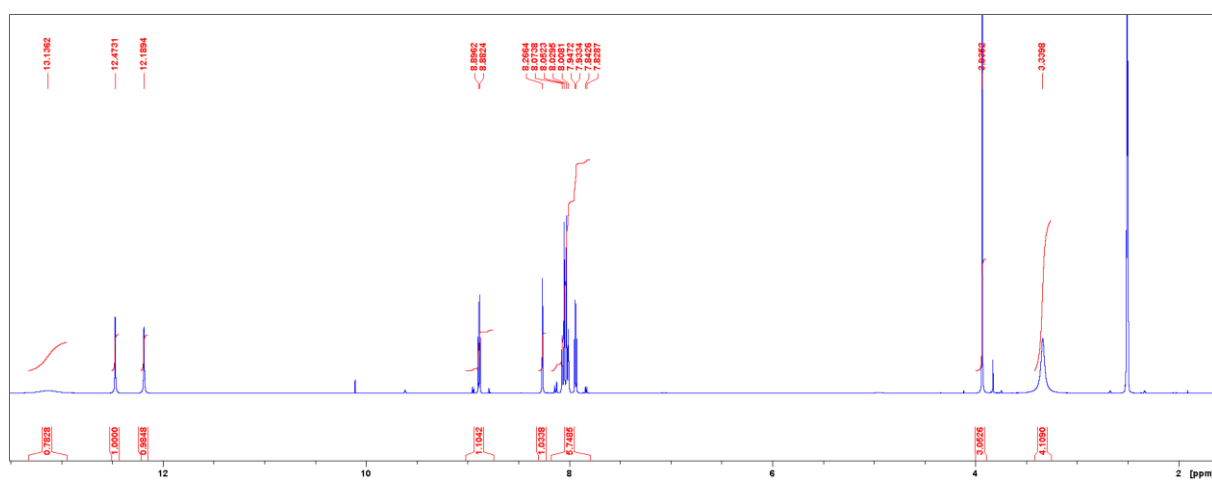
D11. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja f2.



D12. Spektar COSY spoja **f2**.



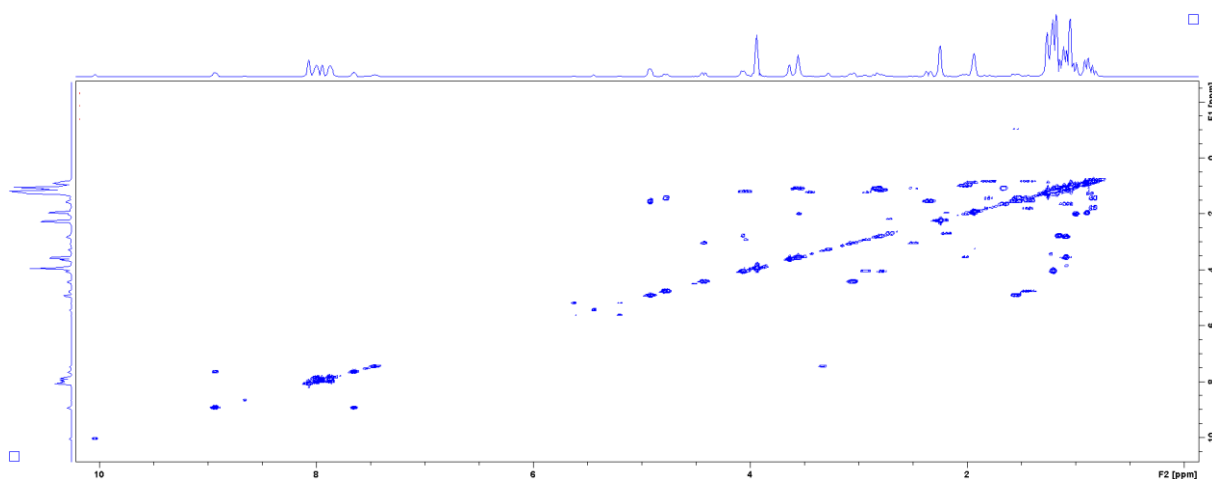
D13. Spektar HSQC spoja **f2**.



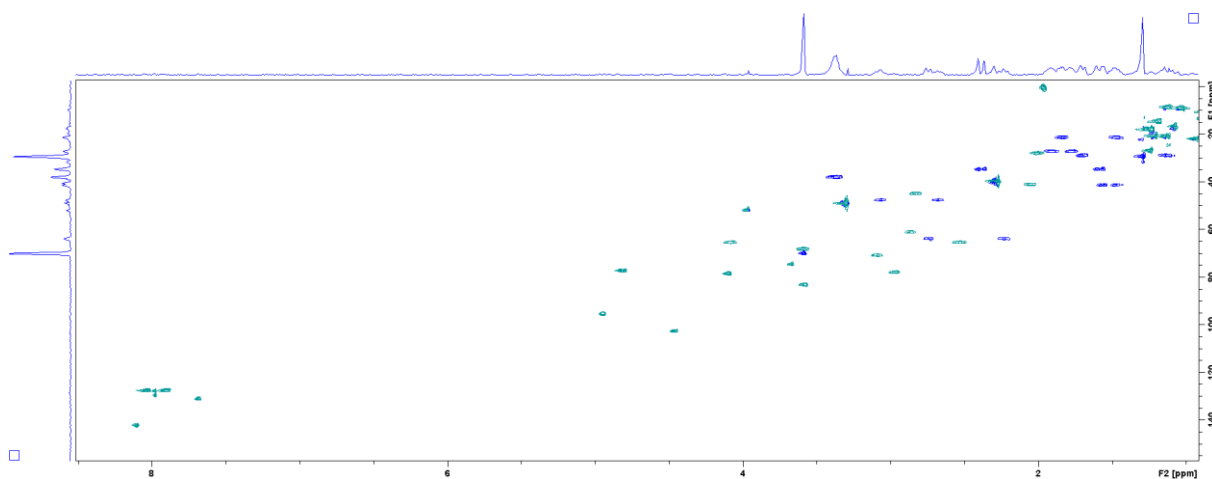
D14. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **e3**.



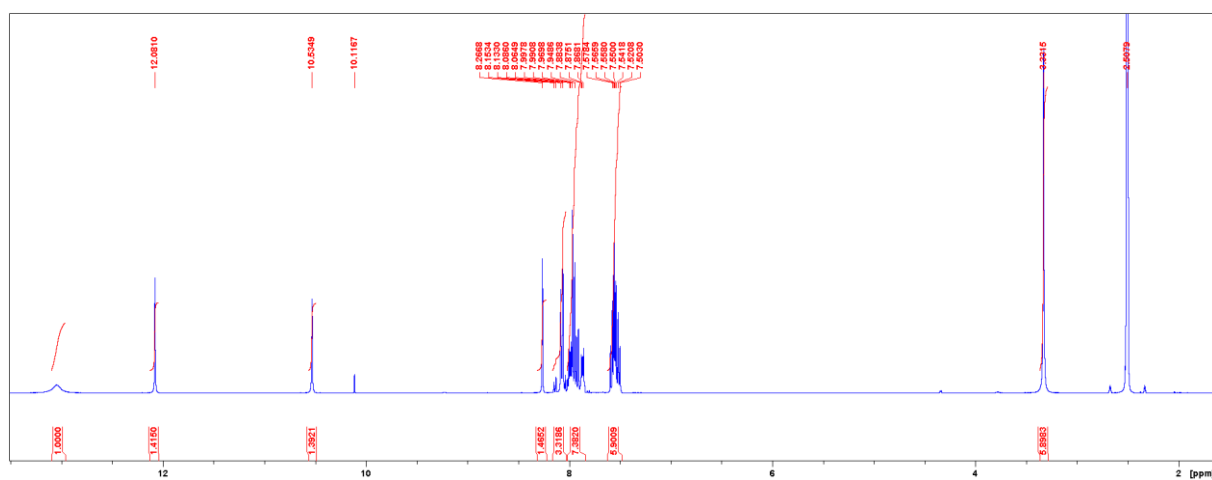




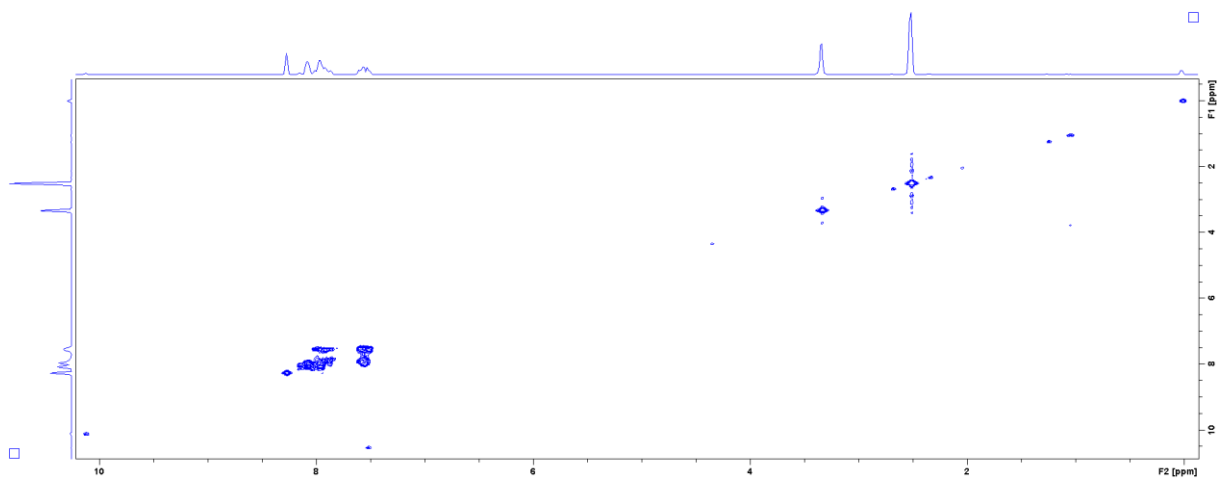
D18. Spektar COSY spoja **f3**.



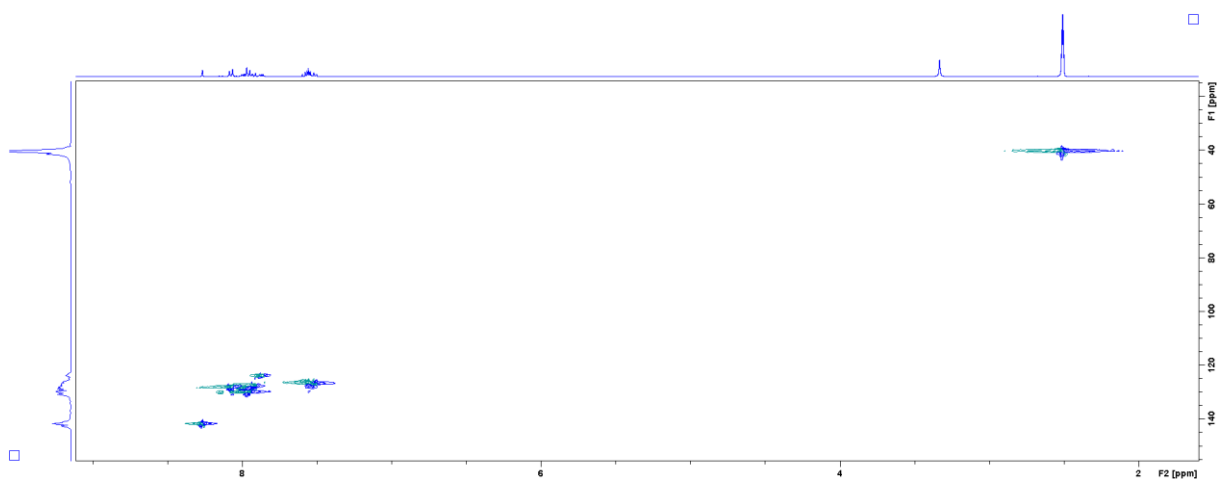
D19. Spektar HSQC spoja **f3**.



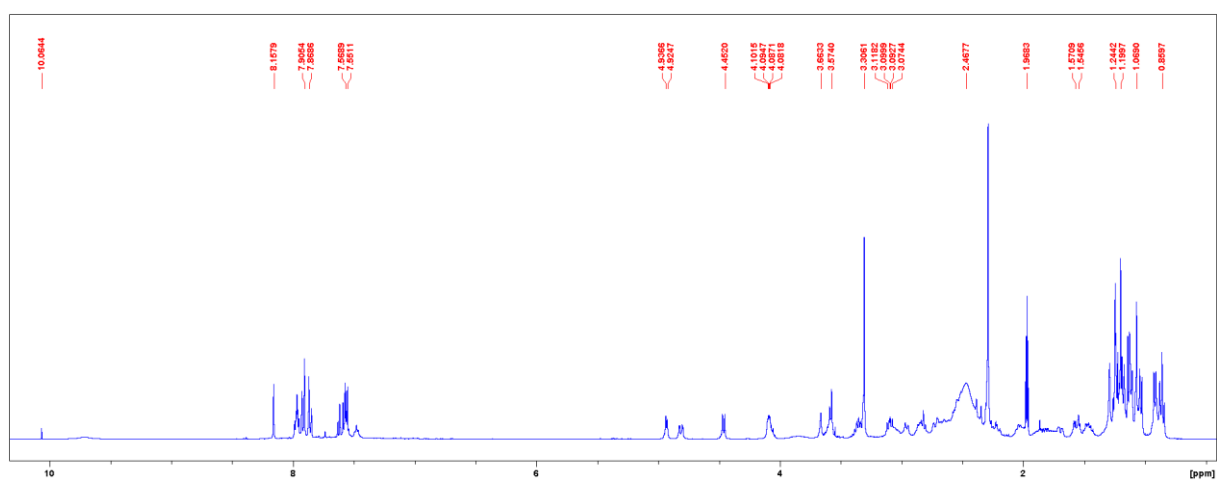
D20. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **e4**.

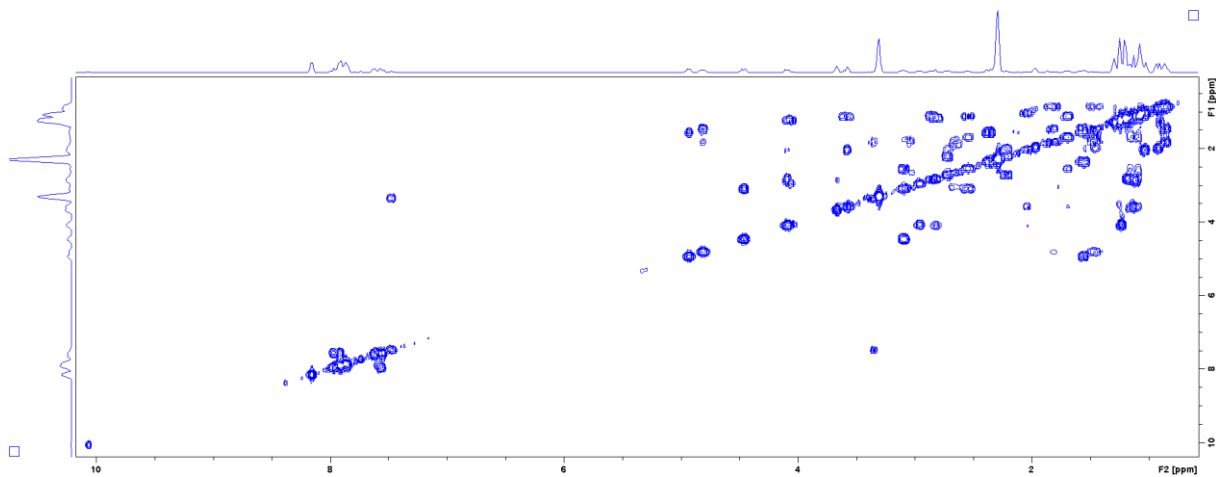


D21. Spektar COSY spoja e4.

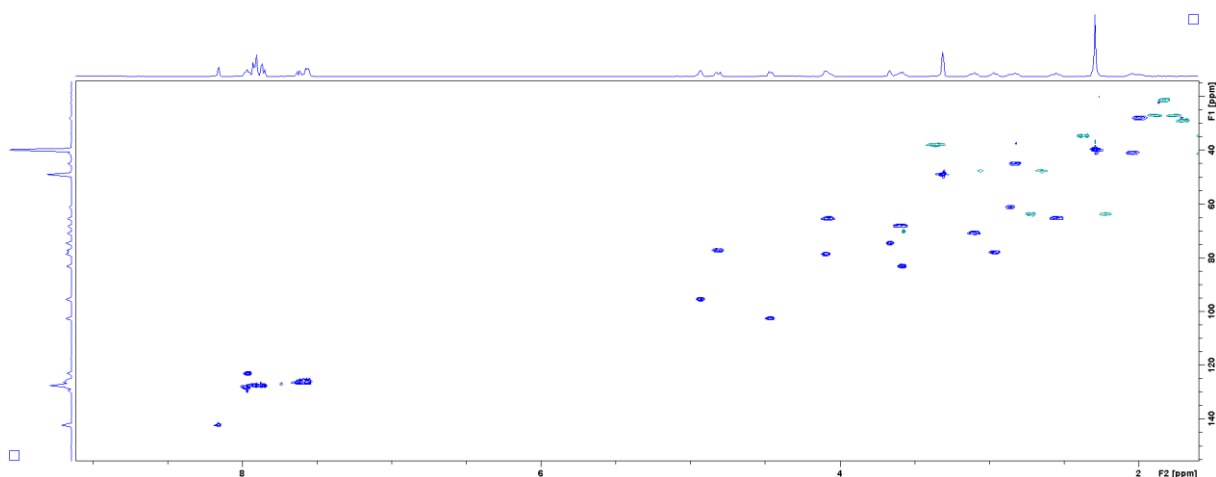


D22. Spektar HSQC spoja e4.

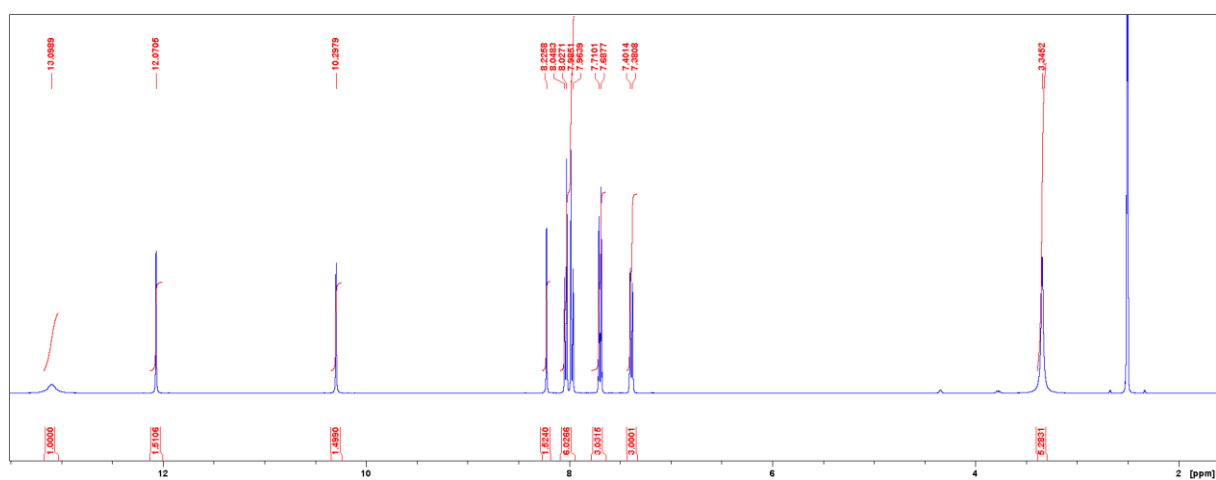
D23. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja f4.



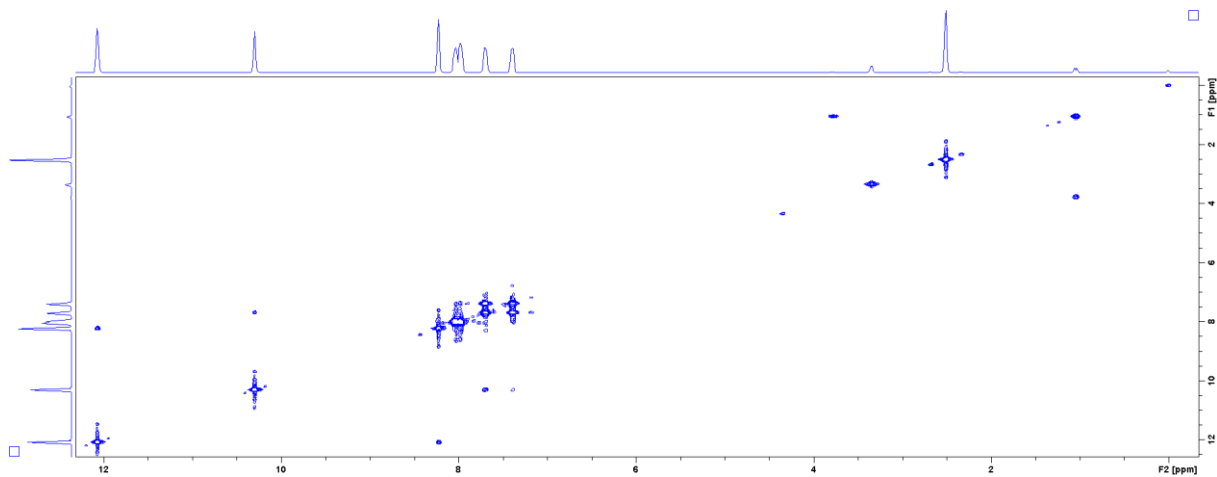
D24. Spektar COSY spoja f4.



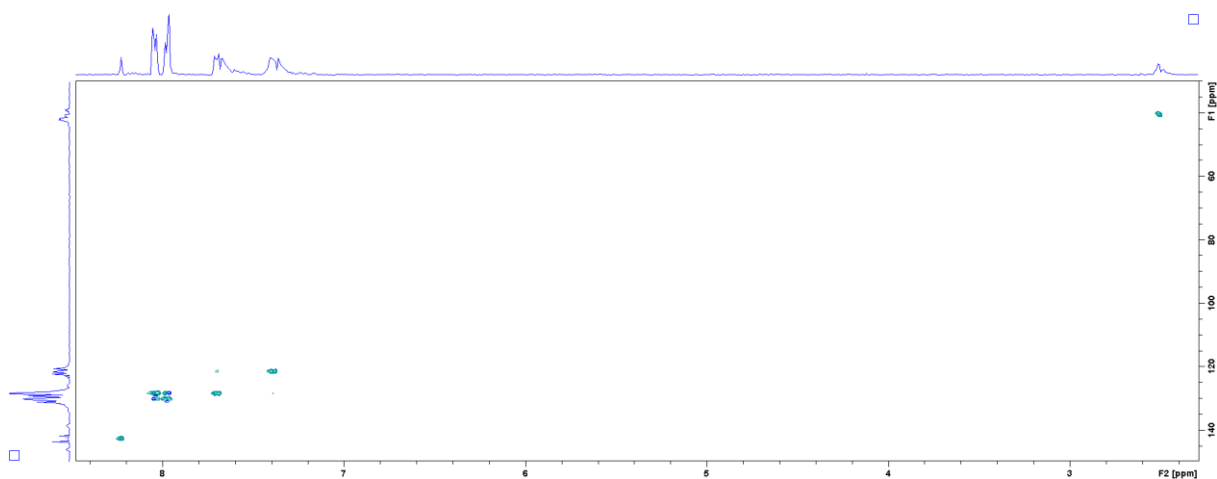
D25. Spektar HSQC spoja f4.



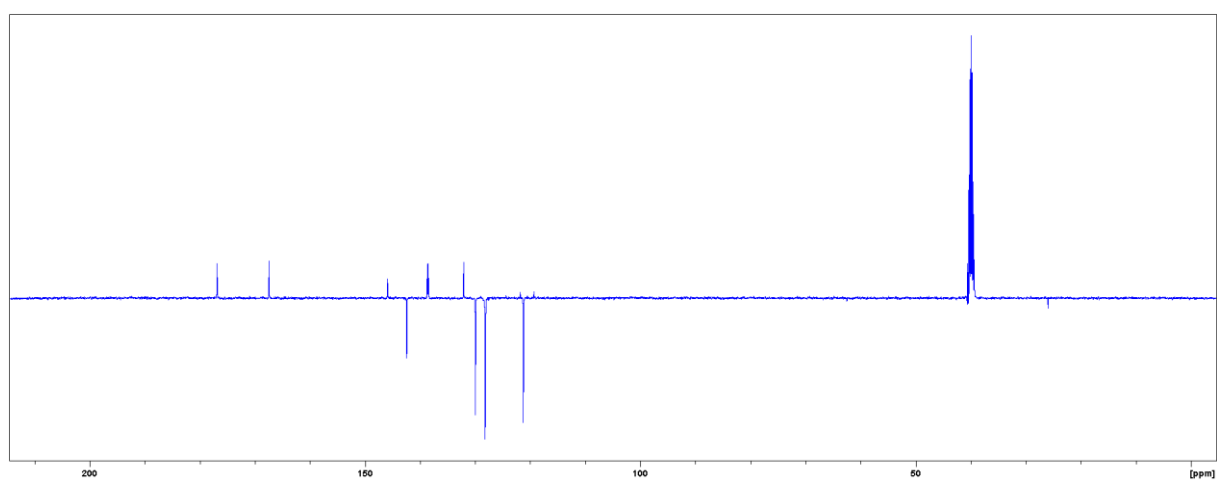
D26. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja e5.



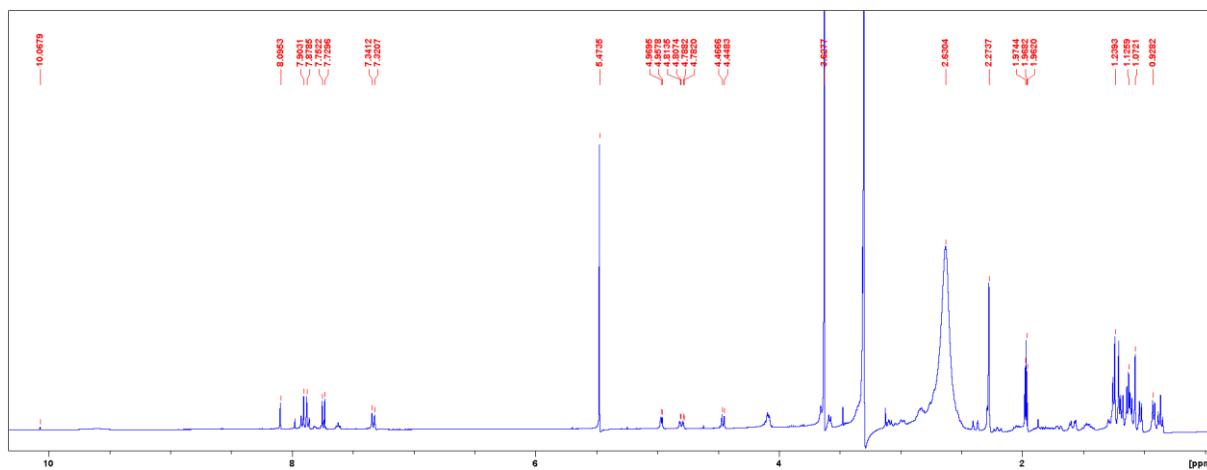
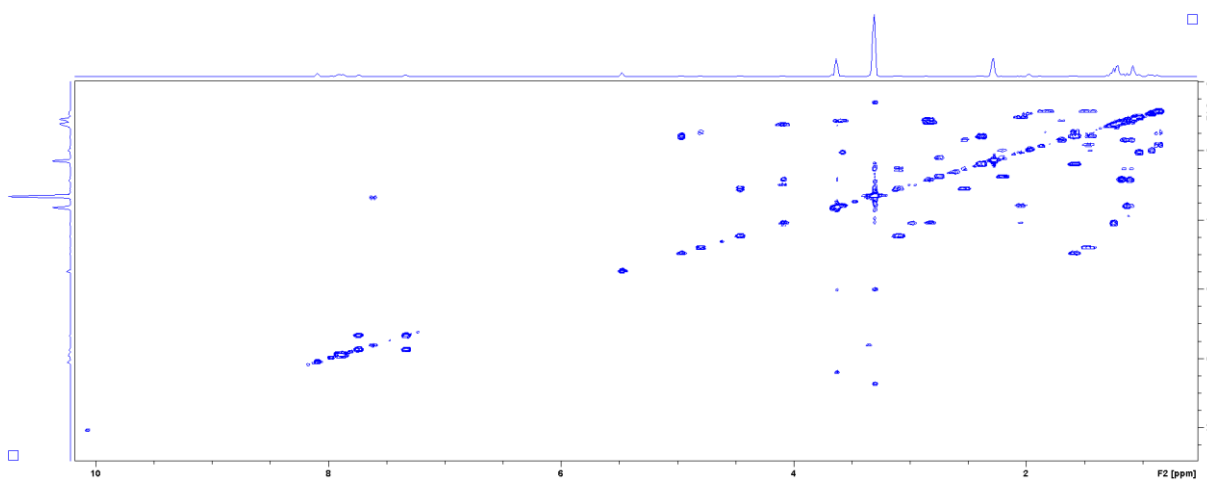
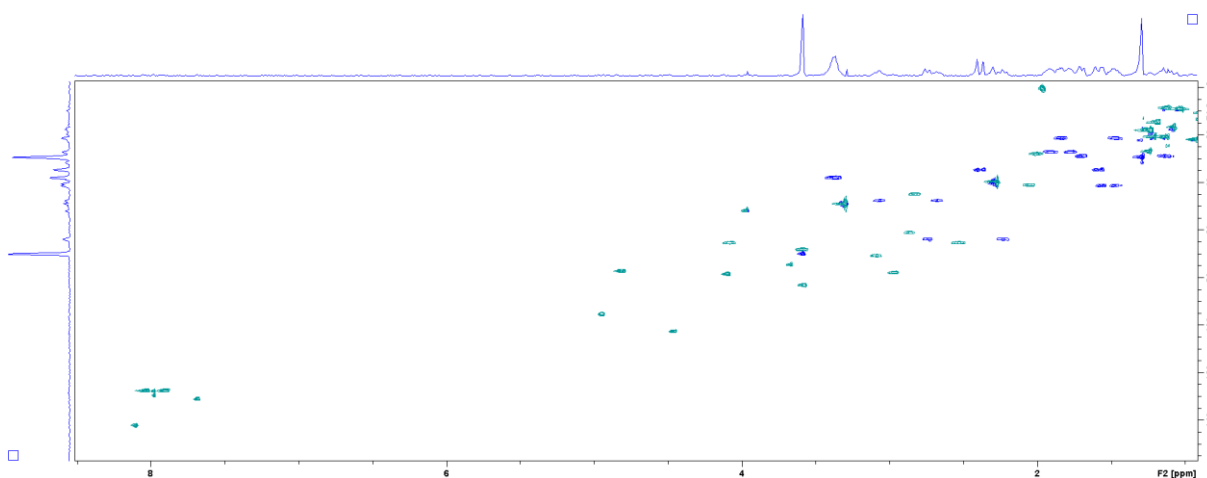
D27. Spektar COSY spoja e5.



D28. Spektar HSQC spoja e5.



D29. Spektar DEPTQ spoja e5.

D30. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **f5**.D31. Spektar COSY spoja **f5**.D32. Spektar HSQC spoja **f5**.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Matea Facković

Datum rođenja: 9.12.1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola Nikole Tesle, Zagreb

2008.–2012. Gornjogradska gimnazija, Zagreb

2012.–2017. Preddiplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2013. Posebna rektorova nagrada u području prirodnih znanosti

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012.-2015. Otvoreni dani kemijskog odsjeka

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. I. Mikulandra, M. Facković, A. Lulić, I. Habinovec, N. Benčić, M. Bukvić Krajačić, I. Grgičević, T. Jednačak, M. Cindrić, P. Novak, *Priprava i karakterizacija makrozona, bioaktivnih konjugata azitromicina*, 26. HSKIKI, Šibenik, 2019.