

Priprava i karakterizacija novih 4"-derivata azitromicina: 4-piperidil-sulfonilfenil-, 3-piridil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, etoksikarbonil-, metiltiofen- 2-karboksilat-3-il- i 2-furfurilmetil-makrozona

Barišić, Antonio

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:217:491171>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Antonio Barišić

**Priprava i karakterizacija novih 4''-derivata
azitromicina: 4-piperidil-sulfonilfenil-,
3-piridil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-,
etoksikarbonil-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il- i
2-furfurilmetil-makrozona**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra 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. Ivane Mikulandre.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije“ (IP-2018-01-8098).

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku i asistentici mag. chem. Ivani Mikulandri na strpljenju, susretljivosti i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se mag. chem. Ivi Habinovec na pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada i pročišćavanju reakcijskih smjesa makrozona.

Moje zahvale idu dr. sc. Mirjani Bukvić i Ivanu Grgičeviću na pomoći pri pročišćavanju spojeva.

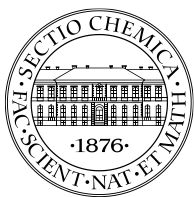
Također moje zahvale idu svim kolegama/icama i prijateljima/icama koji su mi iskustvo studiranja učinili najljepšim razdobljem moga života.

Na kraju se želim zahvaliti svojim roditeljima, bratu i bakama na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i motivaciji koju mi pružaju svaki dan.

Sadržaj

| | |
|--|------------|
| SAŽETAK..... | X |
| ABSTRACT | XII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Makrolidi | 2 |
| 2.1.1. Povijest, uporaba i podjela makrolida..... | 2 |
| 2.1.2. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika | 4 |
| 2.1.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike | 5 |
| 2.1.4. Druga generacija makrolida - azitromicin | 6 |
| 2.1.5. Tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni | 8 |
| 2.2. Spektroskopija NMR | 8 |
| 2.2.1. Tehnika ¹ H NMR..... | 10 |
| 2.2.2. Tehnika DEPT..... | 10 |
| 2.2.3. Tehnika COSY..... | 10 |
| 2.2.4. Tehnika HSQC | 10 |
| 2.2.5. Tehnika HMBC | 10 |
| 2.2.6. Tehnika tr-NOESY..... | 11 |
| 2.2.7. Tehnika STD..... | 13 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. Kemikalije i instrumentacija..... | 15 |
| 3.2. Priprava makrozona; konjugata derivata azitromicina i tiosemikarbazona | 16 |
| 3.2.1. Priprava tiosemikarbazida..... | 16 |
| 3.2.2. Priprava tiosemikarbazona..... | 16 |
| 3.2.3. Priprava makrozona | 16 |
| 3.3. Pročišćavanje 4"-aminopropilnog derivata azitromicina..... | 17 |
| 3.4. Pročišćavanje makrozona..... | 18 |
| 3.5. Karakterizacija sintetiziranih spojeva | 19 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 4.1. Tiosemikarbazidi..... | 21 |
| 4.2. Tiosemikarbazoni..... | 25 |
| 4.2.1. Tiosemikarbazon <i>3a</i> | 27 |
| 4.2.2. Tiosemikarbazon <i>3b</i> | 28 |

| | |
|---|-------------|
| 4.2.3. Tiosemikarbazon 3c | 29 |
| 4.2.4. Tiosemikarbazon 3d | 31 |
| 4.2.5. Tiosemikarbazon 3e | 32 |
| 4.3. 4''-aminopropilni derivat azitromicina | 34 |
| 4.4. Makrozoni | 36 |
| 4.4.1. 3-Piridil-makrozon (4a)..... | 37 |
| 4.4.2. Metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozon (4b)..... | 40 |
| 4.4.3. 4-Piperidil-sulfonilfenil-makrozon (4c) | 44 |
| 4.4.4. Benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozon (4d)..... | 47 |
| 4.4.5. Etoksikarbonil-makrozon (4e)..... | 51 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 54 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) | 55 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI | 56 |
| § 8. DODATAK | XIII |
| § 9. ŽIVOTOPIS | XXIX |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA NOVIH 4"- DERIVATA AZITROMICINA: 4-PIPERIDIL-SULFONILFENIL-, 3-PIRIDIL-, BENZO-3,4-(1,3-DIOKSOLIL)-, ETOKSIKARBONIL-, METILTIOFEN-2-KARBOKSILAT-3-IL- I 2-FURFURILMETIL-MAKROZONA

Antonio Barišić

Makrolidni antibiotici (npr. azitromicin) imaju široku primjenu u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim, Gram-negativnim bakterijama i nekim unutarstaničnim organizmima, te su ujedno pokazali antiupalno i antikancerogeno djelovanje. Djeluju na principu inhibicije sinteze bakterijskog proteina vežući se na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma. S obzirom na sve bržu prilagodbu bakterija i njihovu rezistenciju na makrolidne antibiotike, javlja se potreba za novim spojevima koji će pokazati veću biološku aktivnost. Osim makrolida, dobru antibakterijsku aktivnost su pokazali i tiosemikarbazoni. Makrozoni predstavljaju nove konjugate derivata azitromicina i tiosemikarbazona. U ovom radu uspješno je pripravljeno pet makrozona reakcijom 4"-aminopropilnog derivata azitromicina i odgovarajućih tiosemikarbazona. Derivat azitromicina pročišćen je kromatografijom na stupcu, a makrozoni tehnikom LC-SPE i semipreparativnom tekućinskom kromatografijom. Pripravljene i pročišćene makrozoni okarakterizirani su: spektrometrijom mase, spektroskopijom NMR i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Idući korak istraživanja uključit će *in vitro* testove biološke aktivnosti pripremljenih makrozona na susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija.

(54 stranica, 48 slika, 16 tablica, 20 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, makrolid, makrozon, tiosemikarbazon, tiosemikarbazid, spektroskopija NMR

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak
Neposredni voditelj: Ivana Mikulandra, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 26. veljače 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NEW 4"-AZITHROMYCIN DERIVATIVES: 4-PIPERIDYL-SULFONYLPHENYL-, 3-PYRIDYL-, BENZO-3,4-(1,3-DIOXOLYL)-, ETHOXYCARBONYL-, METHYLTIOPHENE-2-CARBOXYLATE-3-YL- AND 2-FURFURYLMETHYL-MACROZONES

Antonio Barišić

Macrolide antibiotics (e.g. azithromycin) are widely used in the treatment of infectious diseases caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and some intracellular organisms. They have also shown anti-inflammatory and anticancer activities. Macrolides exert their activity by binding to the 50S subunit of the bacterial ribosome thus inhibiting bacterial protein synthesis. Owing to the fact that bacteria develop resistance to existing antibiotics, new chemical entities are urgently needed to fight resistance mechanisms. Thiosemicarbazones have also shown good antibacterial activity. Hence, we believe that conjugation of azithromycin and thiosemicarbazones could yield a novel class of bioactive compounds, the macrozones. Here we report synthesis and characterization of five macrozones by reaction of 4"-aminopropyl azithromycin and the corresponding thiosemicarbazones. All prepared compounds were purified by column and semipreparative liquid chromatography and LC-SPE system. The next step of the study will include *in vitro* biological evaluation against a panel of susceptible and resistant bacteria strains.

(54 pages, 48 figures, 16 tables, 20 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, macrozone, thiosemicarbazone, thiosemicarbazide, spectroscopy NMR

Mentor: Dr. Predrag Novak, Professor

Assistant mentor: Ivana Mikulandra, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Professor
2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Date of exam: February 26, 2020

§ 1. UVOD

Makrolidi se prvi put spominju početkom 50-ih godina prošloga stoljeća. Sam naziv odnosi se na spojeve čija se struktura sastoji od 12, 14, 15 ili 16-članog makrocikličkog laktorskog prstena (aglikon) koji na sebe ima vezan dva ili više šećera. Koriste se kao antibiotici protiv Gram-pozitivnih i nekih Gram-negativnih bakterija najčešće prilikom infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. Predstavnik prvog prirodno izoliranog makrolidnog antibiotika je eritromicin A, izoliran iz soja mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*. Njegovim otkrićem započelo je „zlatno doba“ makrolidnih antibiotika.

Azitromicin je glavni predstavnik druge generacije 15-članih semisintetskih derivata eritromicina, a glavna razlika je uvođenje dušikovog atoma u aglikonski prsten te znatno poboljšana farmakokinetika.

S obzirom na povećanu otpornost bakterija na postojeće antibiotike, nameće se potreba za novim spojevima koji će pokazati aktivnost i na rezistentne sojeve bakterija. Posljednjih godina od sve većeg interesa u farmaceutskoj industriji su tiosemikarbazoni koji pokazuju značajnu antiinfektivnu aktivnost.

Cilj ovog rada je pripremiti i okarakterizirati makrozone, nove konjugate azitromicina i tiosemikarbazona. U tu svrhu koristit će se metode sintetske kemije te metode identifikacije i karakterizacije spojeva: spektroskopija NMR, spektrometrija masa i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

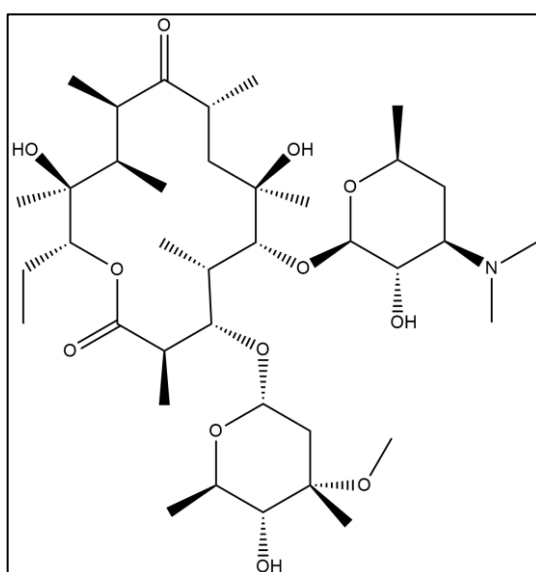
2.1. Makrolidi

2.1.1. Povijest, uporaba i podjela makrolida

Izraz „makrolid“ prvi put se spominje 1957. godine u radu Roberta B. Woodwarda,¹ a koristio se za opisivanje prirodnih antibiotika čiju strukturu karakteriziraju 12-, 14- i 16-člani makrociklički laktonski prstenovi (aglikoni) koji na sebe imaju vezane molekule ugljikohidrata, aminošećera i neutralne šećere od kojih su najčešći kladinoza i desozamin.

Makrolidi predstavljaju skupinu antibiotika širokog spektra djelovanja. Koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim (primjerice *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*), nekim Gram-negativnim bakterijama (*Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*), unutarstaničnim organizmima (*Chlamydia pneumoniae* i *Coxiella burnetti*), te su uz to pokazali antiupalno, antimalarično i antikancerogeno djelovanje.^{2,3}

Otkrićem eritromicina A 1952. godine započelo je zlatno doba makrolidnih antibiotika. Eritromicin A (slika 1) izoliran je iz soja mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*. Uz eritromicin A, *S. erythraea* proizvodi i nekoliko drugih vrsta eritromicina (B, C, D i F).



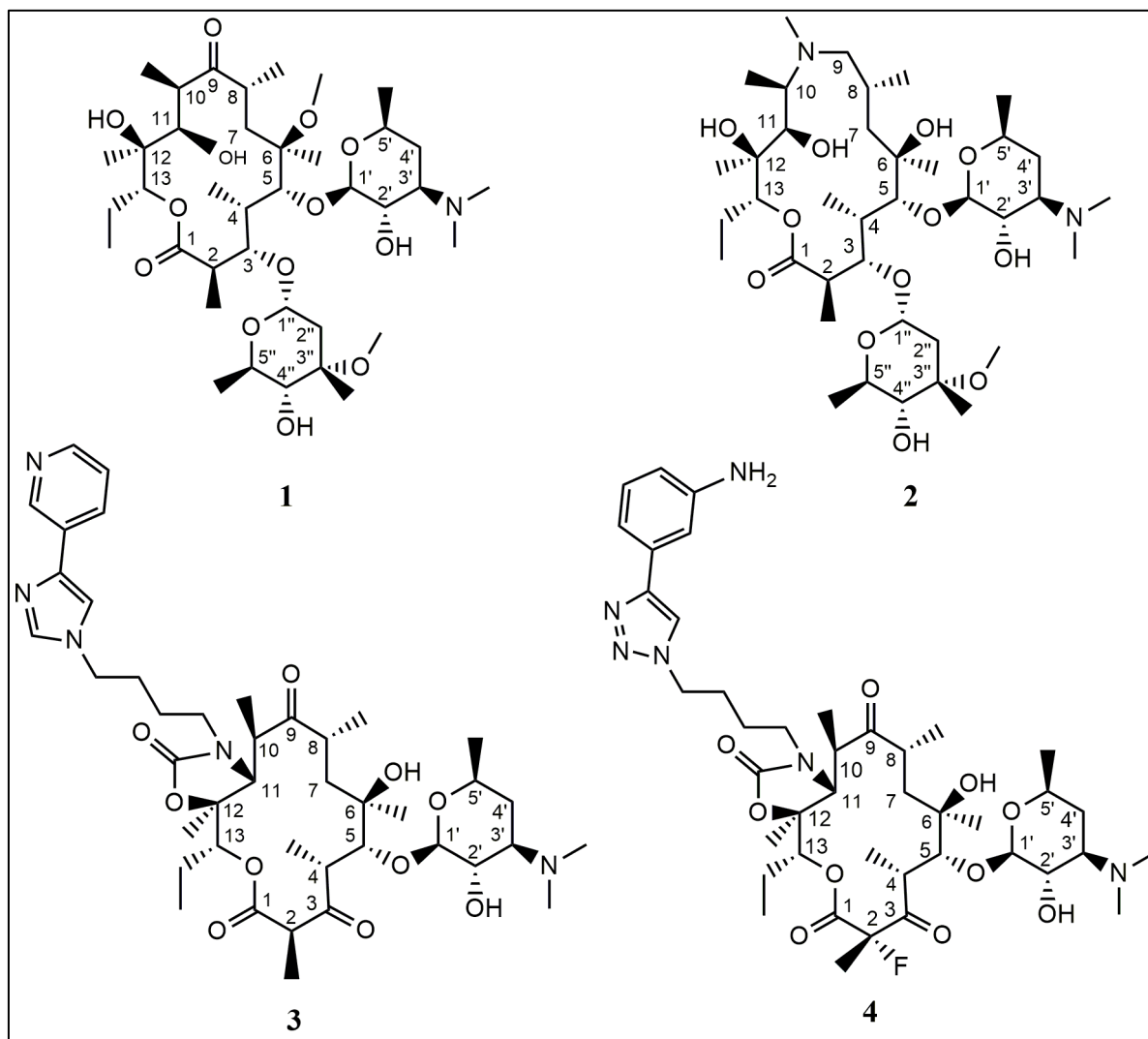
Slika 1. Struktura eritromicina A.

Nestabilnost eritromicina A u kiseloj sredini želuca, loša oralna bioraspoloživost, gastrointestinalne nuspojave i još neka svojstva ograničavaju njegovu uporabu, stoga je sintetiziran niz derivata među kojima su se naročito istaknuli klaritromicin i azitromicin. Klaritromicin pripada skupini 14-članih makrolida kao i eritromicin (prva generacija makrolida), a od eritromicina se strukturno razlikuje samo po uvedenoj metoksi skupini na položaju C6 (**1**, slika 2). Azitromicin (**2**, slika 2) (druga generacija makrolida) pripada skupini polusintetskih 15-članih makrolida koji se zbog prisutnog dušikovog atoma u aglikonskom prstenu nazivaju azalidi.⁴

Prednosti azitromicina i klaritromicina su široki spektar antibakterijske aktivnosti, poboljšana farmakokinetička svojstva, te neznatne nuspojave u odnosu na eritromicin A.⁴ Međutim, zbog sve većeg porasta bakterija rezistentnih na makrolide nastavljaju se istraživanja u smjeru razvoja novih makrolidnih antibiotika djelotvornih na rezistentne sojeve.

Osim prve i druge generacije makrolida, razlikujemo i treću generaciju makrolidnih antibiotika, ketolide. Glavni predstavnik je telitromicin (**3**, slika 2). Ketolide karakterizira prisutnost keto skupine na položaju C3 aglikonskog prstena umjesto šećera kladinoze i alkil-heteroaril bočni lanac. Koriste se u liječenju bakterijskih infekcija dišnog sustava, uključujući i infekcije uzrokovane bakterijama koje su stekle otpornost na makrolide prvih dviju generacija. Telitromicin je pak zbog izazivanja niza nuspojava (tzv. *Ketek nuspojave*) kod pacijenata povučen sa tržišta.⁴

Kako bi se savladale te nuspojave, razvijena je četvrta generacija makrolida nazvanih fluoroketolidi. Prvi sintetizirani fluoroketolid, solitromicin (**4**, slika 2), sadrži 1,2,3-triazol-aminofenil kao bočni lanac i atom fluora na C2 položaju koji interagira s bakterijskim ribosomom.⁴



Slika 2. Strukture makrolida: klaritromicin (1), azitromicin (2), telitromicin (3) i solitromicin (4).

2.1.2. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika

Makrolidi ulaze u bakterijsku stanicu gdje se vežu za 50S podjedinicu ribosoma u ranoj fazi translacijskog procesa. Bakterijski ribosom predstavlja mjesto gdje se genetički kod translacija u proteine. Makrolidi se vežu za ribosomsku 23S rRNA u domeni V na ili blizu regije peptidil transferaze i na taj način blokiraju izlazni tunel iz kojeg novosintetizirani protein izlazi.⁵⁻⁷

Mehanizam inhibicije sinteze bakterijskog proteina ovisi o kemijskoj strukturi makrolida koja uvjetuje interakcije makrolida i ribosoma bakterijske stanice, a one pak uvjetuju točan mehanizam djelovanja antibiotika. Postoje 4 mehanizma inhibicije sinteze bakterijskog proteina: inhibicija elongacije početnog peptidnog lanca tijekom rane faze translacije,

induciranje disocijacije peptidil tRNA s ribosoma, inhibicija stvaranja peptidnih veza i interferencija s 50S ribosomskom podjedinicom.⁷

Kristalne strukture azitromicina s velikim ribosomskim podjedinicama bakterija *Thermus thermophilus* i *Haloarcula marismorui* pokazale su prisutnost jedne molekule azitromicina u strukturi, dok je struktura azitromicina s ribosomskom podjedinicom bakterije *Deinococcus radiodurans* pokazala prisutnost dviju molekula azitromicina. U slučaju prvih dviju kristalnih struktura, uspostavljaju se hidrofobne interakcije između laktonskog prstena azitromicina i hidrofobne površine izlaznog tunela ribosoma. Kod *Deinococcus radiodurans* azitromicin se veže za domenu V 23S rRNA. Molekula azitromicina uspostavlja vodikovu vezu između hidroksilnih skupina na položaju C11 i C12 (slika 3), i kisika ribosomskog nukleotida što dovodi do čvršćeg vezanja. Dušikov atom laktonskog prstena i šećer kladinoza ne pridonose vezanju za ribosom, a dvije molekule azitromicina povezane su međusobno vodikovom vezom između šećera desozamina druge molekule azitromicina i kisika na položaju C1 (slika 3) laktonskog prstena prve molekule.⁸

Afinitet pojedinog antibiotika za vezno mjesto na ribosomu definira se kinetičkom konstantom formiranja kompleksa makrolid-ribosom, a uvelike ovisi o strukturi, odnosno konformaciji makrolida.⁹

Spektroskopske metode kojima se mogu pratiti interakcije bioaktivnih molekula, kao i konformacije vezanog liganda (tr-NOESY i STD) bit će opisane u poglavljima 2.2.6. i 2.2.7.⁸ Osim spomenutih, postoji niz drugih metoda kojima se mogu okarakterizirati interakcije protein-ligand, a to su: difrakcija rendgenskih zraka, fluorescencijska spektroskopija, kapilarna elektroforeza, metoda otisaka stopa (engl. *RNA footprinting*), kalorimetrija i dr.⁸

2.1.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike

Postoji niz mehanizama rezistencije bakterija na makrolide, kao što su primjerice: modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika u ribosomu, izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks) i inaktivacija antibiotika bakterijskim enzimima.

Prvi istaknuti mehanizam jest modifikacija ciljnog mjesta u ribosomu, a odnosi se na metiliranje ili dimetiliranje nukleotida podjedinice rRNA zbog čega je sterički onemogućeno vezanje antibiotika. Enzimi odgovorni za takav mehanizam rezistencije su *Erm* metiltransferaze.

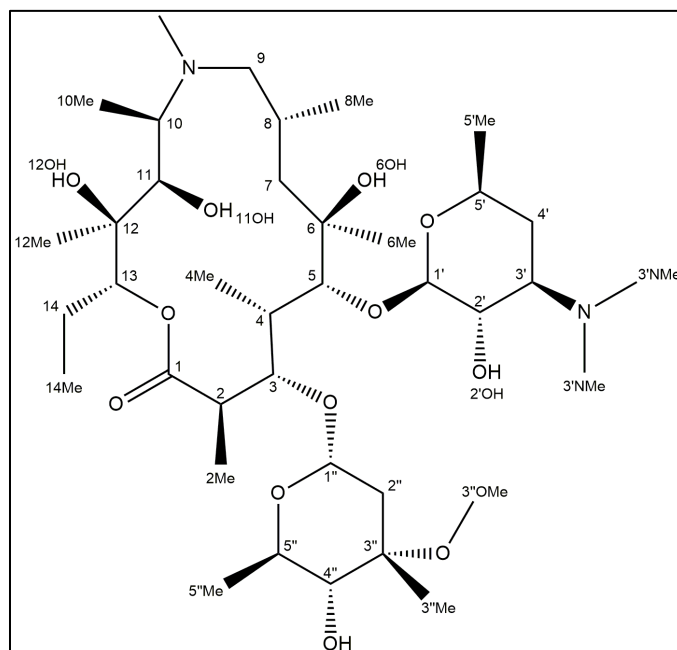
Drugi istaknuti mehanizam rezistencije je efluks, pri čemu bakterijska stanica izbacuje makrolide izvan stanice posredovano *Mef* genima, pomoću energijske pumpe (proton pumpa na staničnoj stijenci ili ATP/ADP ovisna pumpa).^{6,8-11}

Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolide (M), linkozamide (L) i streptogramine (S) (MLS-rezistencija) mogu biti inducibilnog (iMLS) ili konstitutivnog (cMLS) tipa. Inducibilna rezistencija se aktivira tek u prisutnosti antibiotika, dok se konstitutivni tip rezistencije razvije bez prisutnosti antibiotika.⁸

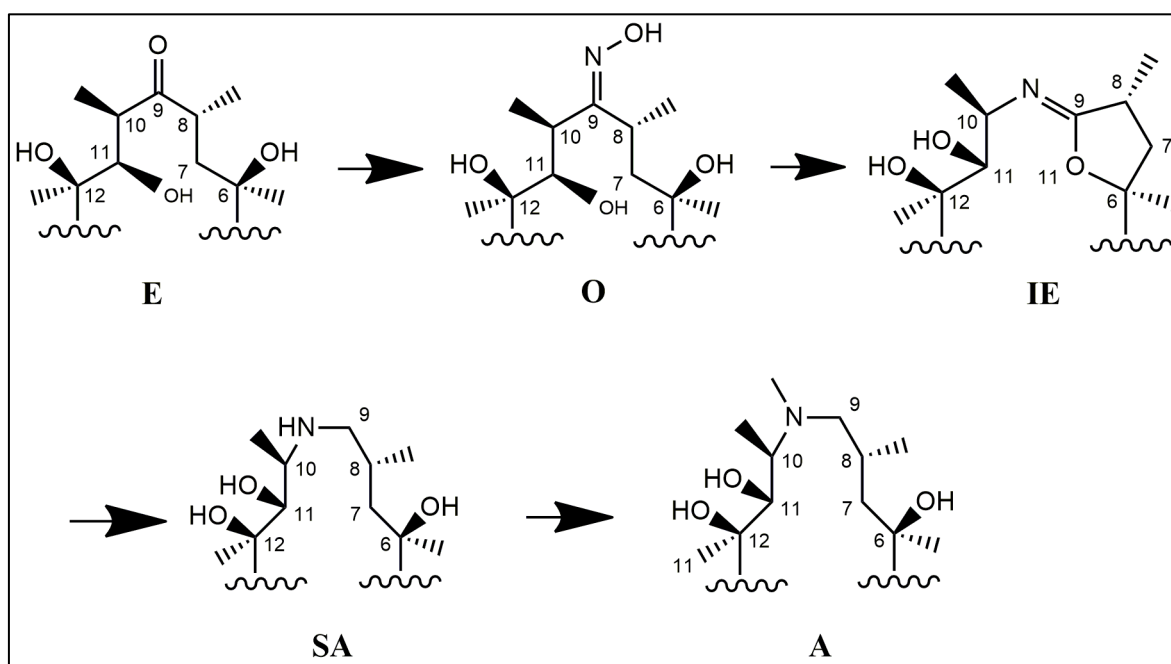
2.1.4. Druga generacija makrolida - azitromicin

Azitromicin (slika 3) je prvi put sintetiziran 1980. godine u PLIVI. Odlikuje se širokim spektrom antibakterijske aktivnosti koja pokriva sve Gram-pozitivne bakterije povezane s infekcijama respiratornog trakta uključujući i neke Gram-negativne bakterije kao što su *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Velika prednost azitromicina pred drugim makrolidnim antibioticima je njegova iznimna farmakokinetika i metabolička stabilnost. Karakterizira ga dobra oralna bioraspodjivost, dugo vrijeme poluživota u odnosu na već postojeće makrolidne antibiotike, te nakupljanje u tkivima u visokoj koncentraciji.³ Upravo ova svojstva dovela su do široke uporabe azalida, što je otvorilo put i za sintezu novih derivata azitromicina.

Azitromicin se dobiva reakcijom Beckmannove pregradnje (9*E*)-eritromicin-oksima, koji se pak dobiva reakcijom eritromicina i metilamina, pri čemu nastane 9-deokso-9*a*-aza-9*a*-homoeritromicin-ciklički-iminoeter. Daljnjom redukcijom iminoetera i N-metilacijom nastaje azitromicin (shema 1.).^{12,13}



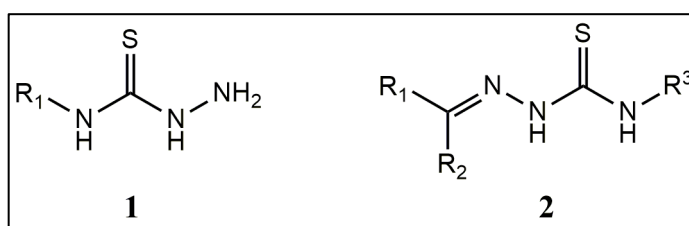
Slika 3. Struktura azitromicina s označenim lokantima.

Shema 1. Sintetski put azitromicina (A) iz eritromicina (E) uz prikaz međuprodukata: oksima (O), cikličkog iminoetera (IE) i sekundarnog amina (SA).¹²

2.1.5. Tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni

Male molekule tradicionalno su pouzdan izvor za otkrivanje novih biološki aktivnih komponenti i za razliku od kompleksnih i vrlo velikih spojeva, puno ih je lakše pripremiti. Tiosemikarbazoni (slika 4) su se pokazali kao vrlo dobri agensi u borbi protiv Gram-pozitivnih (*S. aureus* i *S. pyogenes*) i Gram-negativnih bakterija (*E. coli*) te su ujedno pokazali i citotoksične efekte. Tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni mogu djelovati kao slobodni ligandi ili u kompleksu s nekim metalom, npr. bakrom ili niklom.^{14,15}

Neki od istaknutih mehanizama¹⁸ djelovanja navedenih spojeva su inhibicija enzima ribonukleaze reduktaze i topoizomeraze II. Topoizomeraza II je enzim odgovoran za odmotavanje i zamotavanje dvostruke uzvojnice DNA prilikom sinteze proteina. Inhibicija ribonukleaze reduktaze (enzima odgovornog za sintezu deoksiribonukleotid-difosfata iz ribonukleotid-difosfata u procesu sinteze DNA) očituje se vezanjem intracelularnog atoma željeza nužnog za enzimsku funkciju.^{16,17}



Slika 4. Opće strukturne formule tiosemikarbazida (1) i tiosemikarbazona (2).

2.2. Spektroskopija NMR

Spektroskopija NMR (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) analitička je tehnika za određivanje strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. Izborno pravilo, odnosno uvjet za aktivnost jezgre u spektroskopiji NMR je $I > 0$ (I , kvantni broj nuklearnog spina). Osim kvantnog broja nuklearnog spina, jezgra posjeduje i magnetni kvantni broj (m_I) koji govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetnom polju.

Kako bi se spinovi jezgri pobudili potrebna je energija fotona koja mora biti jednaka razlici energija dvaju spinskih stanja, a moguće ju je postići pomoću vanjskog magnetnog polja ili

radiofrekvencijskih pulseva. Pritom je frekvencija fotona jednaka Larmorovoj frekvenciji precesije spinova jezgri oko vektora vanjskog magnetnog polja, pa dolazi do rezonancije.¹⁸

Interakcije spinova jezgri mogu biti električne (kvadrupolno sprezanje spinova s kvantnim brojem $I > 1/2$) i magnetne (kemijski pomak i sprezanje spin-spin) i one su prisutne kod svih NMR aktivnih jezgri.

Kemijskim pomakom (δ) naziva se položaj signala jezgre u spektru, a predstavlja pomak NMR signala jezgre od referentnog signala koji je najčešće tetrametilsilan (TMS) za jezgre ^1H i ^{13}C . Kemijski pomak se izražava bezdimenzijskom jedinicom ppm (engl. *parts per million*), a definira se kao razlika frekvencija proučavanog signala i referentnog signala podijeljena frekvencijom vanjskog magnetnog polja. Jezgra većeg kemijskog pomaka daje signal pri većoj frekvenciji i na nižem magnetnom polju od jezgre s manjim kemijskim pomakom.

U ovom radu, za karakterizaciju spojeva korištene su jednodimenzijske (^1H NMR, DEPT-Q) i dvodimenzijske tehnike NMR (COSY, HSQC, HMBC). Jednodimenzijski spektri NMR prikazuju ovisnost intenziteta signala o kemijskom pomaku. Detektirani signal se iz vremenske domene Fourierovim transformacijama prevodi u frekvencijsku domenu, što je slučaj i kod dvodimenzijskih tehnika. Dvodimenzijske spektre opisujemo s dvije dimenzije ili domene: F_1 ili evolucijskom dimenzijom i F_2 ili detekcijskom dimenzijom. Svakom signalu u 2D spektru NMR odgovara određeni intenzitet te frekvencije u F_1 , odnosno F_2 dimenziji. Signali se prikazuju uglavnom konturnim prikazom pri čemu gustoća kontura odgovara intenzitetu pojedinog signala.¹⁸

Osim što se spektroskopija NMR koristi za strukturnu analizu, posljednjih godina se primjenjuje i za izučavanje interakcija biomolekula s potencijalnim ligandima. Za razliku od rendgenske strukturne analize, spektroskopijom NMR možemo proučavati dinamiku kako velikih biomolekula tako i dinamiku kompleksa biomolekula i potencijalnih liganada. Metode kao što su tr-NOESY (engl. *transferred Nuclear Overhauserov effect spectroscopy*) i STD (engl. *Saturation transfer difference*) razvijene su za određivanje konformacije vezanog liganda, odnosno za određivanje skupina atoma koje su izravno odgovorne za vezanje liganda u aktivno mjesto biomolekula (mapiranje epitopa).¹⁹

2.2.1. Tehnika ^1H NMR

Ovom se tehnikom detektiraju signali kemijski neekvivalentnih protona u spoju, a njihov broj je proporcionalan omjeru površina ispod pojedinih signala. ^1H NMR spektar daje nam prvi uvid u strukturu molekule.

2.2.2. Tehnika DEPT

DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*) je jednodimenzijaska tehnika koja omogućava editiranje spektara heterojezgri (^{13}C) prema multiplicitetu uz pojačanje intenziteta signala ^{13}C jezgri. Tehnika DEPT-Q je modifikacija tehnike DEPT, a jedina razlika je što omogućava pobudu kvaternih ugljikovih atoma, što nije moguće tehnikom DEPT.

2.2.3. Tehnika COSY

COSY (engl. *correlation spectroscopy*) je najučestalija homonuklearna 2D tehnika koja se koristi za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. Spektar tehnike COSY je simetričan, a postoje samo dijagonalni signali ako nema sprezanja među spinovima, odnosno izvandijagonalni ako sprega postoji.

2.2.4. Tehnika HSQC

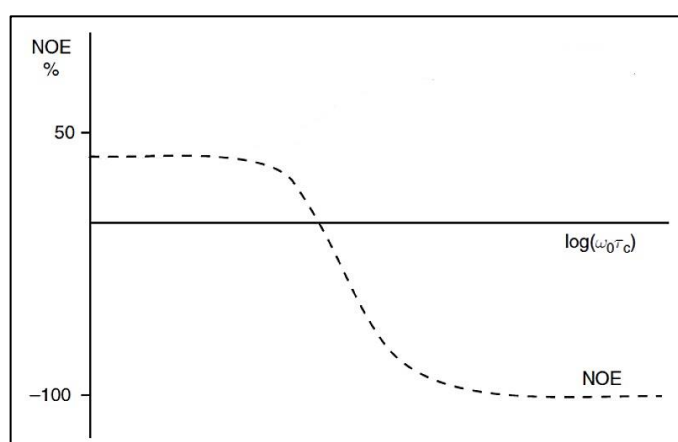
HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) se koristi za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (^{13}C , ^{15}N), odnosno dobivamo informaciju o povezanosti protona i ugljikovih ili dušikovih atoma kroz jednu vezu.

2.2.5. Tehnika HMBC

HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) tehnika omogućava uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze te povezivanje pojedinih spinskih sustava. Prednost navedene tehnike je opažanje i korelacije između protona i kvaternih ugljikovih atoma.¹⁸

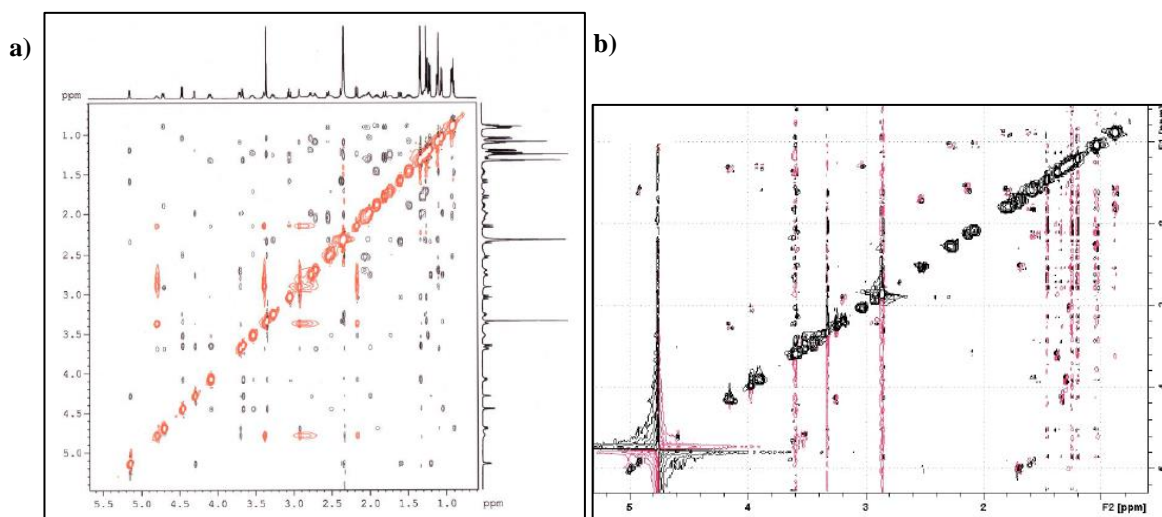
2.2.6. Tehnika tr-NOESY

Tr-NOESY (engl. *transferred Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) je tehnika koja se zasniva na nuklearnom Overhauserovom efektu (NOE). Efekt NOE temelji se na križnoj relaksaciji dipolno spregnutih spinova čija je udaljenost manja od 5 Å. Osim udaljenosti spinova, na vrijednost i predznak efekta NOE utječe i korelacijsko vrijeme. Korelacijsko vrijeme je prosječno vrijeme potrebno molekuli da se zarotira za kut od jednog radijana oko bilo koje osi. Ovisnost efekta NOE o korelacijskom vremenu prikazana je na slici 5.



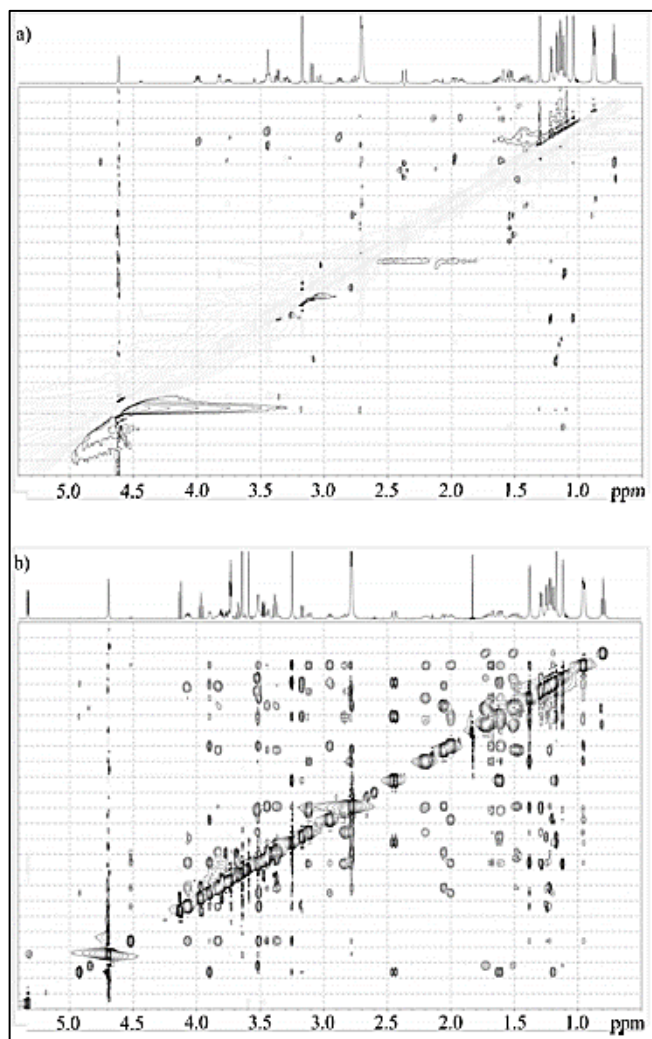
Slika 5. Ovisnost intenziteta efekta NOE o logaritmu umnoška frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena.¹⁹

Korelacijsko vrijeme ovisi o veličini molekule i viskoznosti otapala. Što je molekula manja, korelacijsko vrijeme je veće, odnosno što je molekula veća korelacijsko vrijeme je manje. NOE efekt je pozitivan za molekule manje molekulske mase, a negativan za molekule veće molekulske mase. Za molekule srednje veličine (1000 Da), kao što je antibiotik azitromicin, vrijednost navedenog efekta bit će vrlo mala ili jednaka nuli. Kako korelacijsko vrijeme ovisi i o viskoznosti otapala, kontakti NOE vidjet će se u spektru NOESY azitromicina snimljenog u kloroformu-d, dok će u D₂O vrijednost efekta NOE biti jednaka nuli (slika 6).



Slika 6. Spektar NOESY azitromicina snimljen u: **a)** kloroformu-d i **b)** D₂O.¹⁸

Kada se mala molekula veže na receptor koji je obično makromolekula, tada je korelacijsko vrijeme vezanog stanja određeno većom molekulskom masom kompleksa, a s obzirom da velike molekule daju negativni efekt NOE, tako će i vezano stanje azitromicina i ribosoma dati intenzivne negativne signale u spektru NOESY (slika 7). Stoga se tehnikom tr-NOESY mogu dobiti informacije o vezanoj konformaciji liganada. No, glavni nedostatak ove metode je primjenjivost samo na slabo vežuće ligande (mala sklonost vezanja, $K_d > 100 \text{ mmol L}^{-1}$) čije je vrijeme života slobodnog i vezanog stanja nekoliko stotina milisekundi. Ovakvi eksperimenti provode se s velikim suviškom liganda (deset do sto puta u suvišku) u odnosu na receptor kako se signali molekule receptora ne bi vidjeli u spektru.^{8,19}



Slika 7. Spektar NOESY azitromicina u slobodnom stanju (a) i vezanom stanju (b) nakon dodatka ribosoma bakterije *E. coli* u TRIS puferu.²⁰

2.2.7. Tehnika STD

STD (engl. *Saturation transfer difference*) ili razlika prijenosa zasićenja pouzdana je tehnika NMR za probir potencijalno aktivnih molekula liganada u smjesi, odnosno možemo razlikovati vežuće ligande od nevežućih. Temelji se na selektivnom zasićenju signala proteina i prijenosu magnetizacije na vezane ligande mehanizmom spinske difuzije, te se potom promatra učinak prijenosa magnetizacije s jezgri proteina na jezgre liganda. Stupanj zasićenosti, odnosno intenzitet signala protona liganda u spektru STD-NMR ovisi o prostornoj udaljenosti tog protona od površine proteina. Protoni liganda koji se nalaze najbliže proteinu daju najjači

signal, dok će signali protona koji su najudaljeniji od aktivnog mjesta proteina dati najslabiji signal. Stoga tehnika STD omogućava mapiranje epitopa, to jest detekciju dijelova liganda koji se vežu za aktivno mjesto proteina. Glavna prednost tehnike STD je što nije ograničena na male proteine, nego se može primijeniti i na veće makromolekule, primjerice ribosome.^{8,19,20}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i instrumentacija

Kemikalije korištene u izradi diplomskog rada, njihovi proizvođači te čistoće navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u diplomskom radu.

| Kemikalija | Proizvođač | Čistoća |
|---|------------------------|---------|
| Diklormetan | Carlo Erba Reagents | 99,9% |
| Metanol | Merck Chemicals | 99,9% |
| Amonijak (25%) | Alkaloid Skopje | |
| Silikagel LC60A40-63 micron | Fluorochem | |
| Koncentrirana octena kiselina | Gram-Mol | |
| Acetonitril | Fisher Scientific U.K. | 99,9% |
| DMSO-d ₆ | Eurisotop | 99,8% |
| kloroform-d | Eurisotop | 99,8% |
| Pre-coated TLC pločice ALUGRAM SIL G | Macherey-Nagel | |
| 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> - 1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinijev-3- oksid heksafluorofosfat (HATU) | Acros Organics | 97% |
| <i>N,N</i> -diisopropiletilamin (DIPEA) | Acros Organics | 99,5% |
| Hidrazin monohidrat | Sigma-Aldrich | 98% |
| 1-[(4- izotiocijanatofenil)sulfonil]piperidin | aber | 97% |
| Etoksikarbonil izotiocijanat | Acros Organics | 95% |
| 3,4-metilendioksifenil izotiocijanat | Fluorochem | 99% |
| Furfuril izotiocijanat | Alfa Aesar | 97% |
| 3-piridil izotiocijanat | Maybridge | 95% |
| Metil-3-izotiocijanatotiofen-2- karboksilat | Fluorochem | 99% |

Instrumenti korišteni prilikom izrade diplomskog rada navedeni su tablici 2.

Tablica 2. Popis instrumenata korištenih za analizu i karakterizaciju spojeva.

| Instrument | Proizvođač |
|--|-----------------------|
| Rotavapor R-100 | Büchi |
| NMR spektrometar Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend | Bruker |
| Mettler AT261 DeltaRange | Mettler |
| HPLC | Agilent 1260 Infinity |
| MS | Waters UPLC ESI MS |

3.2. Priprava makrozona; konjugata derivata azitromicina i tiosemikarbazona

3.2.1. Priprava tiosemikarbazona

Priprava makrozona sastoji se od tri koraka. U prvom sintetskom koraku pripremljeni su tiosemikarbazoni (*N*-aril-hidrazin-karbotioamidi) reakcijom različitih izotiocijanata (1 mmol) i hidrazin monohidrata (1,2 ekvivalenta; 90,95 μ L) u izopropanolu (10 mL). Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj mješalici jedan sat u ledenoj kupelji pri čemu dolazi do nastanka taloga, tiosemikarbazona. Nastali talog profiltrira se pod sniženim tlakom preko Büchnerova lijevka i osuši.

3.2.2. Priprava tiosemikarbazona

Drugi sintetski korak obuhvaća pripremu tiosemikarbazona (*4-((2-aril-karbamotioilhidraziniliden)metil)benzojevih kiselina*) reakcijom tiosemikarbazona, 4-formilbenzojeveve kiseline i koncentrirane octene kiseline u propan-2-olu (11 mL). Reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi 24 h uz miješanje na magnetskoj mješalici. Nastali talog se profiltrira uz sniženi tlak preko Büchnerovog lijevka i osuši.

3.2.3. Priprava makrozona

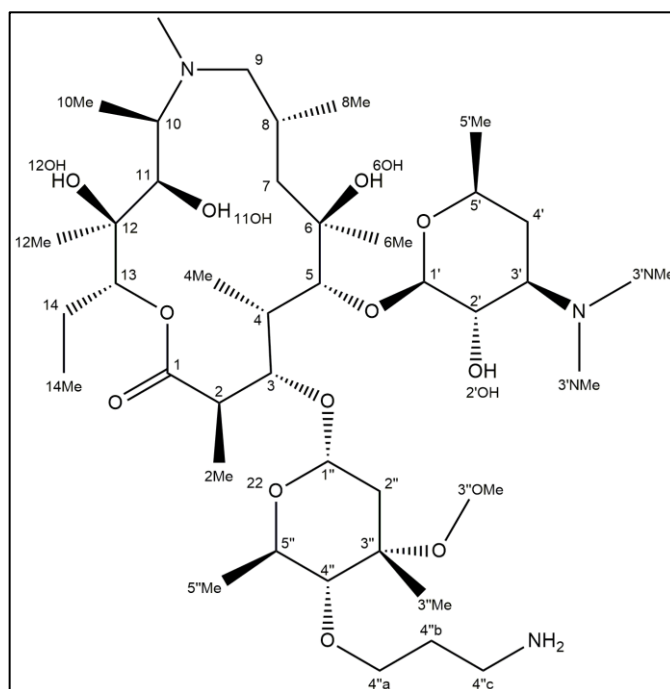
Treći i konačni korak pripreme makrozona obuhvaća reakciju 4"-aminopropilnog derivata azitromicina (slika 8) i tiosemikarbazona. U okruglu tikvicu stavi se odgovarajući tiosemikarbazon, DIPEA (3 ekvivalenta), HATU (1,1 ekvivalenta) i 5 mL diklormetana.

Reakcijska smjesa miješa se uz pomoć magnetske miješalice 30 minuta na sobnoj temperaturi, zatim se doda 4''-aminopropilni derivat azitromicina. Nakon 24 h miješanja pri sobnoj temperaturi, otapalo se upari i dobije se žuto obojeni produkt, makrozon.

Tijek reakcija za sva tri koraka praćen je tankoslojnom kromatografijom. Kao nepokretna faza koristio se silikagel nanesen na staklenu pločicu, a kao pokretna faza sustav otapala E^+ $CH_2Cl_2 : CH_3OH : NH_3$ (25%) = 90 : 15 : 1,5. Reaktanti i produkti vizualizirani su na pločici korištenjem UV lampe uz valne duljine 254 nm i 366 nm te prskanjem pločice 10%-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu.

3.3. Pročišćavanje 4''-aminopropilnog derivata azitromicina

Trećem koraku pripreve makrozona prethodilo je pročišćavanje 4''-aminopropilnog derivata azitromicina (slika 8). Priprava tog spoja nije dio ovog diplomskog rada, a kako je za njegovu pripravu iz azitromicina potrebno pet sintetskih koraka, u daljnjem tekstu koristit će se oznaka **P5**.



Slika 8. Struktura 4''-aminopropilnog derivata azitromicina uz označene lokante.

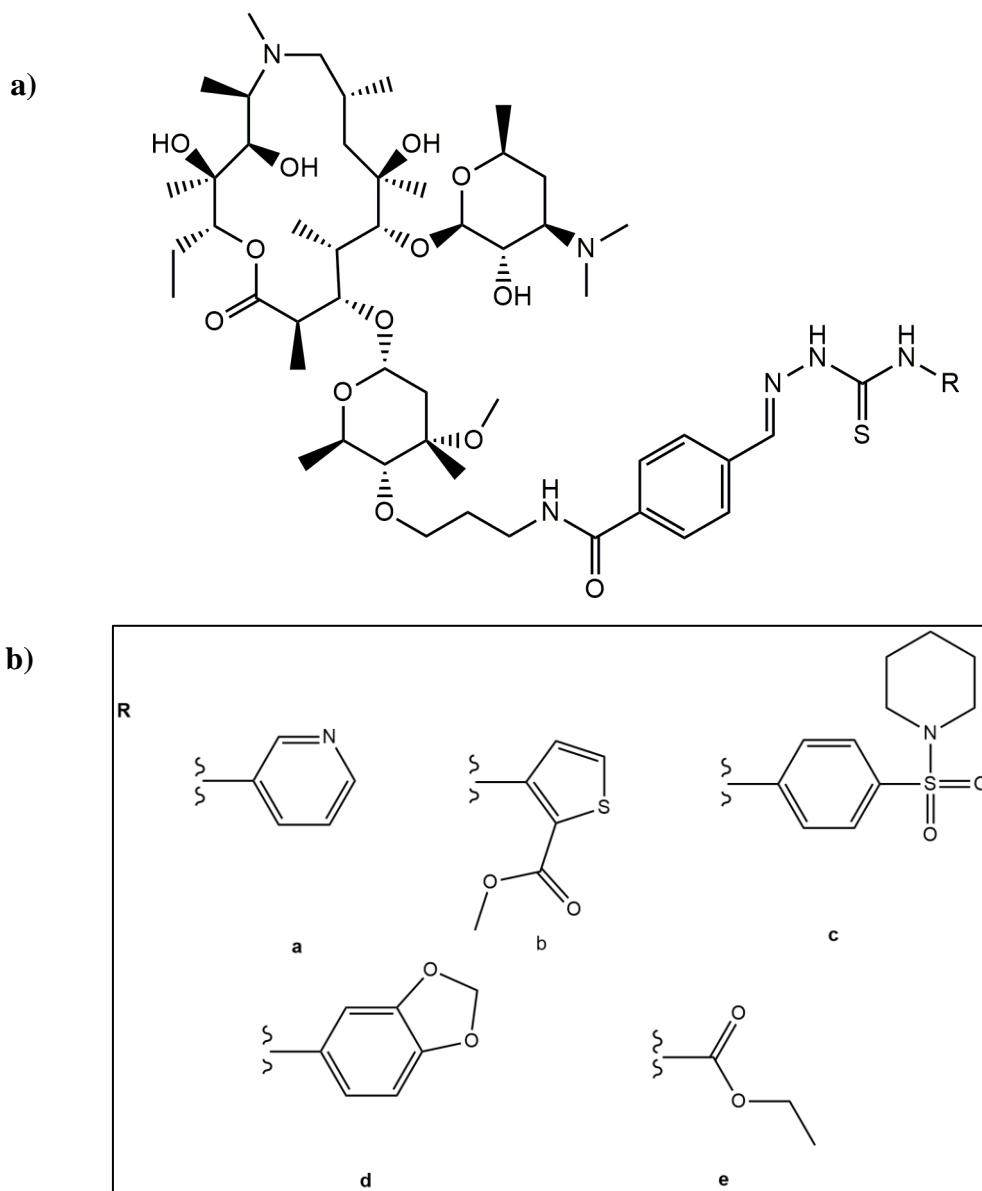
Za pročišćavanje spoja **P5** primijenjena je kromatografija na stupcu. Kao nepokretna faza korišten je silikagel (hidratizirani SiO_2), a kao pokretna faza sustav otapala $CH_2Cl_2 : CH_3OH :$

NH_3 (25%) = 90 : 15 : 1,5 (E^+). Kolona je ispunjena suspenzijom silikagela ($m = 55$ g) u diklormetanu, zatim je nanesen uzorak **P5** ($m = 550$ mg) otopljen u maloj količini diklormetana te je provedeno gradijentno eluiranje. Gradijentno eluiranje započeto je s čistim diklormetanom, nakon čega se postupno mijenjao sastav mobilne faze povećanjem količine sustava otapala E^+ za 10%. Eluat je skupljan kao frakcije od 15 mL, koje su analizirane tankoslojnom kromatografijom (TLC). TLC se provodio na aluminijskim pločicama presvučenima 0,20 mm debelim slojem silikagela. Za detektiranje spojeva na pločicama koristila se tehnika prskanja 10%-tnom sumpornom kiselinom u etanolu.

3.4. Pročišćavanje makrozona

Pripravljene makrozoni **4a**, **4b** i **4e** (Slika 9) pročišćeni su pomoću semipreparativne tekućinske kromatografije.

Za pročišćavanje makrozona **4c** i **4d** (Slika 9) korištena je spregnuta tehnika tekućinske kromatografije i ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Liquid chromatography-solid phase extraction*, LC-SPE). Spojevi su odijeljeni na tekućinskom kromatografu Agilent 1260 Infinity opremljenom automatskim uzorkivačem, kvaternom pumpom, termostatiranim prostorom za kolonu i detektorom s nizom fotodioda. Dimenzija korištene kromatografske kolone Waters XBridge Phenyl iznosila je 150 mm × 4,6 mm, a promjer čestica punila 3,5 μm . Kao pokretna faza koristila se smjesa acetonitrila i amonijačnog pufera ($\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{HCO}_3$) koncentracije soli 10 mmol L^{-1} , vrijednosti pH = 10. Protok pokretne faze iznosio je 1 mL min^{-1} . Provedeno je gradijentno eluiranje, volumen injektiranja bio je 15 μL , a valna duljina detekcije 210 nm. Nakon odjeljivanja na kromatografskoj koloni makrozoni su izolirani na SPE-kolone *HySphere* C18 (10 mm x 2 mm) pomoću uređaja *Prospekt 2* proizvođača *Spark Holland*, Nizozemska. Dodatni protok pufera (tzv. *make-up* protok) bio je 1,5 mL min^{-1} . Nakon sušenja SPE-kolona u struji dušika spojevi su eluirani deuteriranim acetonitrilom u cjevčice NMR promjera 3 mm.



Slika 9. Opća struktura pripremljenih makrozona (a) i struktura supstituenata (b).

3.5. Karakterizacija sintetiziranih spojeva

Prisutnost makrozona u reakcijskoj smjesi potvrđena je spektrometrijom masa. Spektri masa snimljeni su na spektrometru Waters UPLC ESI MS uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom ionizacijskom modu.

Kvantitativna analiza reakcijske smjese provedena je tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) prema uvjetima opisanima u poglavlju 3.4. Također, provjerena je čistoća makrozona nakon izolacije spojeva

iz reakcijske smjese. Za analizu HPLC pripravljene su otopine reakcijskih smjesa koncentracije 5 mg mL^{-1} i izoliranih makrozona koncentracije $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ u acetonitrilu. Pomoću metode normalizacije pikova u kromatogramu određen je udio makrozona u reakcijskoj smjesi, kao i čistoća istih nakon izolacije iz reakcijske smjese. Prema navedenoj metodi udio neke komponente u uzorku se dobije iz omjera površine kromatografske krivulje određivane komponente i ukupne površine svih kromatografskih krivulja.

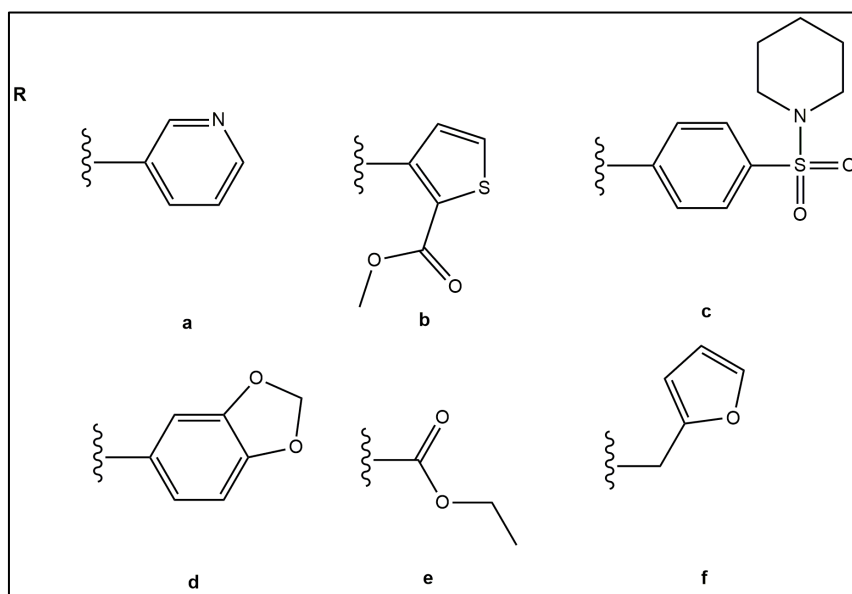
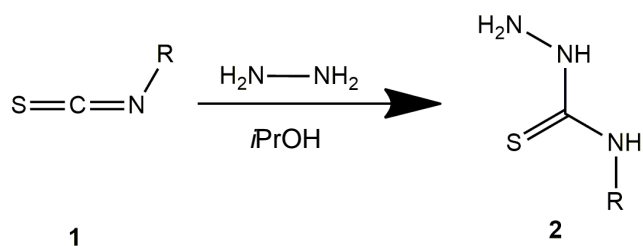
Strukture nastalih produkata: tiosemikarbazida, tiosemikarbazona i makrozona, potvrđene su spektroskopijom NMR. Uzorci su pripremljeni otapanjem 5 mg produkta u $550 \text{ }\mu\text{L}$ deuteriranog otapala. Kao otapalo korišteni su kloroform-d, acetonitril- d_3 i dimetil-sulfoksid (DMSO- d_6), a kao referentni signal korišten je tetrametilsilan (TMS). Snimljeni su jednodimenzijski (^1H i DEPT-Q) i dvodimenzijski (HSQC, HMBC, COSY) spektri na *Bruker Avance III HD* $400 \text{ MHz}/54 \text{ mm}$ Ascend NMR spektrometru s 5 mm inverznom probom BBI (engl. *broadband inverse*) i Z-gradijentnom zavojnicom pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Makrozoni predstavljaju nove konjugate tiosemikarbazona (**3a-3e**) i 4"-aminopropilni derivata azitromicina (**P5**). Za sintezu tiosemikarbazida kao polazni spojevi koristili su se izotiocijanati (**1a-1f**) koji su u reakciji s hidrazin monohidratom u izopropanolu dali odgovarajuće tiosemikarbazide (**2a-2f**). Tiosemikarbazidi u reakciji s 4-formilbenzojevom kiselinom i uz dodatak koncentrirane octene kiseline u izopropanolu daju tiosemikarbazone (**3a-3e**). Sinteza **P5** nije provedena, već se koristio **P5** koji je ranije sintetiziran na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Zavodu za analitičku kemiju, Sveučilišta u Zagrebu. Tiosemikarbazoni reagiraju s **P5** uz dodatak HATU i DIPEA-e u reakciji aciliranja amina (amidacija) i daju makrozone (**4a-4e**). Uloga DIPEA-e kao baze je deprotoniranje karboksilne skupine tiosemikarbazona i nastanak karboksilatnog aniona koji zatim napada HATU i dolazi do nastanka aktiviranog estera. Dodatkom amina (**P5**) dolazi do nukleofilnog napada amino skupine na karboksilni ugljikov atom aktiviranog estera i nastaje amidna veza (makrozon). **P5** je prije reakcije amidacije pročišćen kromatografijom na koloni, a za pročišćavanje makrozona koristila se tehnika LC-SPE i semipreparativna tekućinska kromatografija. Za karakterizaciju konačnih produkata, makrozona, korištena je: spektrometrija masa, spektroskopija NMR i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

4.1. Tiosemikarbazidi

Sintetski put pripreve tiosemikarbazida prikazan je na slici 10. Reakcijom različitih izotiocijanata i hidrazin monohidrata dobiveni su tiosemikarbazidi (**2a-2f**), dok su dobivene mase produkata, iskorištenje reakcije i nazivi dobivenih tiosemikarbazida prikazani u tablici 3.

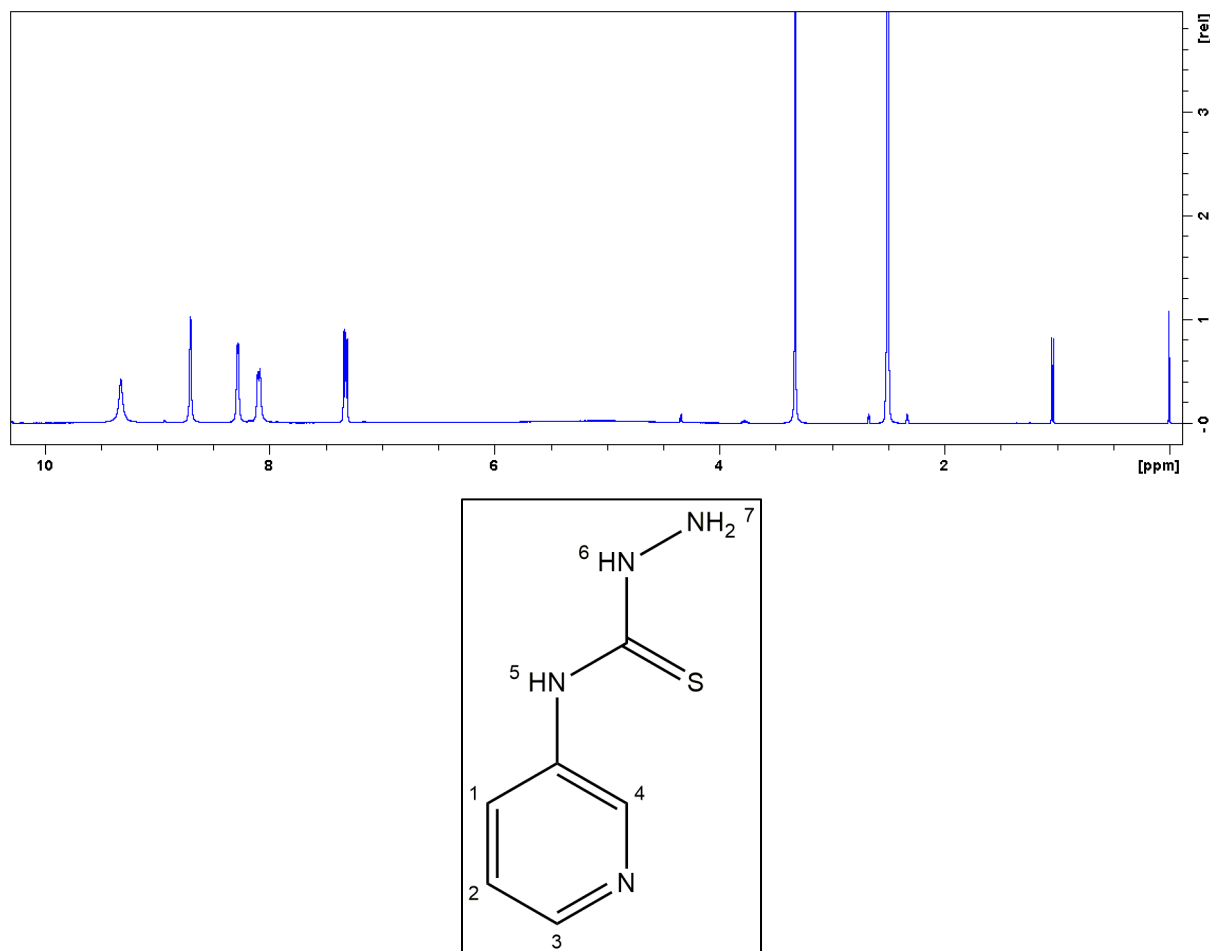


Slika 10. Shematski prikaz prvog korak sinteze makrozona - sinteza tiosemikarbazida (**2a-2f**) iz izotiocijanata (**1a-1f**) i hidrazin monohidrata.

Tablica 3. Prikaz masa/volumena polaznih reaktanata i masa produkata uz iskorištenja reakcija prvog sintetskog koraka.

| Reaktanti | | <i>m</i> / g | <i>V</i> / mL | Produkti | | <i>m</i> / g | η / % |
|-----------|--|--------------|---------------|-----------|--|--------------|------------|
| 1a | 3- izotiocijanatopiridin | - | 0,177 | 2a | <i>N</i> -(piridin-3-il)- hidrazin-karbotioamid | 0,154 | 91,6 |
| 1b | Metil-3- izotiocijanatotiofen -2-karboksilat | 0,199 | - | 2b | Metil-3- (hidrazinkarbotioamid o) tiofen-2-karboksilat | 0,183 | 79,2 |
| 1c | 1-[(4- izotiocijanatofenil) sulfonil]piperidin | 0,282 | - | 2c | <i>N</i> -(4-(piperidin-1- ilsulfonil)fenil)hidrazi nkarbotioamid | 0,255 | 81,2 |
| 1d | 3,4- metilendioksifenil- izotiocijanat | 0,179 | - | 2d | <i>N</i> - (benzo[<i>d</i>][1,3]dioksol- 5- il)hidrazinkarbotioami d | 0,083 | 46,6 |
| 1e | Etoksikarbonil- izotiocijanat | - | 0,120 | 2e | <i>N</i> -(2- etoksikarbonil)hidrazi nkarbotioamid | 0,102 | 62,6 |
| 1f | Furfuril- izotiocijanat | - | 0,097 | 2f | <i>N</i> -(furan-2- ilmetil)hidrazinkarboti oamid | / | / |

Strukture tiosemikarbazida **2a**, **2b**, **2c**, **2d** i **2e** potvrđene su spektroskopijom NMR, dok navedenom tehnikom nije potvrđena struktura spoja **2f**. Spektar ¹H NMR produkta **2a** kao i njegova struktura prikazani su na slici 11. Spektri ¹H NMR produkata **2b**, **2c**, **2d** i **2e** nalaze u dodatku (D1-D4). Tablica 4. prikazuje asignirane pomake za jezgre ¹H i ¹³C spoja **2a**.



Slika 11. Spektar ¹H NMR *N*-piridin-3-il-hidrazin-karbotioamida (**2a**) snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K (gore) i struktura spoja **2a** (dolje) uz označene lokante.

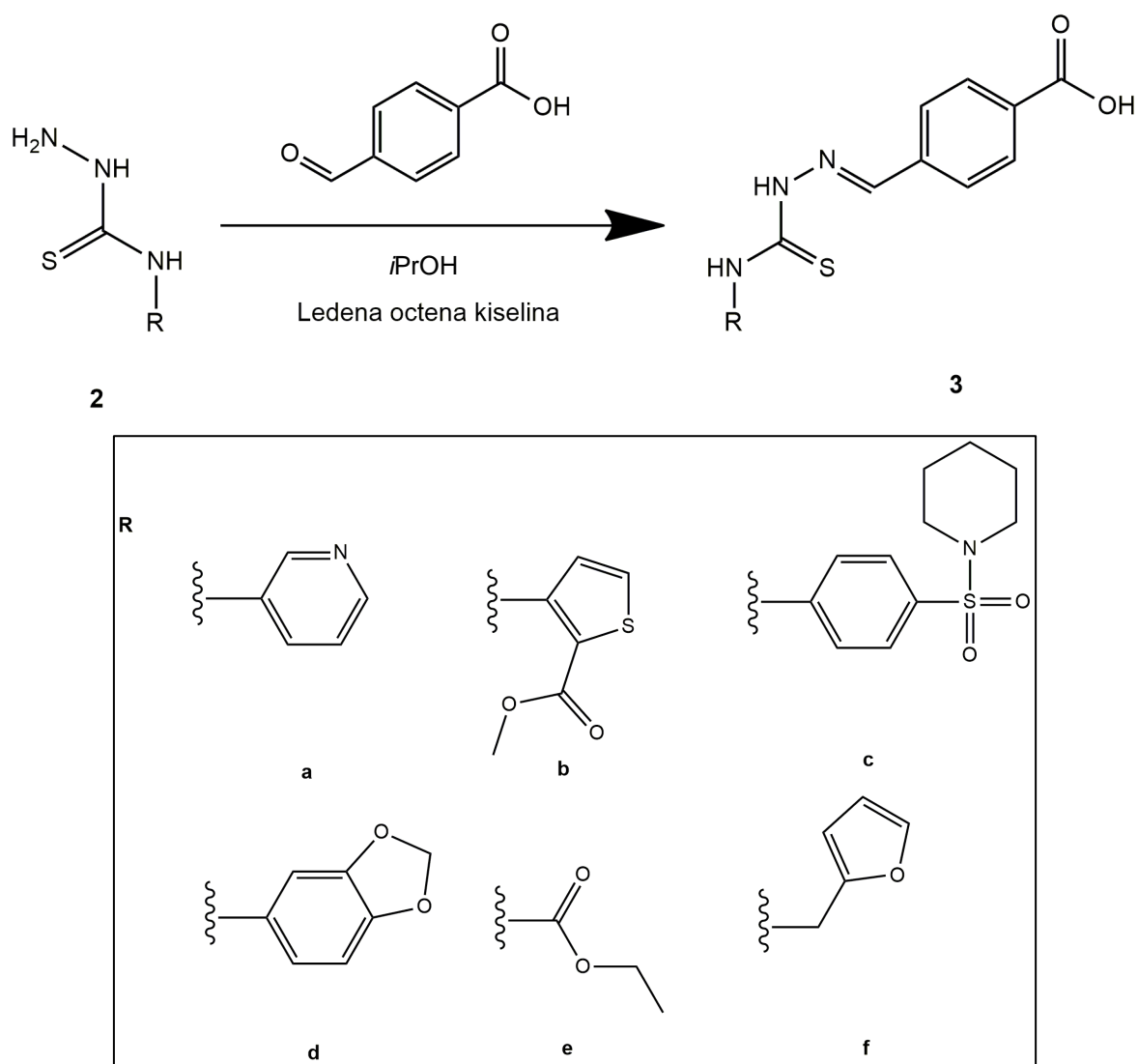
Tablica 4. Asignacija kemijskih pomaka jezgara ¹H tiosemikarbazida **2a**.

| Atom | $\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$ |
|------|---------------------------------|
| 1 | 8,10 |
| 2 | 7,33 |
| 3 | 8,29 |
| 4 | 8,71 |
| 5 | 9,33 |
| 6 | - ^a |
| 7 | - ^a |

^a - nije asignirano

4.2. Tiosemikarbazoni

Reakcijom 4-formilbenzojeve kiseline i tiosemikarbazida (**2a-2e**) dobiveni su tiosemikarbazoni (**3a-3e**). Spoj **3f** nije pripravljen zbog neuspjele sinteze tiosemikarbazida **2f**. Na slici 12. shematski je prikazan korak pripreve tiosemikarbazona, a u tablici 4. uz imena nastalih produkata, prikazane su mase i iskorištenja reakcija. Strukture spojeva potvrđene su spektroskopijom NMR.



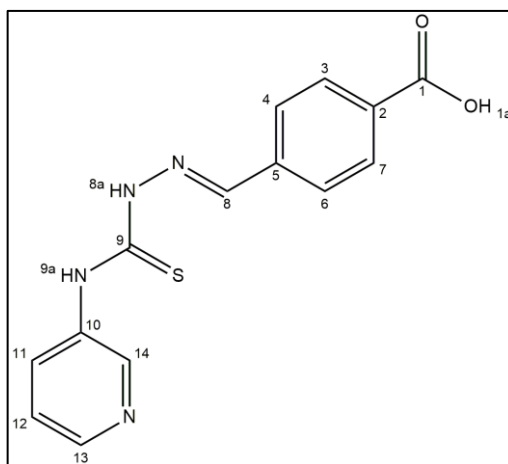
Slika 12. Shematski prikaz drugog koraka sinteze makrozona - sinteza tiosemikarbazona (**3a-3e**) iz tiosemikarbazida (**2a-2e**) i 4-formilbenzojeve kiseline.

Tablica 4. Prikaz masa polaznih spojeva drugog sintetskog koraka i masa nastalih produkata uz iskorištenja reakcija.

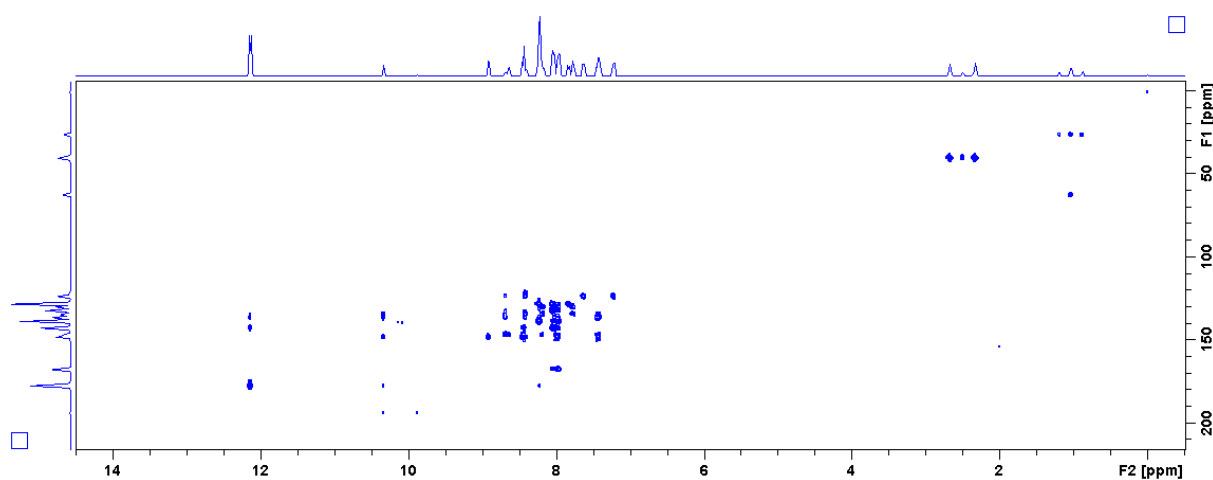
| Reaktanti | <i>m</i> / g | <i>V</i> / μ L | Produkti | | <i>m</i> / g | η / % |
|----------------------------|--------------|--------------------|-----------|---|--------------|------------|
| 2a | 0,149 | - | 3a | 4-(2-piridin-3-ilkarbamotioilhidraziniliden)metilbenzojeva kiselina | 0,143 | 47,7 |
| ledena octena kiselina | - | 5,05 | | | | |
| 4-formilbenzojeva kiselina | 0,132 | - | | | | |
| 2b | 0,173 | - | 3b | 4-((2-((3-metoksikarbonil)tiofen-2-il)karbamotioil)hidraziniliden)metilbenzojeva kiselina | 0,290 | 79,8 |
| ledena octena kiselina | - | 4,3 | | | | |
| 4-formilbenzojeva kiselina | 0,112 | - | | | | |
| 2c | 0,247 | - | 3c | 4-((2-((4-piperidin-1-ilsulfonil)fenil)karbamotioil)hidraziniliden)metilbenzojeva kiselina | 0,232 | 52 |
| ledena octena kiselina | - | 4,5 | | | | |
| 4-formilbenzojeva kiselina | 0,118 | - | | | | |
| 2d | 0,074 | - | 3d | 4-((2-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioksol-5-il)karbamotioil)hidraziniliden)metilbenzojeva kiselina | 0,108 | 31,5 |
| ledena octena kiselina | - | 2,03 | | | | |
| 4-formilbenzojeva kiselina | 0,053 | - | | | | |
| 2e | 0,093 | - | 3e | 4-((2-((etoksikarbonil)karbamotioil)hidraziniliden)metil)benzojeva kiselina | 0,138 | 46,8 |
| ledena octena kiselina | - | 3,28 | | | | |
| 4-formilbenzojeva kiselina | 0,086 | - | | | | |

4.2.1. Tiosemikarbazon **3a**

Struktura spoja **3a** (Slika 13) potvrđena je spektroskopijom NMR. Na slici 14. prikazan je spektar HMBC, preostali spektri (^1H , DEPT-Q, COSY i HSQC) nalaze se u dodatku (D5-D8). Kemijski pomaci jezgara ^1H i ^{13}C navedeni su u tablici 5.



Slika 13. Struktura tiosemeikarbazona **3a** uz označene lokante.



Slika 14. Spektar HMBC tiosemeikarbazona **3a** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

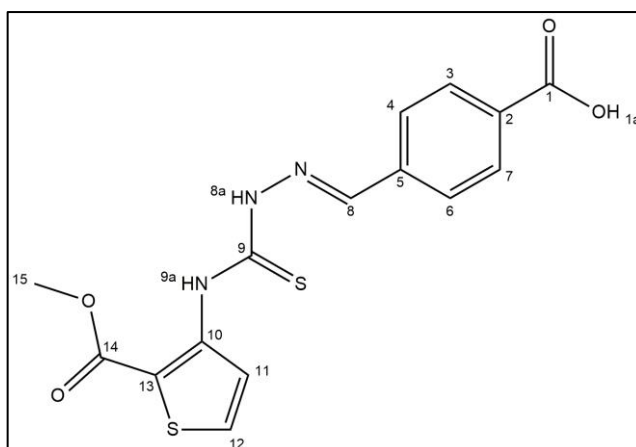
Tablica 5. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR tiosemikarbazona **3a**.

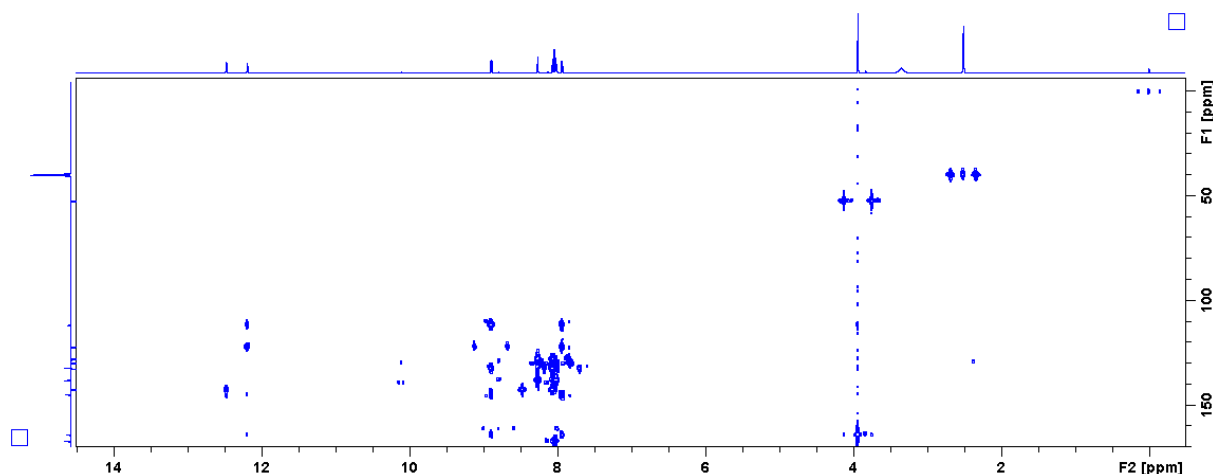
| Tiosemikarbazon 3a | | | | | |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|------|----------------------------|-------------------------------|
| Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm | Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm |
| 1a | - ^a | - | 9 | - | 172,39 |
| 1 | - | 167,42 | 9a | 10,34 | - |
| 2 | - | 132,13 | 10 | - | 136,30 |
| 3, 7 | 7,98 | 129,99 | 11 | 7,98 | 134,23 |
| 4, 6 | 8,05 | 128,15 | 12 | 7,43 | 123,47 |
| 5 | - | 138,50 | 13 | 8,42 | 146,73 |
| 8 | 8,23 | 142,67 | 14 | 8,69 | 147,93 |
| 8a | 12,15 | - | | | |

^a - nije asignirano

4.2.2. Tiosemikarbazon **3b**

Spektar HMBC spoja **3b** (slika 15) prikazan je na slici 16., a tablica 6. sadrži sve pomake jezgara ^1H i ^{13}C . Preostali spektri (^1H , DEPT-Q, COSY i HSQC) spoja **3b** nalaze se u dodatku (D9-D12).

Slika 15. Struktura tiosemikarbazona **3b** uz označene lokante.

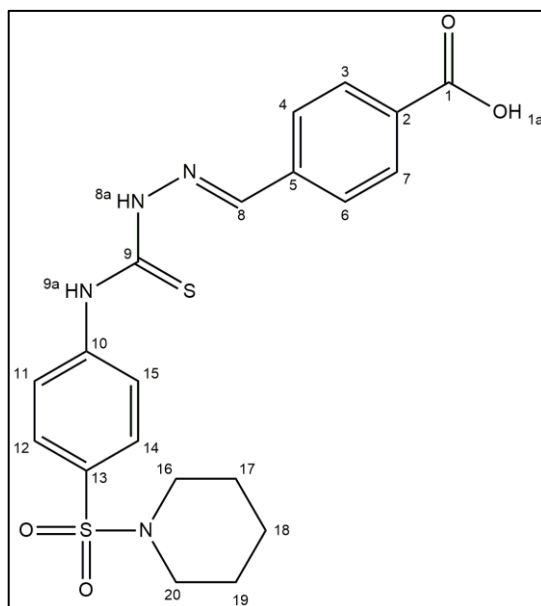
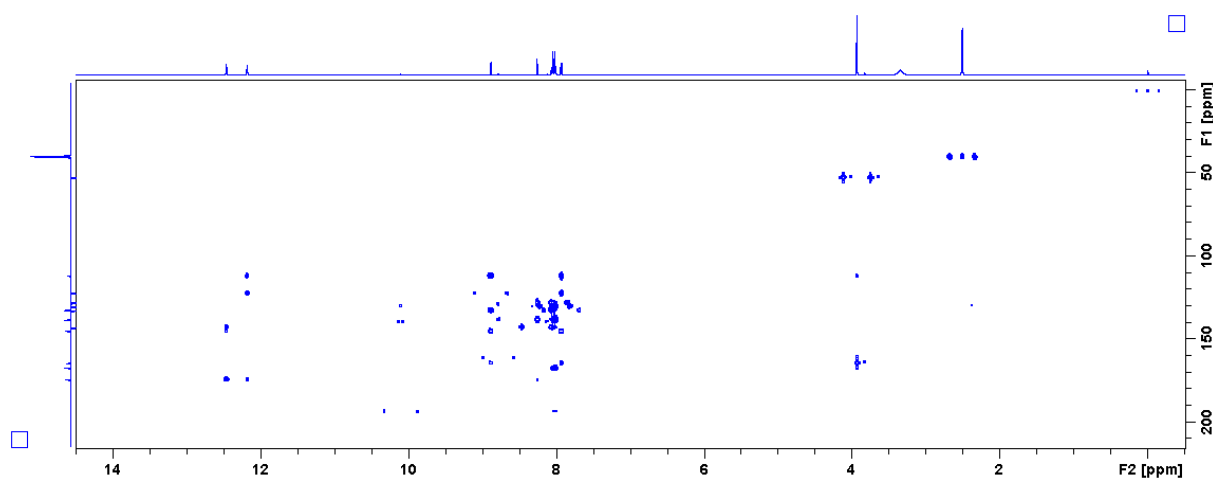
Slika 16. Spektar HMBC tiosemikarbazona **3b** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.Tablica 6. Asignacija kemijskih pomaka ¹H i ¹³C NMR tiosemikarbazona **3b**.

| Tiosemikarbazon 3b | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------|---------------------------------|------------------------------------|
| 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 | - | 167,35 | 9 | - | 174,26 |
| 1a | - ^a | - | 9a | 12,18 | |
| 2 | - | 132,43 | 10 | - | 145,41 |
| 3,7 | 8,06 | 130,22 | 11 | 7,93 | 132,68 |
| 4,6 | 8,01 | 128,03 | 12 | 8,88 | 122,29 |
| 5 | - | 138,26 | 13 | - | 111,80 |
| 8 | 8,26 | 141,89 | 14 | - | 164,35 |
| 8a | 12,46 | - | 15 | 3,93 | 52,61 |

^a - nije asignirano

4.2.3. Tiosemikarbazon **3c**

Struktura tiosemikarbazona **3c** (slika 17), pripadajući spektar HMBC (slika 18) te asignirani pomaci jezgara ¹H i ¹³C (tablica 7.) navedeni su u ovom potpoglavlju. Ostali spektri (¹H, DEPT-Q, COSY i HSQC) spoja **3c** nalaze se u dodatku (D13-D16).

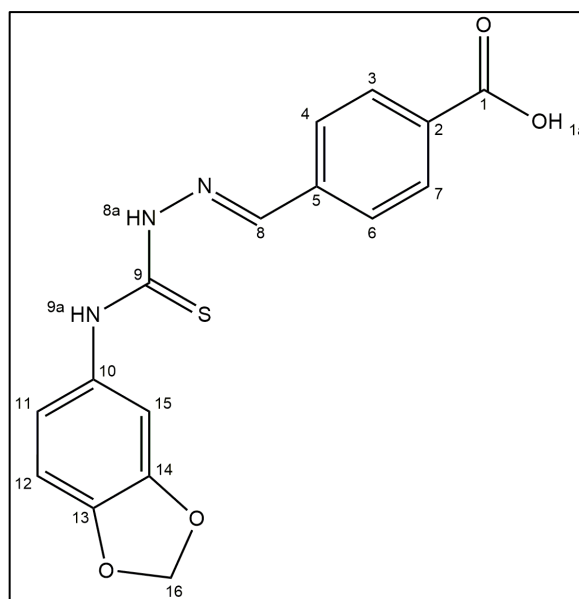
Slika 17. Struktura tiosemikarbazona **3c** uz označene lokante.Slika 18. Spektar HMBC tiosemikarbazona **3c** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR tiosemikarbazona **3c**.

| Tiosemikarbazon 3c | | | | | |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------|----------------------------|-------------------------------|
| Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm | Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm |
| 1 | - | 167,39 | 9a | 10,43 | - |
| 1a | - ^a | - | 10 | - | 143,61 |
| 2 | - | 132,22 | 11, 15 | 7,96 | 125,69 |
| 3, 7 | 7,99 | 130,01 | 12, 14 | 8,04 | 128,22 |
| 4, 6 | 7,74 | 128,05 | 13 | - | 131,86 |
| 5 | - | 138,39 | 16, 20 | 2,90 | 47,14 |
| 8 | 8,25 | 140,93 | 17, 19 | 1,56 | 25,18 |
| 8a | 12,20 | - | 18 | 1,37 | 23,41 |
| 9 | - | 176,30 | | | |

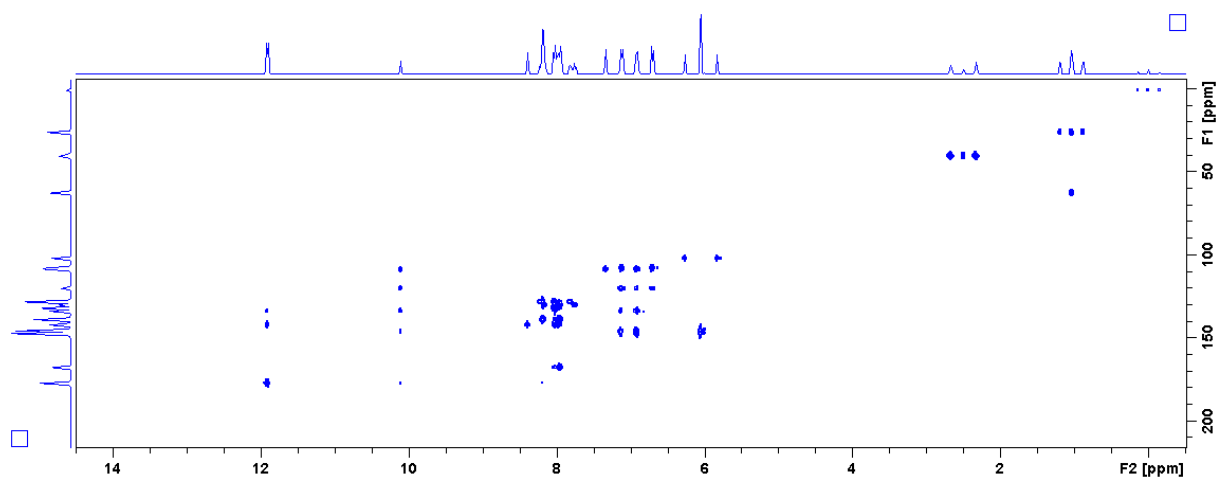
^a - nije asignirano

4.2.4. Tiosemikarbazon **3d**

Struktura tiosemitkarbazona **3d** prikazana je na slici 19., njegov spektar HMBC na slici 20., a tablica 8. prikazuje asignirane kemijske pomake jezgara ^1H i ^{13}C . Ostali spektri (^1H , DEPT-Q, COSY i HSQC) spoja **3d** nalaze se u poglavlju Dodatak (D17-D20).



Slika 19. Struktura tiosemitkarbazona **3d** uz označene lokante.



Slika 20. Spektar HMBC tiosemitkarbazona **3d** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

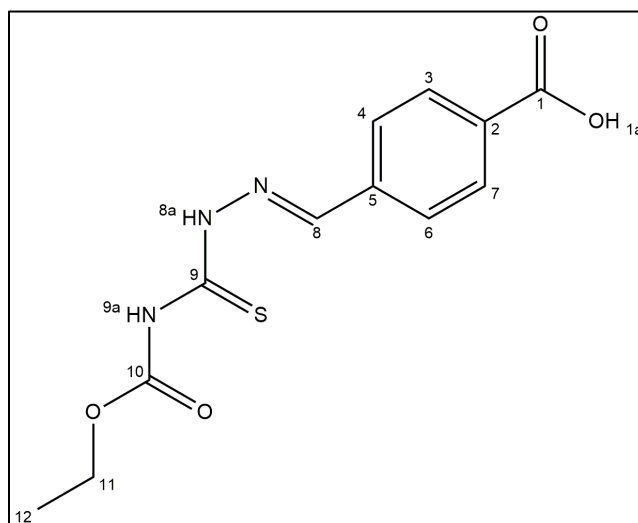
Tablica 8. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR tiosemitkarbazona **3d**.

| Tiosemikarbazon 3d | | | | | |
|--------------------|----------------------------|-------------------------------|------|----------------------------|-------------------------------|
| Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm | Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm |
| 1 | - | 167,43 | 9a | 10,11 | - |
| 1a | - ^a | - | 10 | - | 133,49 |
| 2 | - | 131,95 | 11 | 6,91 | 120,04 |
| 3, 7 | 7,96 | 129,97 | 12 | 6,91 | 107,85 |
| 4, 6 | 8,03 | 128,05 | 13 | - | 145,43 |
| 5 | - | 138,68 | 14 | - | 147,03 |
| 8 | 8,19 | 141,92 | 15 | 7,14 | 108,55 |
| 8a | 11,92 | - | 16 | 6,05 | 101,77 |
| 9 | - | 177,12 | | | |

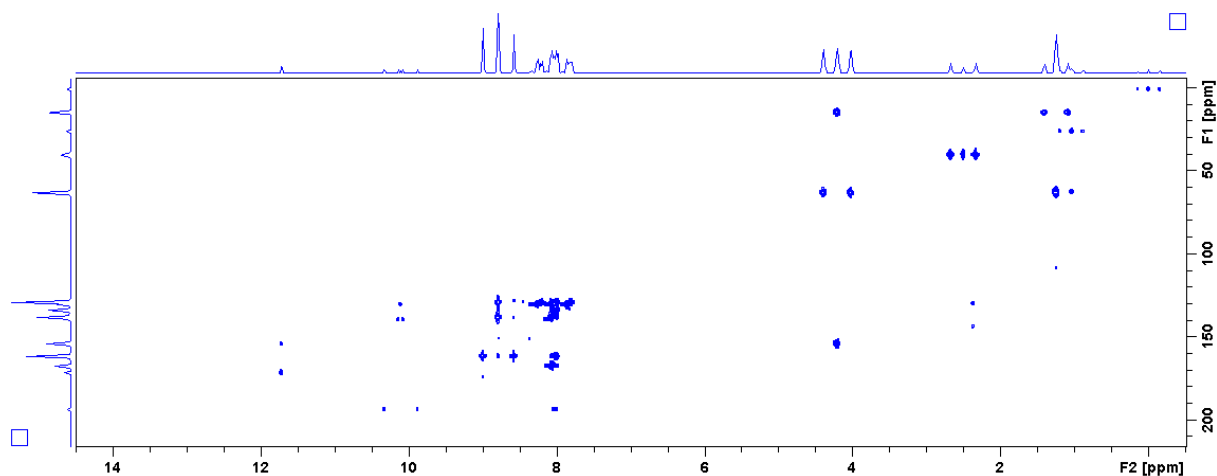
^a - nije asignirano

4.2.5. Tiosemikarbazon 3e

Kao i za prethodno opisane spojeve **3a-3d**, snimljeni su i asignirani (tablica 9.) ^1H , COSY, DEPT-Q, HSQC i HMBC (slika 22) spektri spoja **3e** (slika 21). Ostali spektri spoja **3e** nalaze se u Dodatku (D21-D24).



Slika 21. Struktura tiosemikarbazona **3e** uz označene lokante.

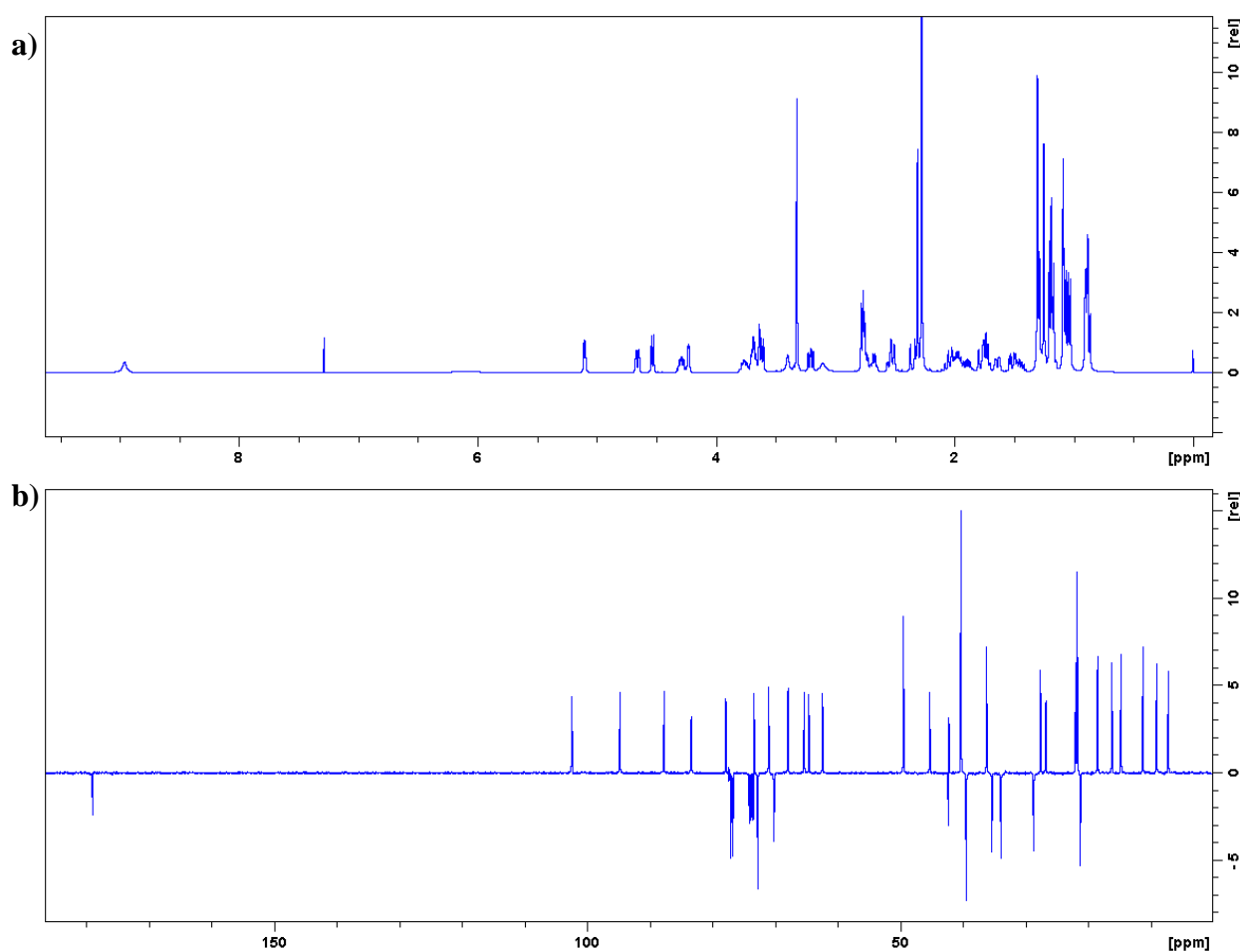
Slika 22. Spektar HMBC tiosemikarbazona **3e** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.Tablica 9. Asignacija kemijskih pomaka ¹H i ¹³C NMR tiosemikarbazona **3e**.

| Tiosemikarbazon 3e | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------|---------------------------------|------------------------------------|
| 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 | - | 167,28 | 8a | 11,72 | - |
| 1a | - ^a | - | 9 | - | 171,32 |
| 2 | - | 133,50 | 9a | 10,11 | - |
| 3, 7 | 8,07 | 130,27 | 10 | - | 153,94 |
| 4, 6 | 8,00 | 128,99 | 11 | 4,21 | 62,97 |
| 5 | - | 137,96 | 12 | 1,25 | 14,55 |
| 8 | 8,79 | 161,45 | | | |

^a - nije asignirano

4.3. 4''-aminopropilni derivat azitromicina

4''-aminopropilni derivat azitromicina (**P₅**) je kristalična tvar bijele boje. Prisutnost **P₅** (slika 8) u reakcijskoj smjesi potvrđena je spektrometrijom mase, a spektroskopijom NMR potvrđena je struktura spoja nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom. Na slici 23. prikazani su spektri NMR ^1H i ^{13}C , a na slici 24. spektar mase spoja **P₅**. Preostali spektri NMR (COSY, HSQC i HMBC) nalaze se u Dodatku (D25-D27).

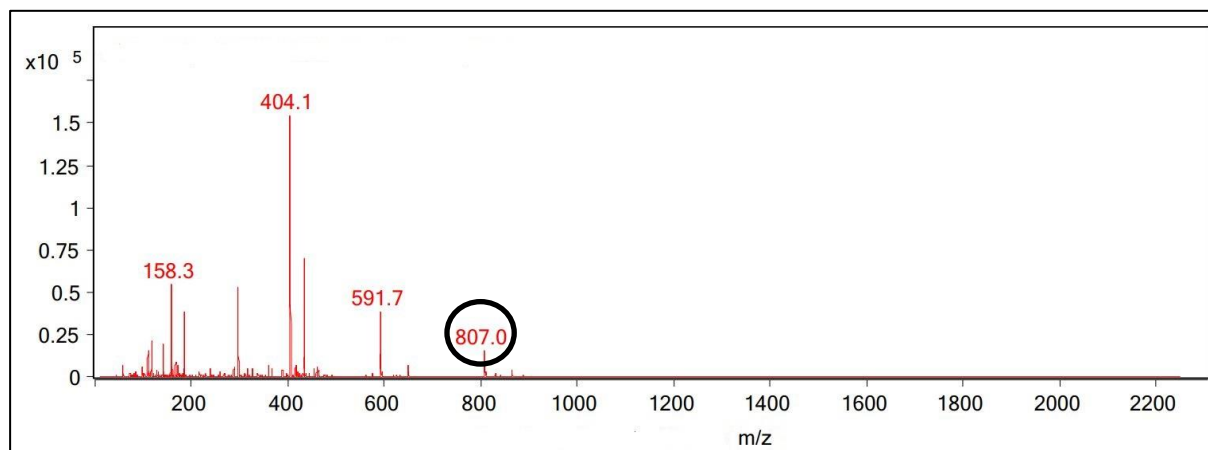


Slika 23. Spektri: a) ^1H NMR i b) DEPT-Q spoja **P₅** snimljeni u kloroformu-d pri 298 K.

Tablica 10. Assignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR 4"-aminopropilnog derivata azitromicina (**P5**).

| Prekursor P ₅ | | | | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 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 | - | 179,02 | 13 | 4,52 | 77,33 |
| 2 | 2,74 | 45,33 | 14 | 1,45; 1,88 | 21,29 |
| 2Me | 1,18 | 14,75 | 14Me | 0,86 | 11,25 |
| 3 | 4,22 | 77,86 | 1' | 4,52 | 102,48 |
| 4 | 2,02 | 42,24 | 2' | 3,20 | 71,03 |
| 4Me | 1,02 | 9,07 | 2'OH | - ^a | - |
| 5 | 3,61 | 83,40 | 3' | 2,50 | 65,34 |
| 6 | - | 73,51 | 3'NMe ₂ | 2,27 | 40,29 |
| 6Me | 1,30 | 27,62 | 4' | 1,16; 1,63 | 28,69 |
| 6OH | - ^a | - | 5' | 3,75 | 67,95 |
| 7 | 1,28; 1,79 | 42,29 | 5'Me | 1,24 | 21,77 |
| 8 | 1,96 | 26,77 | 1" | 5,10 | 94,75 |
| 8Me | 0,90 | 21,99 | 2" | 1,53; 2,35 | 35,39 |
| 9 | 2,06; 2,53 | 70,20 | 3" | - | 73,83 |
| 9aN | 2,30 | 36,23 | 3"Me | 1,25 | 21,77 |
| 10 | 2,67 | 62,40 | 3"OMe | 3,32 | 49,52 |
| 10Me | 1,05 | 7,20 | 4" | 2,76 | 87,71 |
| 11 | 3,63 | 73,34 | 4"a | 3,67 | 72,75 |
| 11OH | - ^a | - | 4"b | 1,73; 1,75 | 33,94 |
| 12 | - | 74,12 | 4"c | 2,76 | 39,46 |
| 12OH | - ^a | - | 5" | 4,29 | 64,60 |
| 12Me | 1,08 | 16,23 | 5"Me | 1,25 | 18,51 |

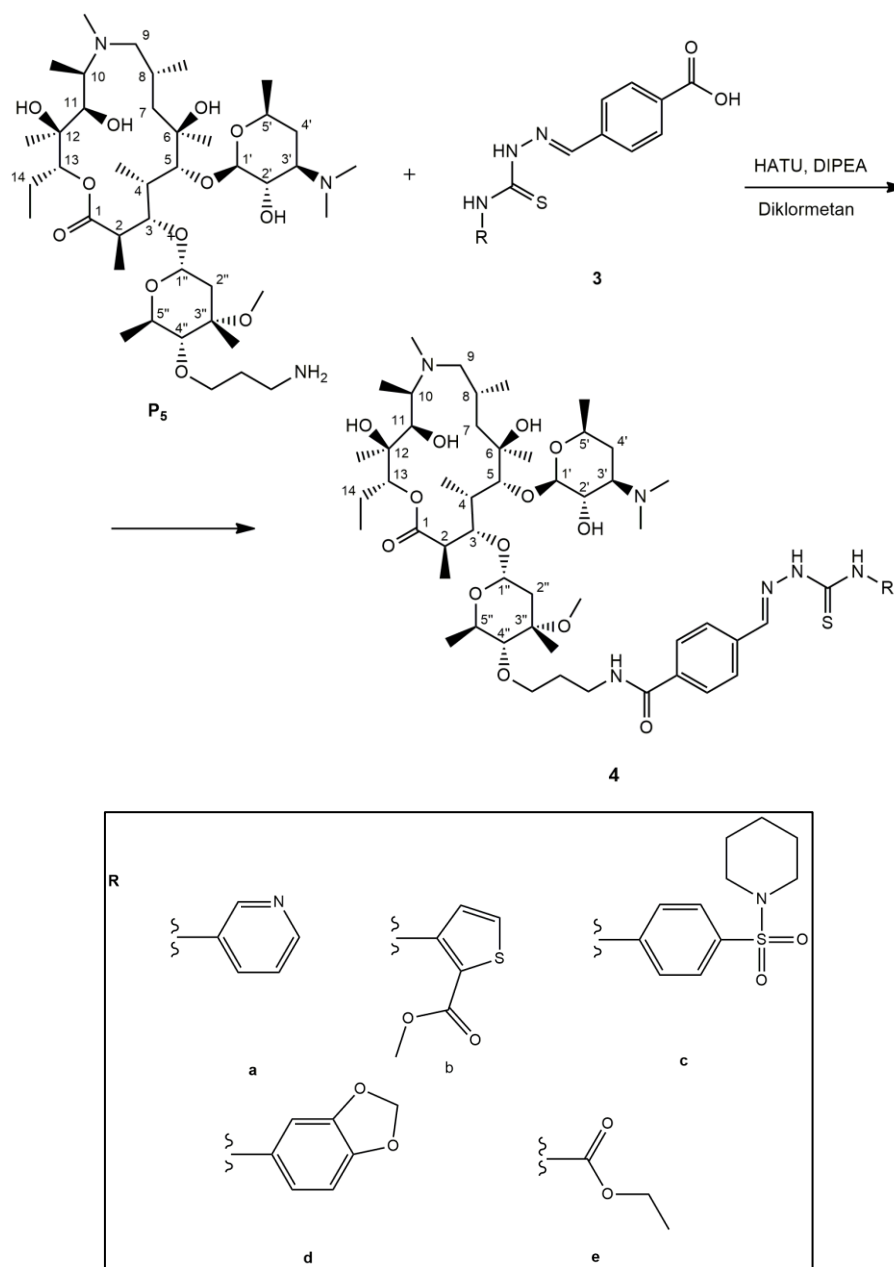
^a - nije asignirano



Slika 24. Spektar ESI-MS spoja **P5** snimljen u pozitivnom modu.

4.4. Makrozoni

Nakon pripreve tiosemikarbazida (**2a-2e**), tiosemikarbazona (**3a-3e**) i pročišćavanja 4"-aminopropilnog derivata azitromicina (**P₅**), uslijedila je sinteza makrozona (**4a-4e**) (slika 25). Količina korištenih reaktanata te mase dobivenih produkata trećeg sintetskog koraka prikazane su u tablici 11. Karakterizacija makrozona provedena je spektroskopijom NMR, spektrometrijom mase i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.



Slika 25. Shematski prikaz trećeg koraka sinteze makrozona (**4a-4e**) iz tiosemikarbazona (**3a-3e**) i 4"-aminopropilnog derivata azitromicina (**P₅**).

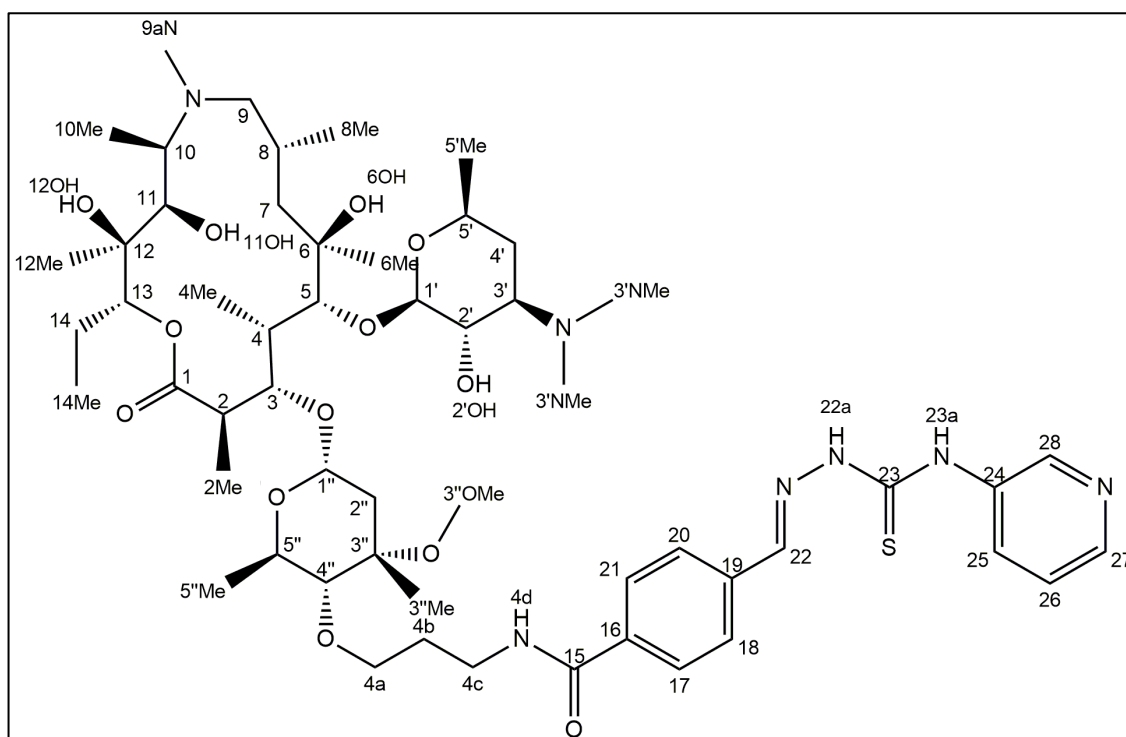
Tablica 11. Prikaz masa/volumena reaktanata u trećem koraku pripreve makrozona i masa dobivenih reakcijskih smjesa.

| Reaktanti | <i>m</i> / g | <i>V</i> / μ L | Produkti | | <i>m</i> / g |
|----------------------|--------------|--------------------|-----------|---|--------------|
| 3a | 0,022 | - | 4a | 3-piridil-makrozon | 0,142 |
| HATU | 0,031 | - | | | |
| DIPEA | - | 38,7 | | | |
| P₅ | 0,06 | - | | | |
| 3b | 0,027 | - | 4b | metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozon | 0,160 |
| HATU | 0,031 | - | | | |
| DIPEA | - | 38,7 | | | |
| P₅ | 0,06 | - | | | |
| 3c | 0,029 | - | 4c | 4-piperidil-sulfonilfenil-makrozon | 0,115 |
| HATU | 0,0272 | - | | | |
| DIPEA | - | 34 | | | |
| P₅ | 0,0524 | - | | | |
| 3d | 0,0255 | - | 4d | benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozon | 0,0928 |
| HATU | 0,031 | - | | | |
| DIPEA | - | 38,7 | | | |
| P₅ | 0,06 | - | | | |
| 3e | 0,026 | - | 4e | etoksikarbonil-makrozon | 0,241 |
| HATU | 0,0368 | - | | | |
| DIPEA | - | 46 | | | |
| P₅ | 0,071 | - | | | |

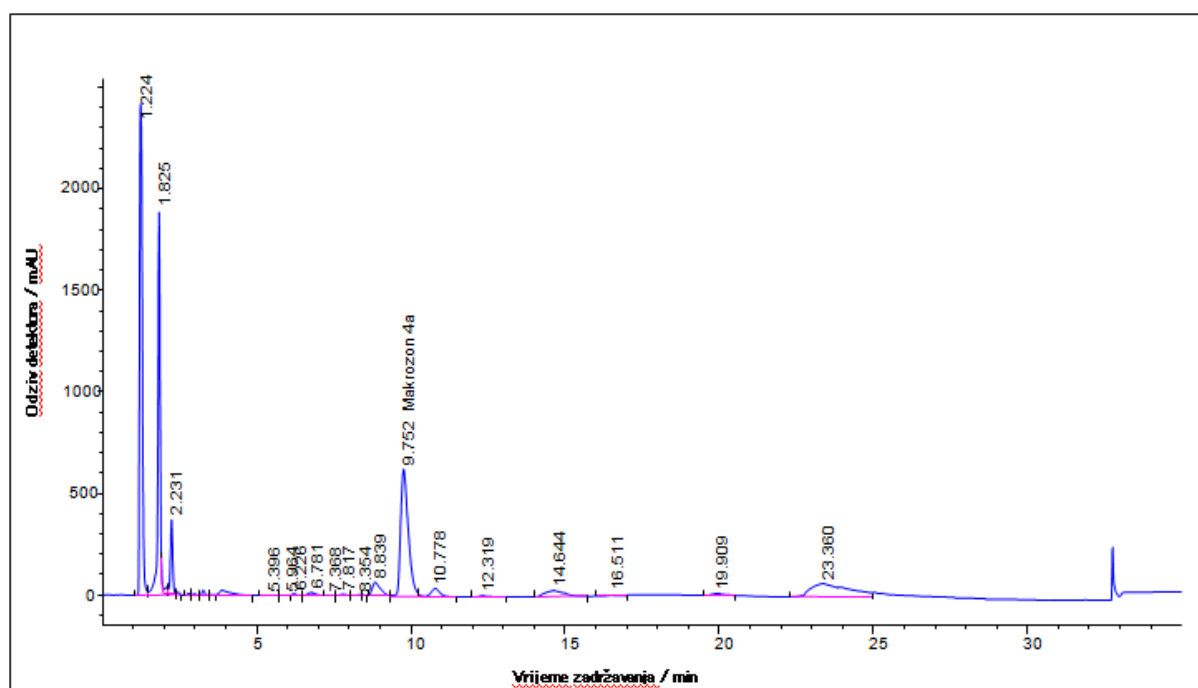
4.4.1. 3-Piridil-makrozon (**4a**)

Struktura spoja **4a** prikazana je na slici 26., a spektar mase na slici 29. Udio makrozona (25,3%) u reakcijskoj smjesi dobiven je metodom normalizacije pikova u kromatogramu (slika 27). Reakcijska smjesa pročišćena je semipreparativnom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti te je potom provjerena i čistoća spoja (slika 28). Nakon pročišćavanja, struktura

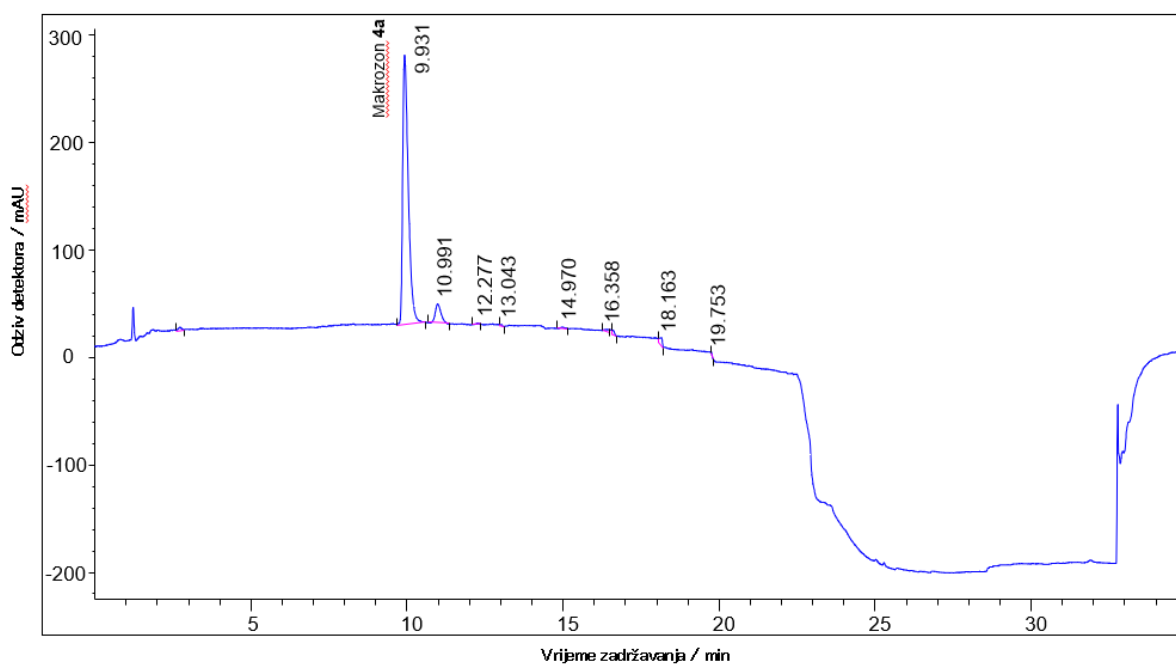
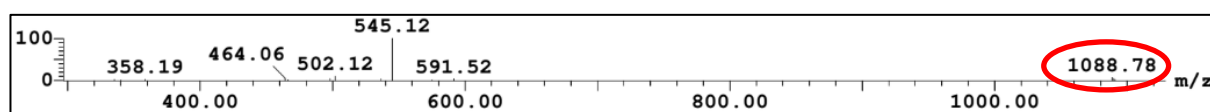
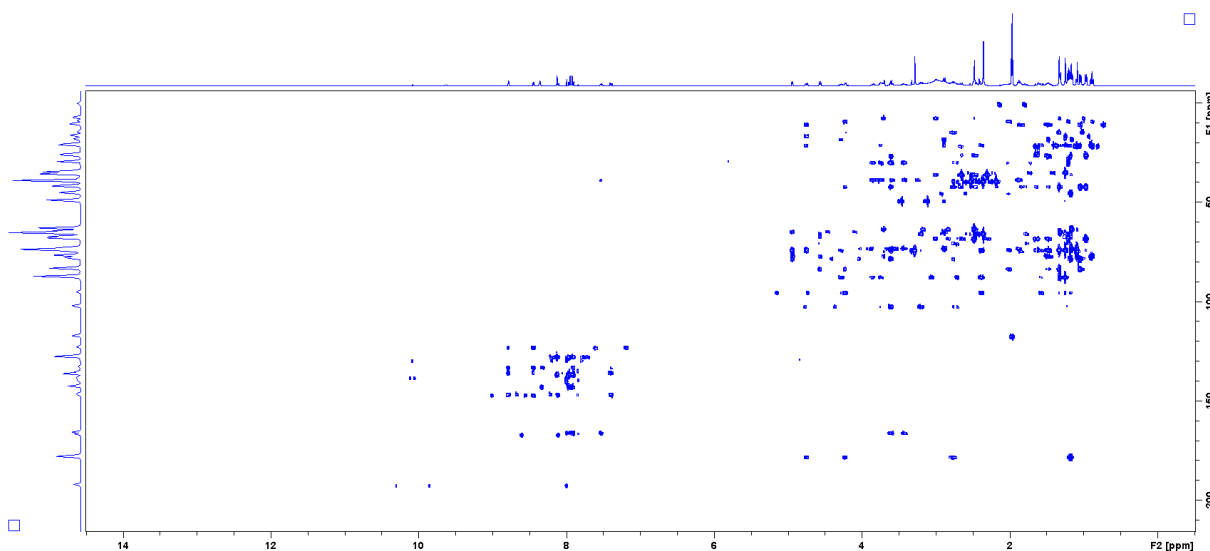
makrozona je potvrđena spektroskopijom NMR (slika 30). Preostali snimljeni spektri NMR nalaze se u Dodatku.



Slika 26. Struktura 3-piridil-makrozona, **4a**.



Slika 27. Kromatogram reakcijske smjese 3-piridil-makrozona **4a**.

Slika 28. Kromatogram pročišćenog makrozona **4a**.Slika 29. Spektar ESI-MS 3-piridil-makrozona **4a** snimljen u pozitivnom modu.Slika 30. Spektar HMBC 3-piridil-makrozona **4a** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

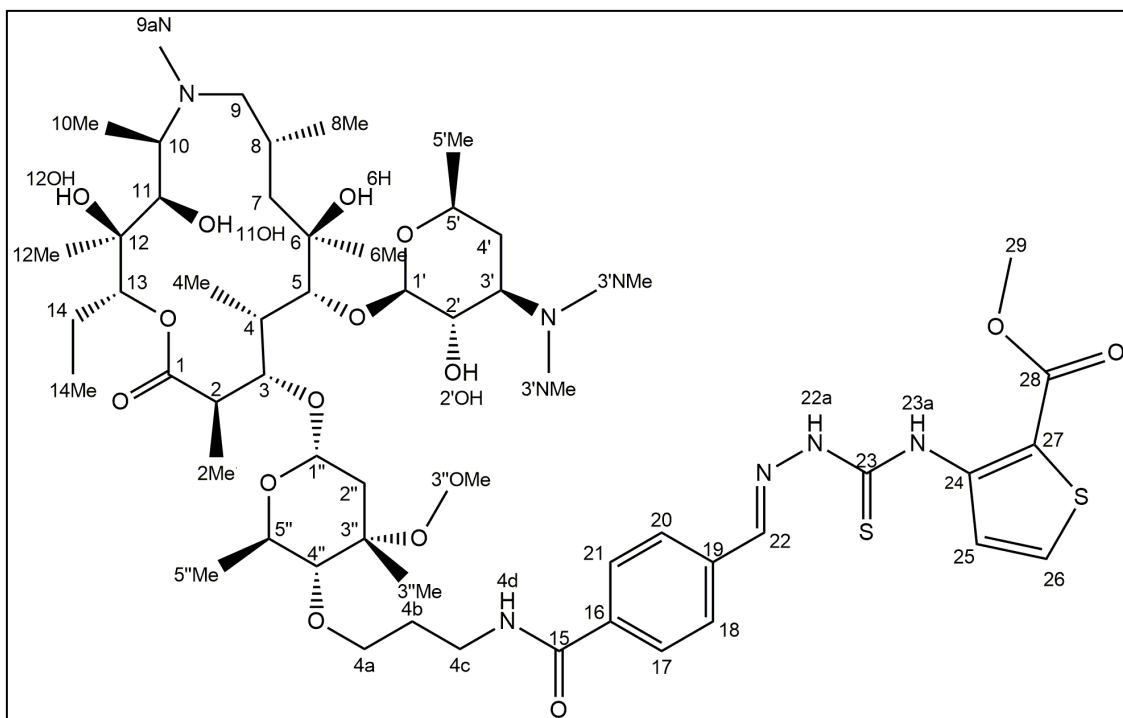
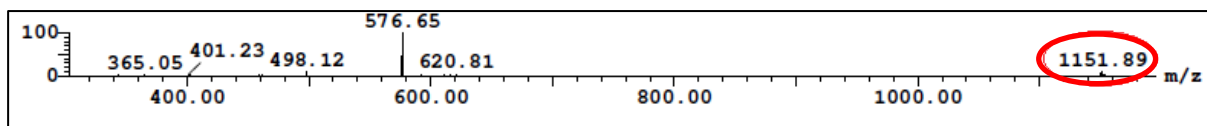
Tablica 12. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR 3-piridil-makrozonu **4a**.

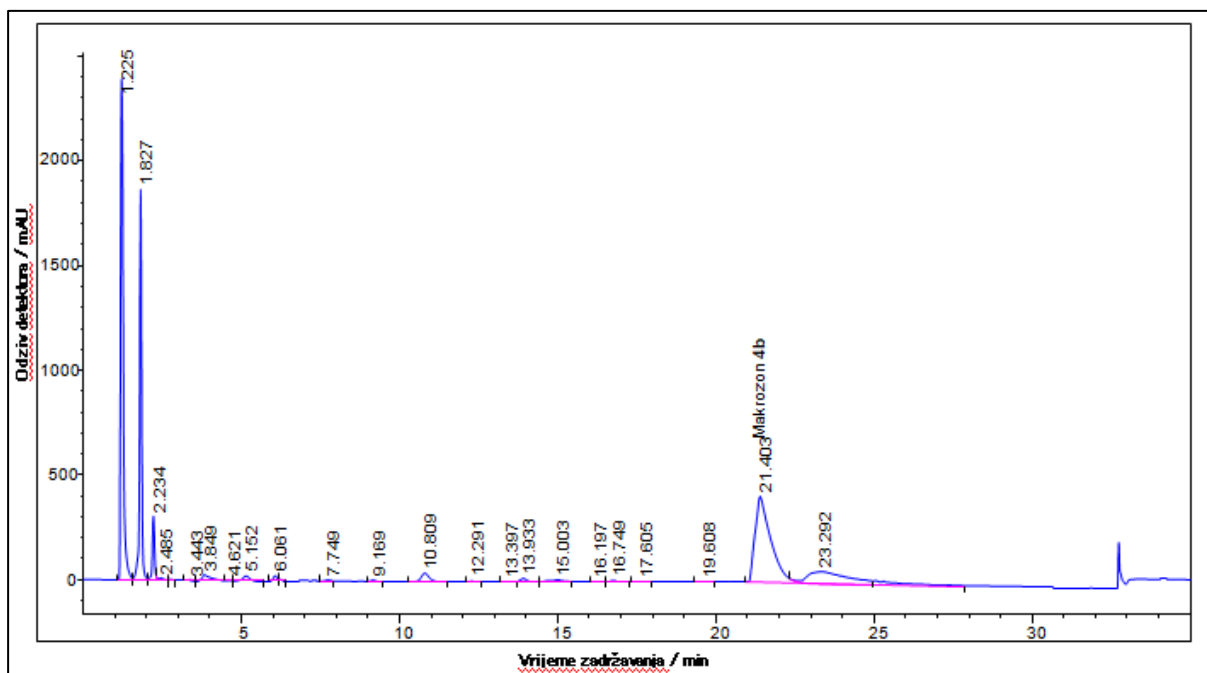
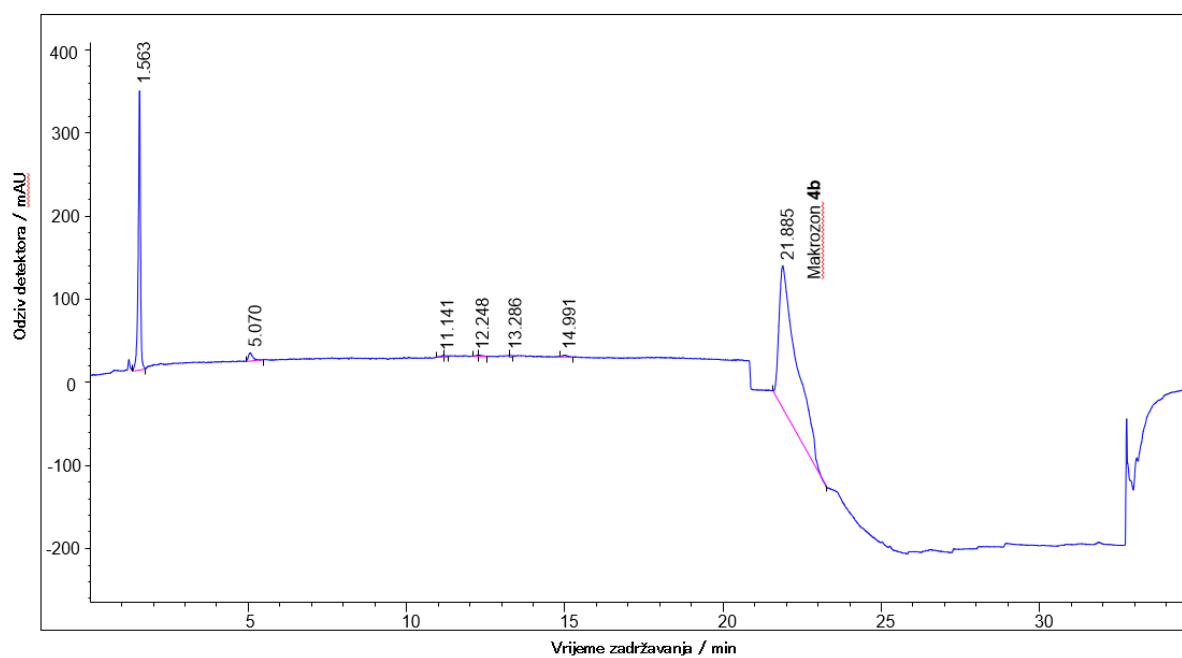
| Makrozon 4a | | | | | |
|-------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Atom | $\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$ | $\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$ | Atom | $\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$ | $\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$ |
| 1 | - | 178,04 | 22 | 8,12 | 142,61 |
| 2 | 2,77 | 45,26 | 22a | - ^a | - |
| 2Me | 1,17 | 14,45 | 23 | - | 165,82 |
| 3 | 4,22 | 78,07 | 23a | - ^a | - |
| 4 | 2,01 | 41,93 | 24 | - | 135,4 |
| 4Me | 1,04 | 8,97 | 25 | 8,11 | 132,86 |
| 5 | 3,60 | 83,25 | 26 | 7,39 | 123,02 |
| 6 | - | 73,72 | 27 | 8,44 | 146,48 |
| 6Me | 1,32 | 26,36 | 28 | 8,78 | 146,97 |
| 6OH | - ^a | - | 1' | 4,56 | 102,14 |
| 7 | 1,47; 1,63 | 41,87 | 2' | 3,20 | 70,45 |
| 8 | 2,06 | 26,12 | 2'OH | - ^a | - |
| 8Me | 0,96 | 21,48 | 3' | 2,77 | 65,48 |
| 9 | 2,47; 2,66 | 68,03 | 3'NMe ₂ | 2,35 | 39,12 |
| 9aN | 2,47 | 35,82 | 4' | 1,21; 1,78 | 29,6 |
| 10 | 2,99 | 63,18 | 5' | 3,75 | 67,39 |
| 10Me | 1,16 | 7,38 | 5'Me | 1,21 | 21,08 |
| 11 | 3,69 | 73,13 | 1'' | 4,94 | 95,16 |
| 11OH | - ^a | - | 2'' | 1,57; 2,38 | 34,94 |
| 12 | - | 73,1 | 3'' | - | 73,88 |
| 12OH | - ^a | - | 3''Me | 1,24 | 20,93 |
| 12Me | 1,09 | 16,35 | 3''OMe | 3,30 | 49,04 |
| 13 | 4,75 | 76,79 | 4'' | 2,88 | 87,25 |
| 14 | 1,47; 1,84 | 21,18 | 4''a | 3,74; 3,85 | 72,92 |
| 14Me | 0,88 | 10,66 | 4''b | 1,87 | 29,75 |
| 15 | - | 166,64 | 4''c | 3,43; 3,60 | 38,34 |
| 16 | - | 136,1 | 4''d | - ^a | - |
| 17, 21 | 7,91 | 127,47 | 5'' | 4,28 | 64,5 |
| 18, 20 | 7,96 | 127,72 | 5''Me | 1,32 | 18,14 |
| 19 | - | 136,3 | | | |

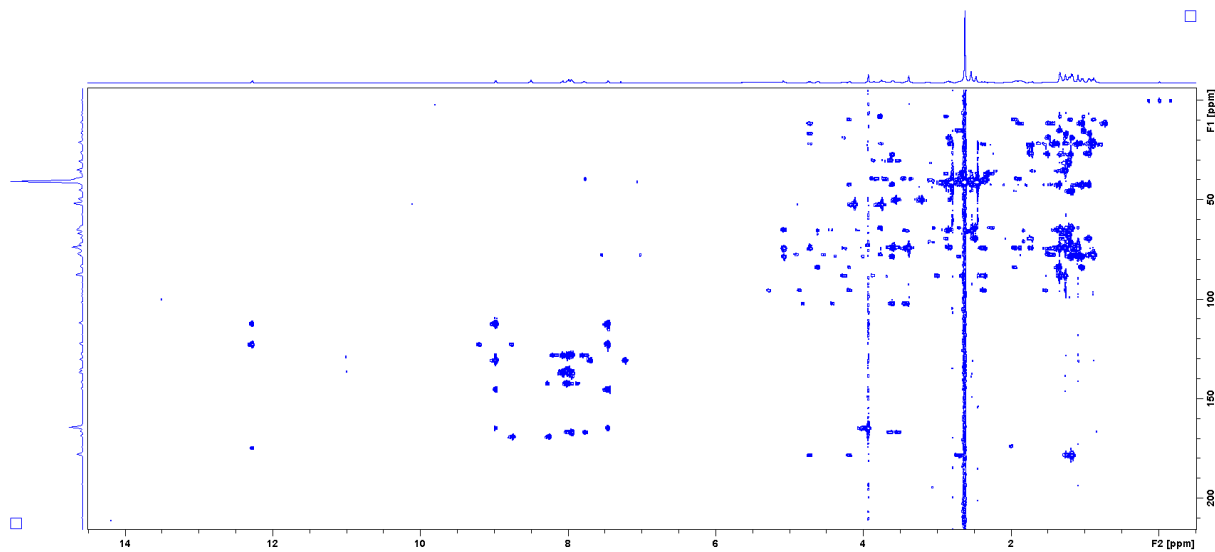
^a - nije asignirano

4.4.2. Metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozon (**4b**)

Struktura makrozonu **4b** prikazana je na slici 31., a pripadajući spektar masa na slici 32. Udio makrozonu **4b** (33,4%) u reakcijskoj smjesi određen je metodom normalizacije pikova u kromatogramu (slika 33). Reakcijska smjesa je pročišćena pomoću semipreparativne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (79% udio čistog spoja, slika 34). Nakon pročišćavanja, struktura spoja je potvrđena spektroskopijom NMR. Na slici 35. prikazan je HMBC spektar makrozonu **4b**, a preostali snimljeni spektri NMR nalaze se u Dodatku (D31-D33).

Slika 31. Struktura metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozona, **4b**.Slika 32. Spektar ESI-MS spoja **4b** snimljen u pozitivnom modu.

Slika 33. Kromatogram reakcijske smjese metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozona, **4b**.Slika 34. Kromatogram pročišćenog makrozona **4b**.



Slika 35. Spektar HMBC metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozona **4b** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

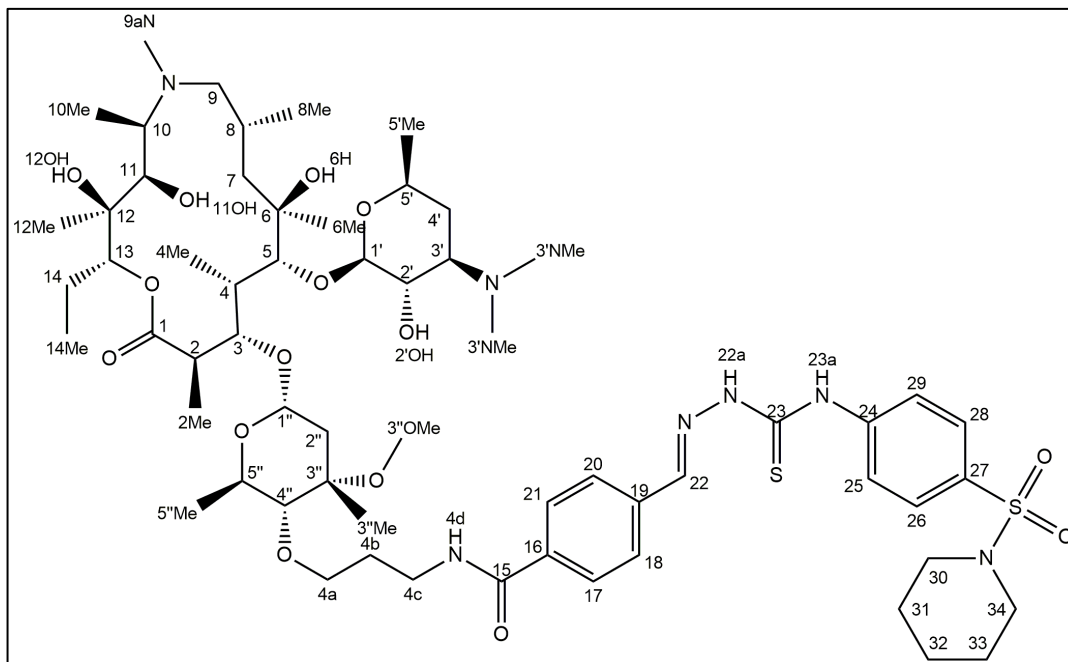
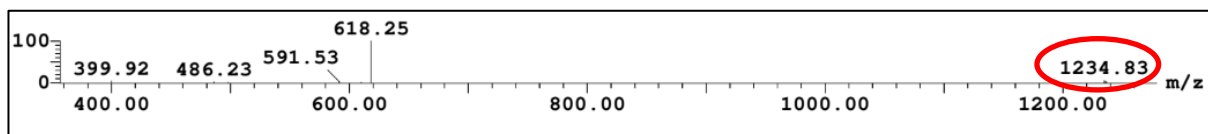
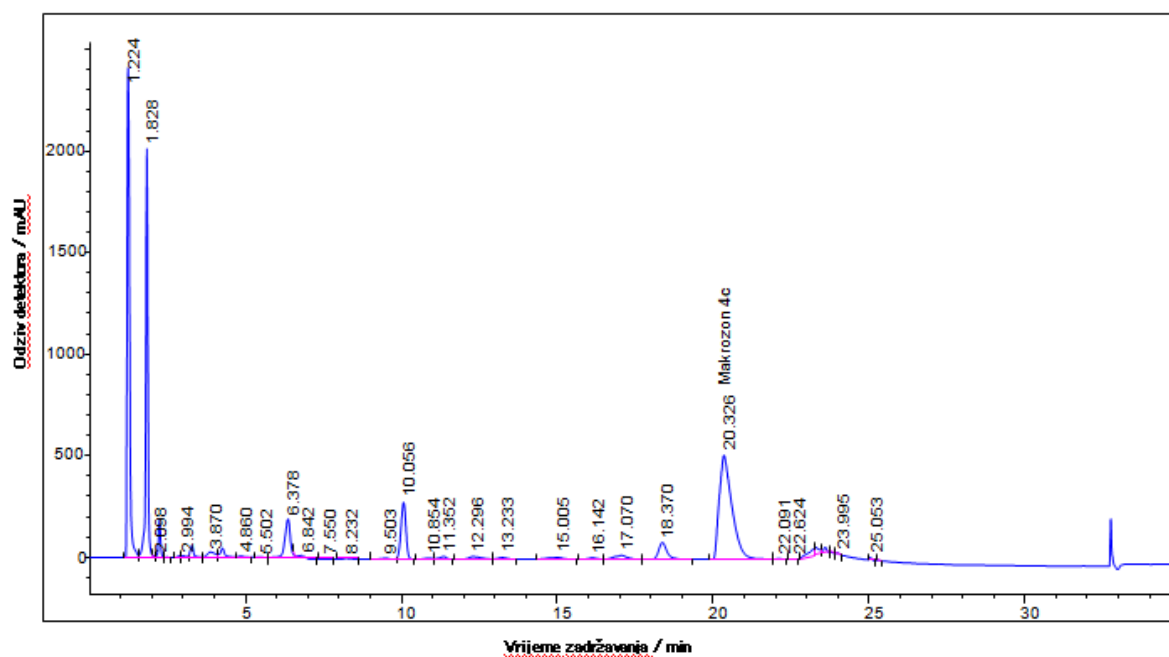
Tablica 13. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR metiltiofen-2-karboksilat-3-il-makrozon **4b**.

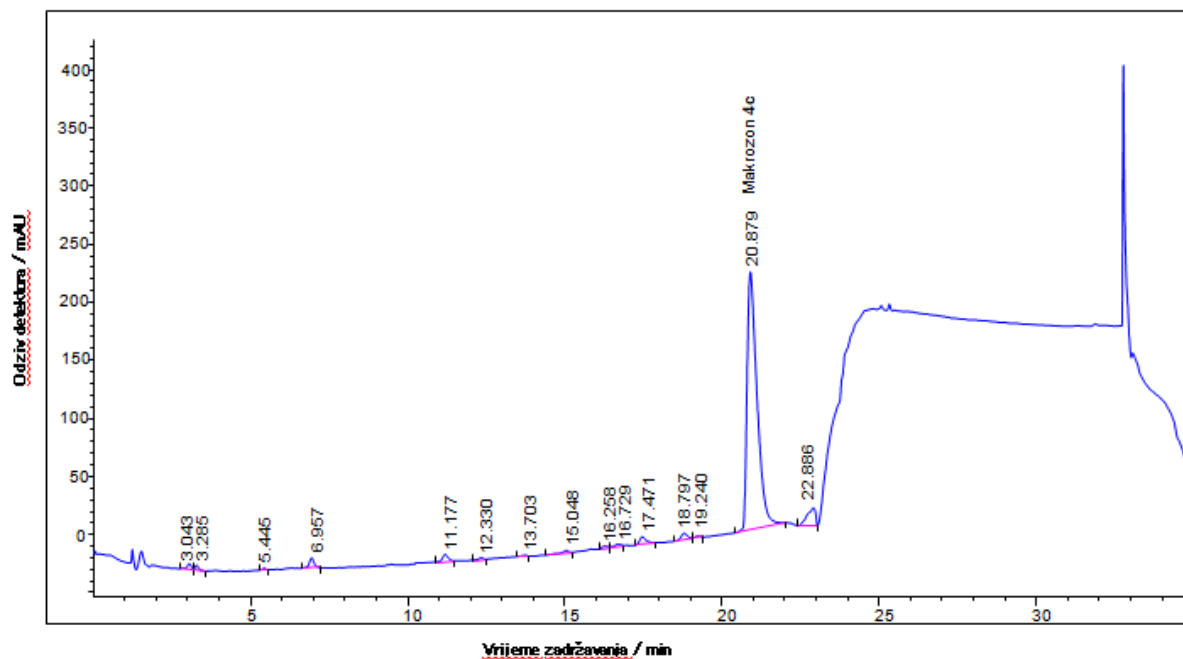
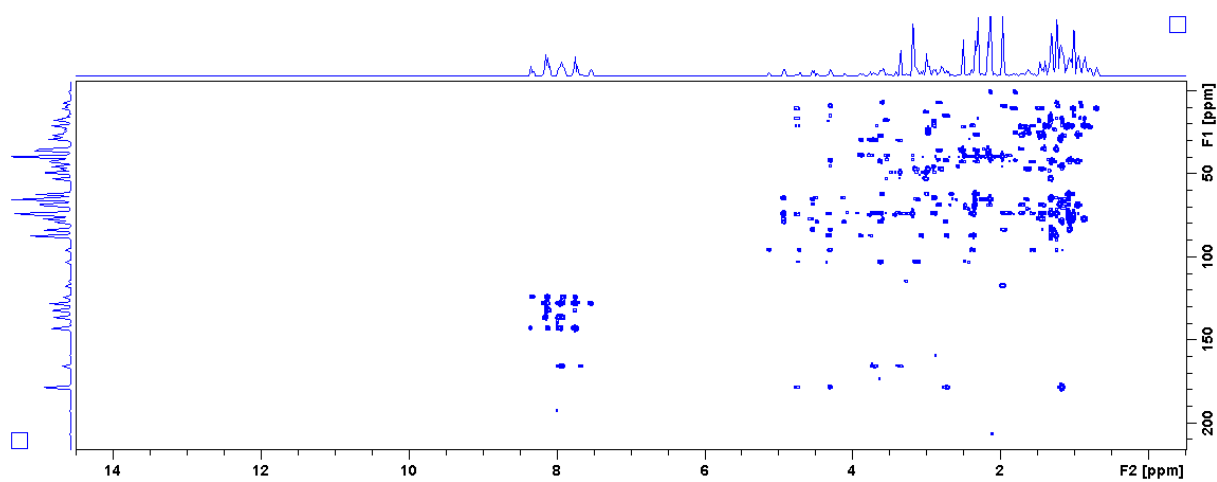
| Makrozon 4b | | | | | |
|-------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Atom | $\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$ | $\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$ | Atom | $\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$ | $\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$ |
| 1 | - | 178,1 | 22 | 8,06 | 141,8 |
| 2 | 2,70 | 45,28 | 22a | - ^a | - |
| 2Me | 1,17 | 14,9 | 23 | - | 174,2 |
| 3 | 4,19 | 78,3 | 23a | 12,29 | - |
| 4 | 1,95 | 42,25 | 24 | - | 145,1 |
| 4Me | 1,04 | 9,3 | 25 | 7,45 | 112,1 |
| 5 | 3,59 | 83,5 | 26 | 8,97 | 122,3 |
| 6 | - | 73,7 | 27 | - | 136,9 |
| 6Me | 1,34 | 26,68 | 28 | - | 164,4 |
| 6OH | - ^a | - | 29 | 3,93 | 51,83 |
| 7 | 1,30; 1,72 | 42,17 | 1' | 4,61 | 101,7 |
| 8 | 2,05 | 26,28 | 2' | 3,42 | 70,5 |
| 8Me | 0,94 | 21,79 | 2'OH | - ^a | - |
| 9 | 2,26; 2,65 | 69,2 | 3' | 3,12 | 64,8 |
| 9aN | 2,48 | 36,52 | 3'NMe ₂ | 2,62 | 40,8 |
| 10 | 2,87 | 63,5 | 4' | 1,26; 1,84 | 30,86 |
| 10Me | 1,17 | 7,83 | 5' | 3,77 | 67,0 |
| 11 | 3,75 | 72,4 | 5'Me | 1,23 | 21,5 |
| 11OH | - ^a | - | 1'' | 5,09 | 95,3 |
| 12 | - | 74,0 | 2'' | 1,53; 2,36 | 35,24 |
| 12OH | - ^a | - | 3'' | - | 73,8 |
| 12Me | 1,09 | 16,44 | 3''Me | 1,26 | 30,9 |
| 13 | 4,72 | 77,27 | 3''OMe | 3,38 | 49,7 |
| 14 | 1,84; 1,46 | 21,24 | 4'' | 2,83 | 88,0 |
| 14Me | 0,88 | 11,24 | 4''a | 3,71; 3,85 | 73,4 |
| 15 | - | 166,9 | 4''b | 1,91 | 29,91 |
| 16 | - | 135,7 | 4''c | 3,61; 3,53 | 39,01 |
| 17, 21 | 7,955 | 127,71 | 4''d | 7,76 | - |
| 18, 20 | 7,997 | 127,88 | 5'' | 4,26 | 64,6 |
| 19 | - | 136,8 | 5''Me | 1,33 | 18,45 |

^a - nije asignirano

4.4.3. 4-Piperidil-sulfonilfenil-makrozon (**4c**)

Na slici 36. prikazana je struktura makrozon **4c**, a na slici 37. spektar masa kojim je potvrđena uspješnost sinteze navedenog spoja. Reakcijska smjesa (28,7%) pročišćena je tehnikom LC-SPE te je čistoća spoja **4c** (85%) potvrđena pomoću tehnike HPLC. Kromatogrami reakcijske smjese i pročišćenog makrozon **4c** prikazani se na slikama 38. i 39. Na slici 40. nalazi se spektar HMBC makrozon **4c**. Ostali spektri NMR nalaze se u poglavlju Dodatak (D34-D36).

Slika 36. Struktura 4-piperidil-sulfonilfenil-makrozona, **4c**.Slika 37. Spektar ESI-MS spoja **4c** snimljen u pozitivnom modu.Slika 38. Kromatogram reakcijske smjese 4-piperidil-sulfonilfenil-makrozona, **4c**.

Slika 39. Kromatogram pročišćenog 4-piperidil-sulfonilfenil-makrozona, **4c**.Slika 40. Spektar HMBC 4-piperidil-sulfonilfenil-makrozona **4c** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

Tablica 14. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR 4-piperidil-sulfonilfenil-makrozona**4c.**

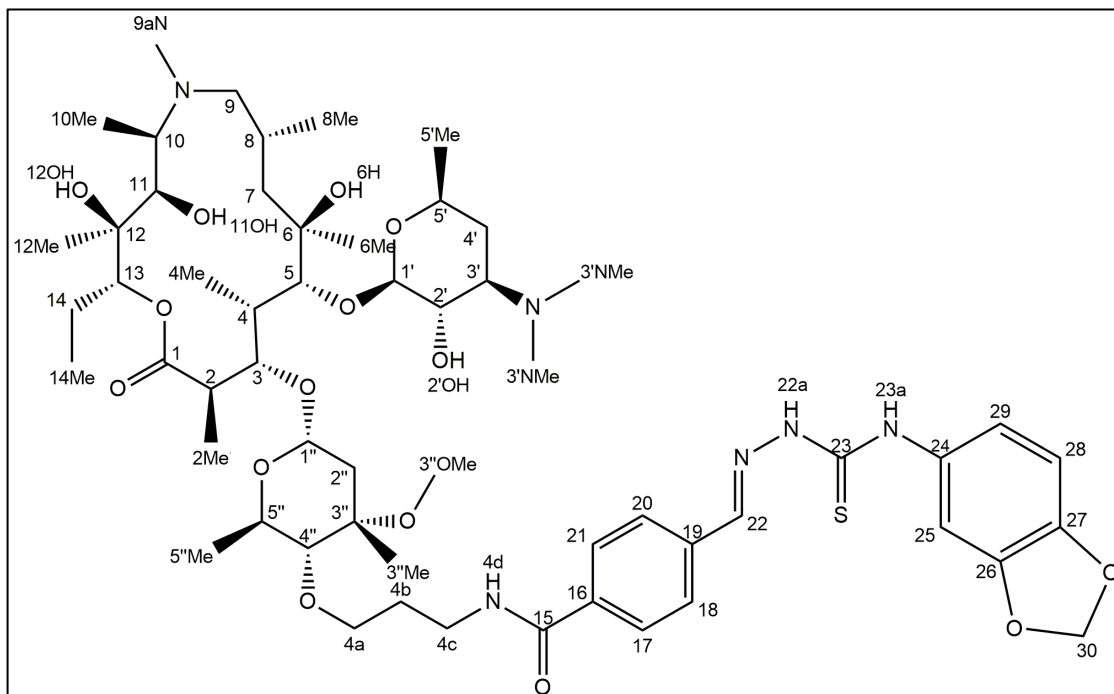
| Makrozon 4c | | | | | |
|-------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm | Atom | $\delta(^1\text{H})$ / ppm | $\delta(^{13}\text{C})$ / ppm |
| 1 | - | 178,32 | 22a | - ^a | - |
| 2 | 2,74 | 45,35 | 23 | - | - |
| 2Me | 1,16 | 14,85 | 23a | - ^a | - |
| 3 | 4,30 | 78,75 | 24 | - | 142,7 |
| 4 | 1,95 | 41,82 | 25, 29 | 7,93 | 127,53 |
| 4Me | 1,06 | 9,09 | 26, 28 | 8,12 | 123,92 |
| 5 | 3,62 | 83,54 | 27 | - | 132,03 |
| 6 | - | 73,81 | 30, 34 | 3,00 | 47,01 |
| 6Me | 1,31 | 27,22 | 31, 33 | 1,63 | 25,06 |
| 6OH | - ^a | - | 32 | 1,44 | 23,23 |
| 7 | 1,49; 1,71 | 42,67 | 1' | 4,55 | 102,81 |
| 8 | 2,01 | 26,3 | 2' | 3,13 | 70,83 |
| 8Me | 0,95 | 21,53 | 2'OH | - ^a | - |
| 9 | 2,33; 2,52 | 68,63 | 3' | 2,46 | 65,34 |
| 9aN | 2,34 | 35,76 | 3'NMe ₂ | 2,14 | 39,53 |
| 10 | 2,83 | 62,06 | 4' | 1,13; 1,64 | 28,96 |
| 10Me | 1,07 | 7,05 | 5' | 3,67 | 68,08 |
| 11 | 3,59 | 73,66 | 5'Me | 1,24 | 21,02 |
| 11OH | - ^a | - | 1'' | 4,93 | 95,66 |
| 12 | - | 74,49 | 2'' | 1,57; 2,34 | 35,02 |
| 12OH | - ^a | - | 3'' | - | 74,3 |
| 12Me | 1,02 | 16,17 | 3''Me | 1,2 | 21,12 |
| 13 | 4,75 | 77,01 | 3''OMe | 3,19 | 49,05 |
| 14 | 1,46; 1,82 | 20,99 | 4'' | 2,9 | 87,15 |
| 14Me | 0,87 | 10,54 | 4''a | 3,76; 3,89 | 73,5 |
| 15 | - | 165,75 | 4''b | 1,88 | 29,62 |
| 16 | - | 136,3 | 4''c | 3,36; 3,71 | 38,79 |
| 17, 21 | 7,92 | 127,59 | 4''d | 7,67 | - |
| 18, 20 | 7,75 | 127,91 | 5'' | 4,32 | 64,41 |
| 19 | - | 136,03 | 5''Me | 1,31 | 17,96 |
| 22 | 8,14 | 142,95 | | | |

^a - nije asignirano

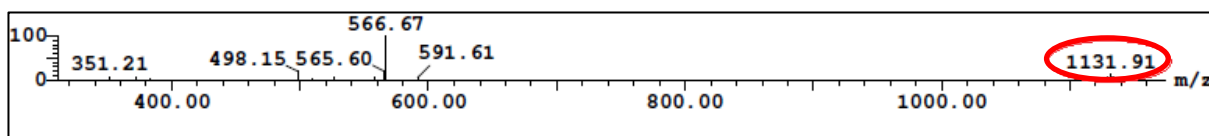
4.4.4. Benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozon (**4d**)

Struktura spoja **4d** prikazana je na slici 41. Prisutnost spoja **4d** u reakcijskoj smjesi potvrđena je spektrometrijom mase (slika 42). Reakcijska smjesa pročišćena je tehnikom LC-SPE. Snimljen je kromatogram reakcijske smjese (slika 43) i kromatogram pročišćenog spoja **4d** (slika 44). Metodom normalizacije pikova određen je udio makrozona u reakcijskoj smjesi (39,2%) i čistoća spoja (88%). Spektar HMBC spoja **4d** nalazi se na slici 45., a asignirani

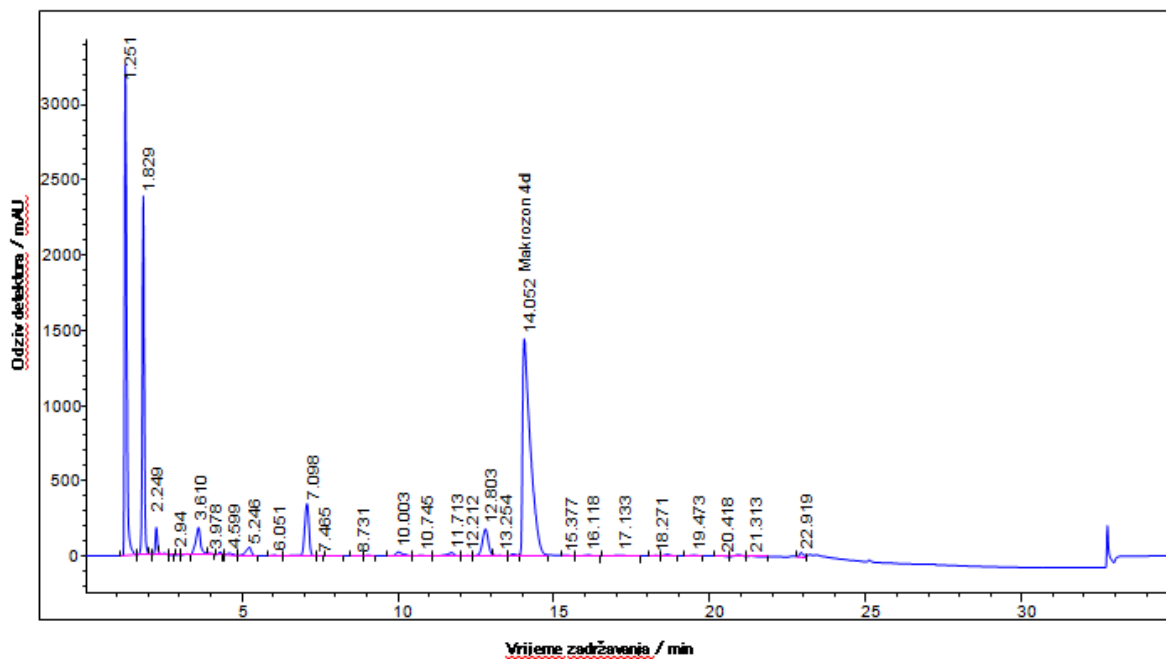
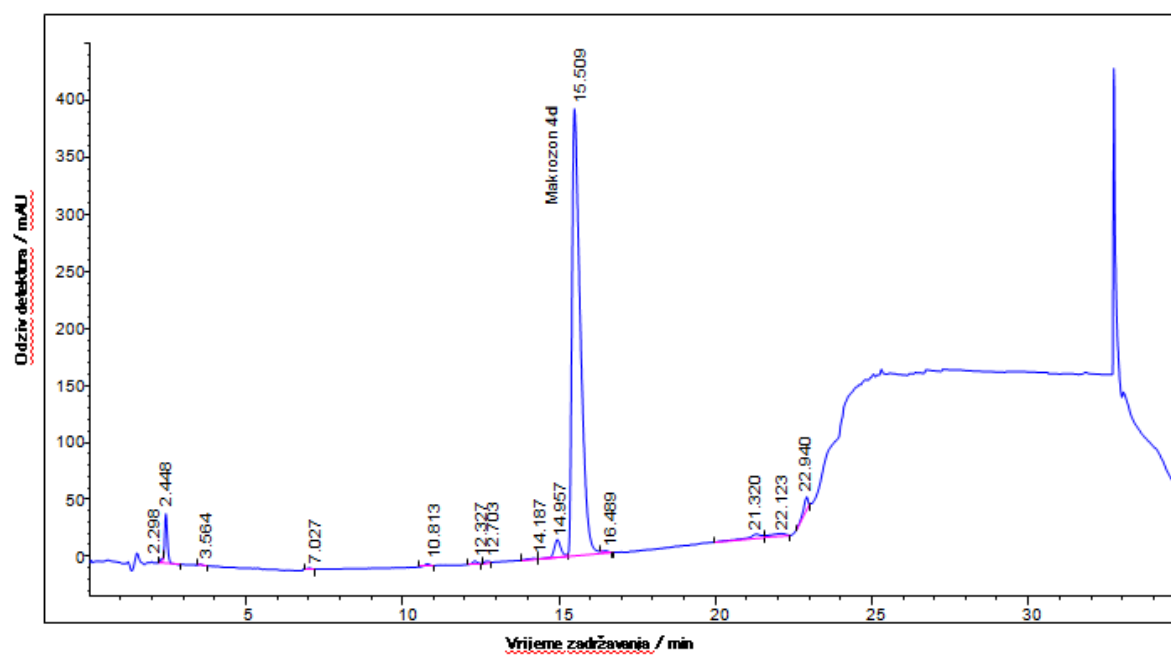
pomaci jezgara ^1H i ^{13}C u tablici 15. Preostali spektri NMR nalaze se u poglavlju Dodatak (D37-D39).

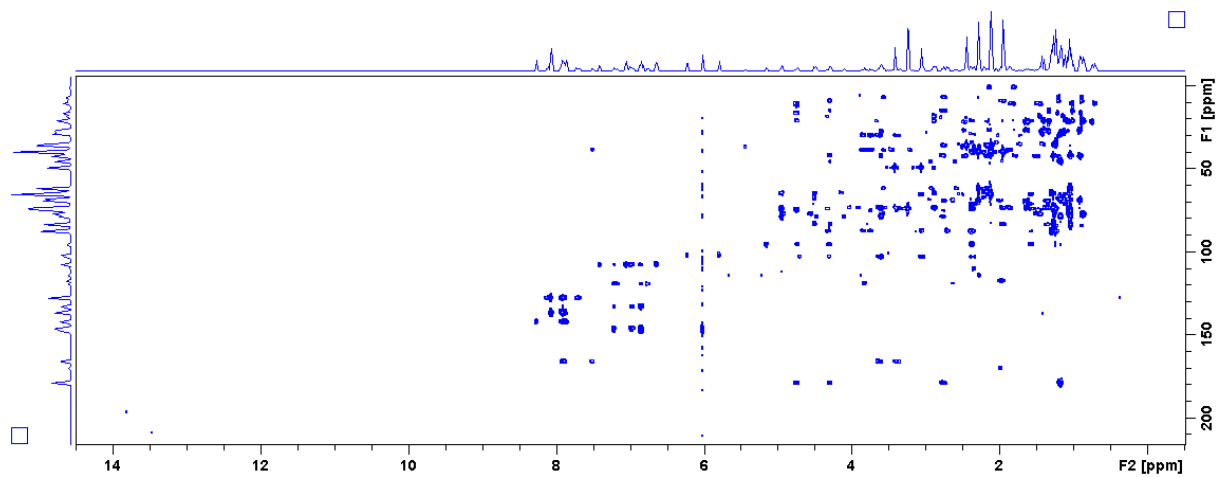


Slika 41. Struktura benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozona, **4d**.



Slika 42. Spektar ESI-MS makrozona **4d** snimljen u pozitivnom modu.

Slika 43. Kromatogram reakcijske smjese benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozona **4d**.Slika 44. Kromatogram pročišćenog benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozona **4d**.



Slika 45. Spektar HMBC benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-makrozona snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

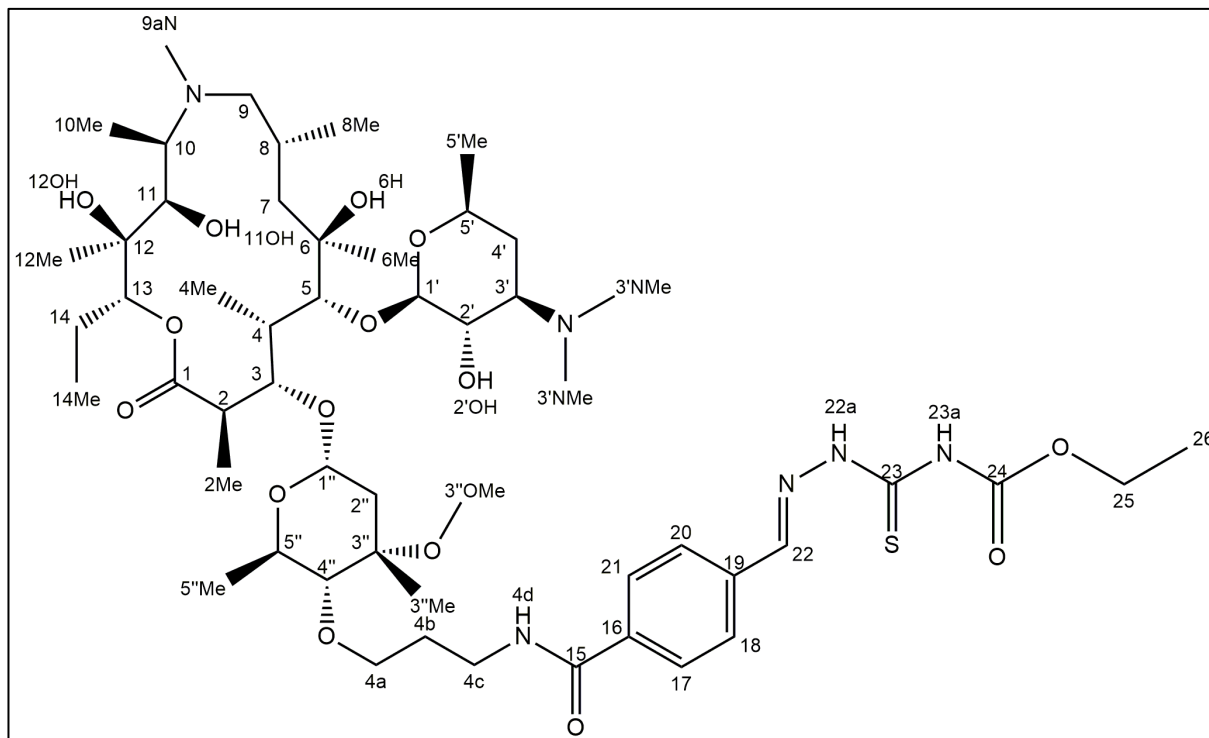
Tablica 15. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR benzo-3,4-(1,3-dioxolil)-makrozon 4d.

| Makrozon 4d | | | | | |
|-------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 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 | - | 178,71 | 22a | - ^a | - |
| 2 | 2,76 | 45,36 | 23 | - | - |
| 2Me | 1,17 | 14,71 | 23a | - ^a | - ^a |
| 3 | 4,30 | 78,47 | 24 | - | 132,82 |
| 4 | 1,96 | 41,84 | 25 | 7,22 | 107,59 |
| 4Me | 1,04 | 8,96 | 26 | - | 145,97 |
| 5 | 3,61 | 83,18 | 27 | - | 146,99 |
| 6 | - | 73,41 | 28 | 6,85 | 107,46 |
| 6Me | 1,28 | 27,42 | 29 | 6,98 | 119,22 |
| 6OH | - ^a | - | 30 | 6,02 | 101,73 |
| 7 | 1,36; 1,63 | 42,47 | 1' | 4,51 | 102,76 |
| 8 | 1,97 | 26,42 | 2' | 3,06 | 71,01 |
| 8Me | 0,91 | 21,55 | 2'OH | - ^a | - |
| 9 | 2,16; 2,47 | 69,08 | 3' | 2,36 | 65,22 |
| 9aN | 2,29 | 35,6 | 3'NMe ₂ | 2,12 | 39,60 |
| 10 | 2,76 | 61,80 | 4' | 1,08; 1,58 | 28,79 |
| 10Me | 1,05 | 6,81 | 5' | 3,66 | 68,06 |
| 11 | 3,57 | 74,96 | 5'Me | 1,24 | 20,99 |
| 11OH | - ^a | - | 1'' | 4,95 | 95,40 |
| 12 | - | 74,3 | 2'' | 1,57; 2,38 | 35,07 |
| 12OH | - ^a | - | 3'' | - | 73,89 |
| 12Me | 1,06 | 16,44 | 3''Me | 1,17 | 21,28 |
| 13 | 4,75 | 77,05 | 3''OMe | 3,24 | 49,09 |
| 14 | 1,47; 1,83 | 20,92 | 4'' | 2,88 | 87,39 |
| 14Me | 0,87 | 10,49 | 4''a | 3,74; 3,85 | 73,24 |
| 15 | - | 165,83 | 4''b | 1,87 | 29,72 |
| 16 | - | 135,04 | 4''c | 3,39; 3,62 | 38,54 |
| 17, 21 | 7,90 | 127,39 | 4''d | - ^a | - |
| 18, 20 | 7,93 | 127,70 | 5'' | 4,32 | 64,42 |
| 19 | - | 136,47 | 5''Me | 1,30 | 18,27 |
| 22 | 8,07 | 142,06 | | | |

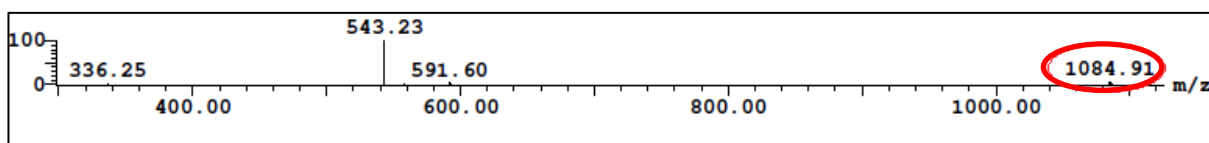
^a - nije asignirano

4.4.5. Etoksikarbonil-makrozon (4e)

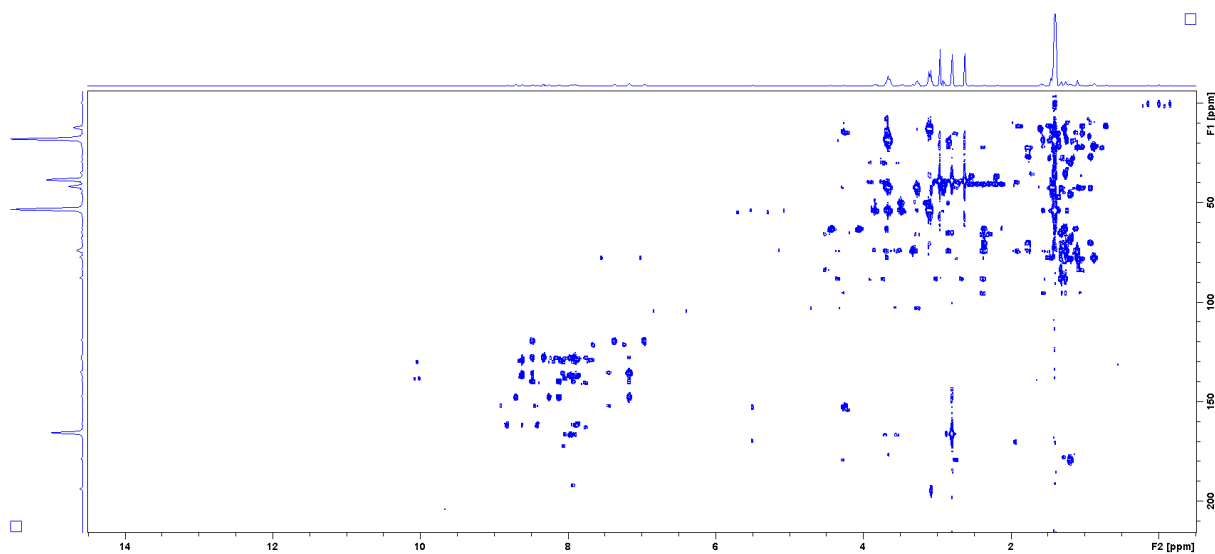
Prisutnost spoja **4e** (Slika 46) u reakcijskoj smjesi potvrđena je spektrometrijom mase (slika 47). Spektar HMBC spoja **4e** prikazan je na slici 48., a tablica 16. prikazuje asignirane pomake za jezgre ^1H i ^{13}C . Ostali spektri NMR nalaze se u poglavlju Dodatak (D40-D42).



Slika 46. Struktura etoksikarbonil-makrozona, **4e**.



Slika 47. Spektar ESI-MS makrozona **4e** snimljen u pozitivnom modu.



Slika 48. Spektar HMBC makrozona **4e** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

Tablica 16. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR etoksi-karbonil makrozona **4e**.

| Makrozon 4e | | | | | |
|-------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 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 | - | 178,87 | 19 | - | 135,53 |
| 2 | 2,75 | 45,46 | 22 | - ^a | - ^a |
| 2Me | 1,19 | 14,80 | 22a | - ^a | - |
| 3 | 4,29 | 78,06 | 23 | - | - ^a |
| 4 | 1,97 | 42,22 | 23a | - ^a | - |
| 4Me | 1,08 | 9,35 | 24 | - | 152,28 |
| 5 | 3,61 | 83,36 | 25 | 4,23; 4,27 | 62,96 |
| 6 | - | 73,79 | 26 | 1,29 | 14,23 |
| 6Me | 2,03 | 26,64 | 1' | 4,52 | 102,4 |
| 6OH | - ^a | - | 2' | 3,27 | 70,74 |
| 7 | 1,31; 1,76 | 42,52 | 2'OH | - ^a | - |
| 8 | 1,32 | 27,41 | 3' | 2,65 | 65,43 |
| 8Me | 0,93 | 21,97 | 3'NMe ₂ | 2,29 | 40,16 |
| 9 | 2,14; 2,60 | 69,79 | 4' | 1,21; 1,63 | 29,64 |
| 9aN | 2,37 | 36,34 | 5' | 3,70 | 67,97 |
| 10 | 2,77 | 62,77 | 5'Me | 1,23 | 21,71 |
| 10Me | 1,12 | 7,51 | 1'' | 5,11 | 95,01 |
| 11 | 3,68 | 73,44 | 2'' | 1,56; 2,38 | 35,27 |
| 11OH | - ^a | - | 3'' | - | 74,02 |
| 12 | - | 74,30 | 3''Me | 1,19 | 21,58 |
| 12OH | - ^a | - | 3''OMe | 3,43 | 49,78 |
| 12Me | 1,10 | 16,35 | 4'' | 2,85 | 87,88 |
| 13 | 4,72 | 77,44 | 4''a | 3,75; 3,90 | 73,99 |
| 14 | 1,46; 1,89 | 21,24 | 4''b | 1,92 | 29,73 |
| 14Me | 0,88 | 11,15 | 4''c | 3,55; 3,69 | 39,25 |
| 15 | - | 166,18 | 4''d | - ^a | - |
| 16 | - | 136,51 | 5'' | 4,35 | 64,78 |
| 17, 21 | 7,89 | 128,65 | 5''Me | 1,41 | 18,23 |
| 18, 20 | 7,96 | 127,54 | | | |

^a – nije asignirano

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada pripremljeni su novi 4"-konjugati antibiotika azitromicina i tiosemikarbazona; makrozoni. Optimizirani su uvjeti sinteze i pročišćavanja pet makrozona korištenjem kolonske i semipreparativne kromatografije te sustava LC-SPE. Svi pripremljeni spojevi identificirani su i strukturno okarakterizirani pomoću spektrometrije masa te jedno- i dvodimenzijske spektroskopije NMR.

Daljnja istraživanja uključuju provjeru biološke aktivnosti pripremljenih makrozona na susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija. U slučaju da aktivnost bude zadovoljavajuća istražiti će se načini vezanja makrozona na biološke mete kao što su ribosom i stanične membrane te će se pokušati odrediti odnos strukture i aktivnosti pripremljenih konjugata.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

DCM - diklormetan

DIPEA - *N,N*-diisopropiletilamin

DMSO - dimetil-sulfoksid

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

heksafluorofosfat

HPLC - (engl. *high performance liquid chromatography*) tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

LC-SPE - (engl. *liquid chromatography - solid phase extraction*) - tekućinska kromatografija - ekstrakcija na čvrstoj fazi

MS - spektrometrija mase

NMR - (engl. *Nuclear magnetic resonance*) nuklearna magnetska rezonancija

NOE - (engl. *Nuclear Overhauser effect*) nuklearni Overhauserov efekt

STD - (engl. *Saturation transfer difference*) razlika prijenosa zasićenja

TLC - (engl. *thin layer chromatography*) tankoslojna kromatografija

TMS - tetrametilsilan

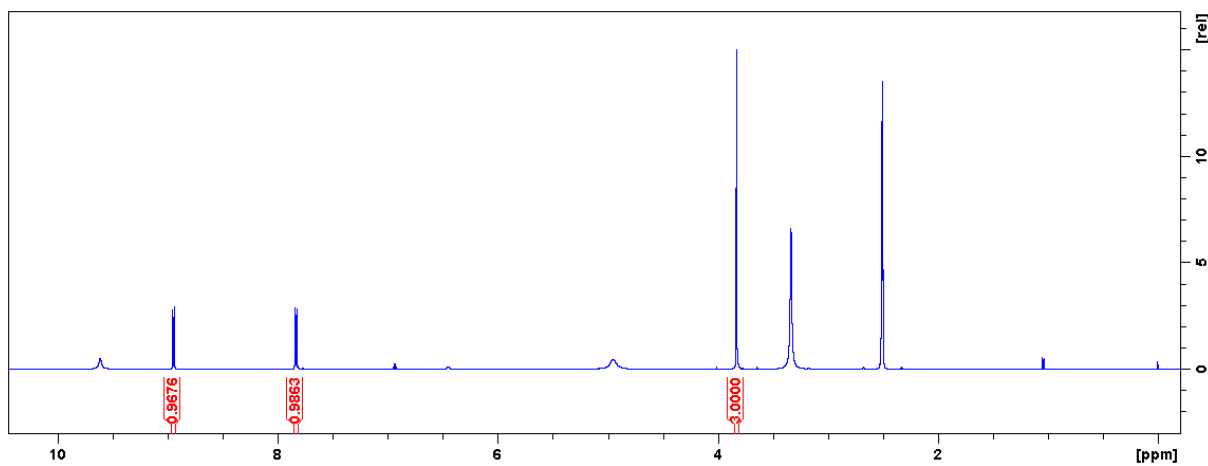
tr-NOESY - (engl. *transferred Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) spektroskopija prijenosnog nuklearnog Overhauserovog efekta

§ 7. LITERATURNI IZVORI

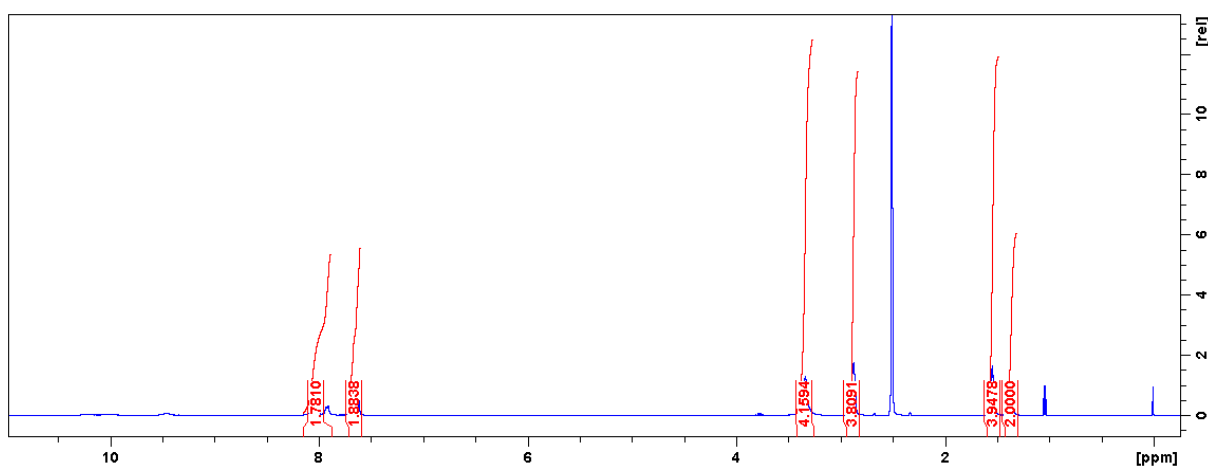
1. R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **69** (1957) 50-58.
2. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 2-6.
3. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* (2019); U tisku
4. S. Alihodžić, M. Bukvić, I. J. Elenkov, A. Hutinec, S. Koštrun, D. Pešić, G. Saxty, L. Tomašković, D. Žiher, *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier, 2018, str. 113-131.
5. L. H. Hansen, P. Mauvais, S. Douthwaite, *Mol. Microbiol.* **31** (1999) 623-631.
6. James C. - H. Mao, M. Putterman, *J. Mol. Bio.* **44** (1969) 347-361.
7. M. Gaynor A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949-960.
8. B. Arsić, J. Barber, P. Novak, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018, str. 1-77.
9. S. Zulfikari, *Sinteza i svojstva protuupalnih konjugata makrolida i nesteroidnih protuupalnih lijekova*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012., str. 30.
10. R. Leclercq, P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **35** (1991) 1273-1276.
11. J. - C. Pechere, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **18** (2001) 25-28.
12. B. V. Yang, M. Goldsmith, J. P. Rizzi, *Tetrahedron Lett.* **35** (1994) 3025-3028.
13. S. Djokić, G. Kobrehel, G. Lazarevski, N. Lopotar, Z. Tamburašev, B. Kamenar, A. Nagl, I. Vicković, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** (1986) 1881-1890.
14. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomedical Science and Engineering* **5** (2012) 39-42.
15. <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/592375/> (Datum pristupa 28. siječnja)
16. M. Tomić, *Sinteza tiosemikarbazida na bazi kumarina kao potencijalnih antioksidansa*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, 2016, str. 26.
17. K. Pičuljan, *Struktura i vodikove veze derivata tiosemikarbazona u otopini*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 10-11.
18. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturalna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013.

19. P. Tepeš i P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165-173.
20. P. Novak i T. Jednačak, Z. Mandić (ur.), *NMR Spectroscopy for studying interactions of bioactive molecules*, IAPC, Zagreb, 2011, str. 189-231.

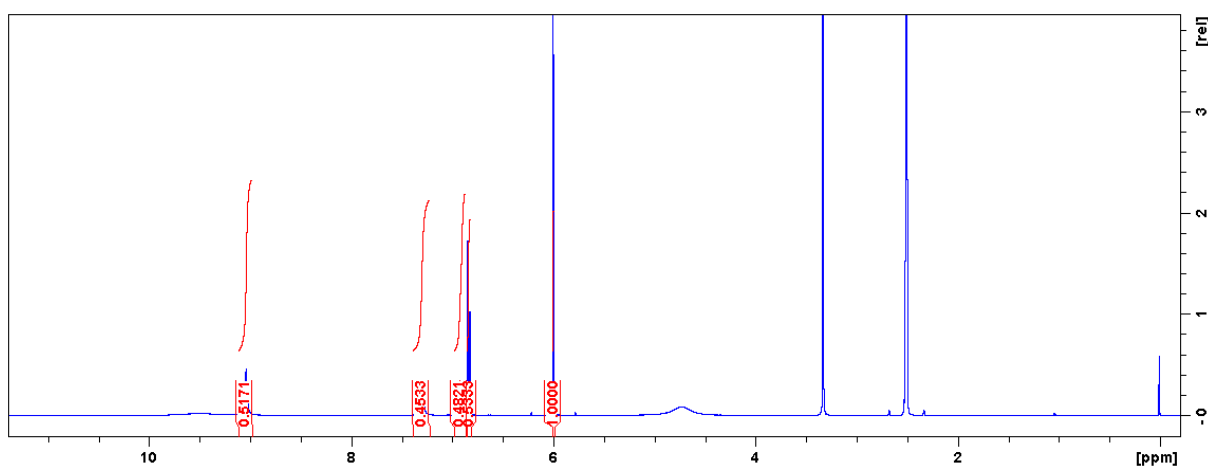
§ 8. DODATAK



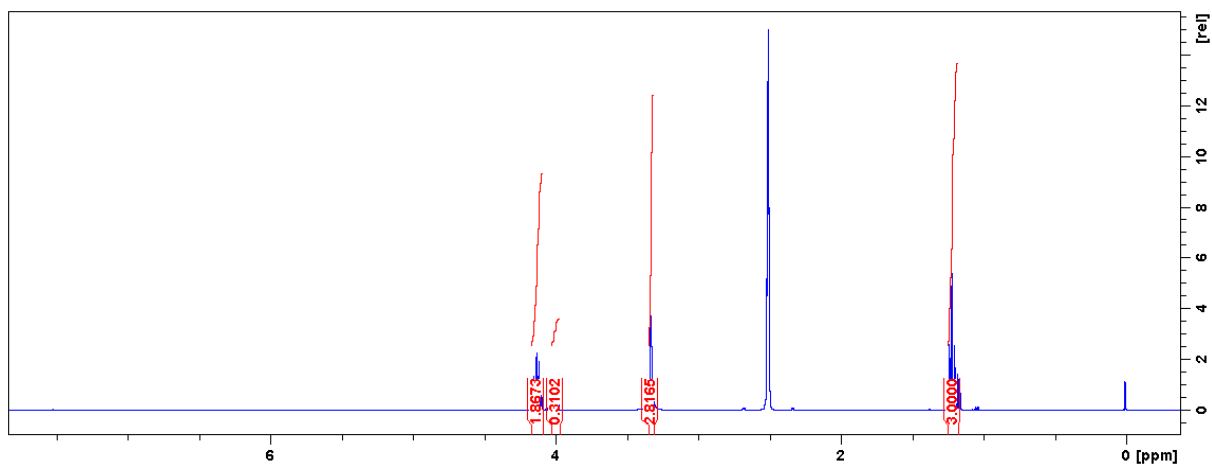
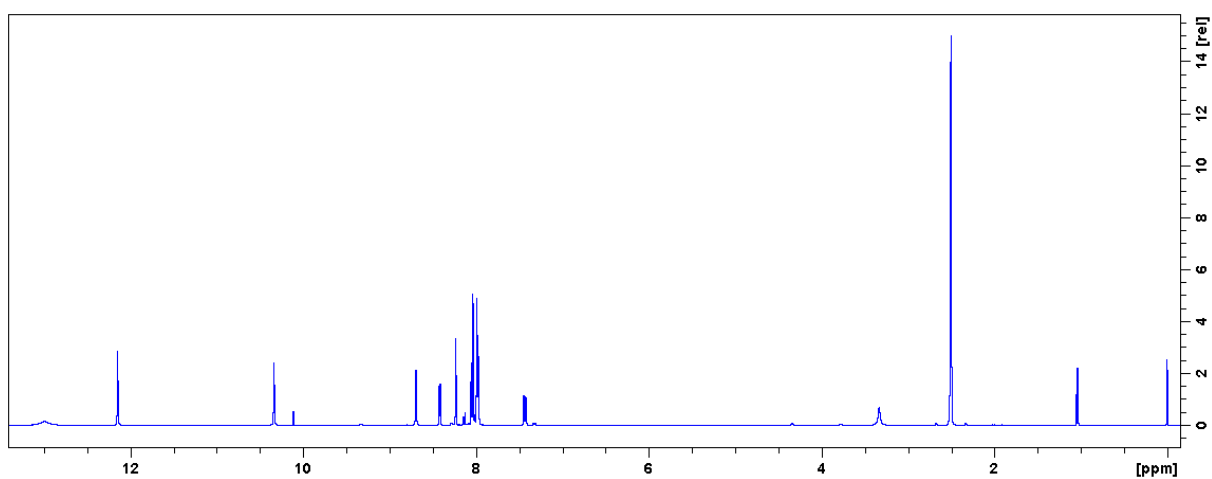
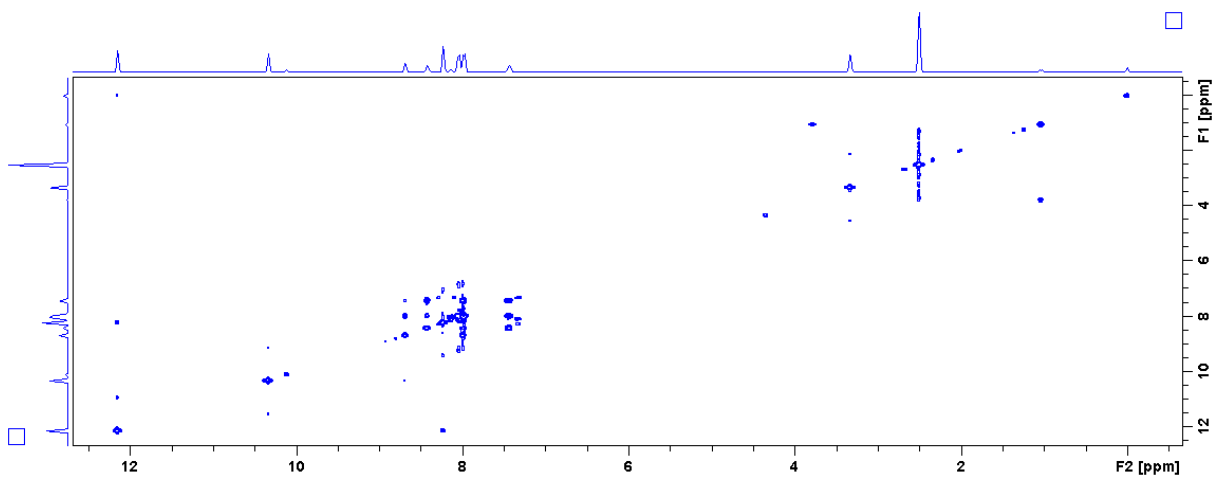
D1. Spektar ¹H NMR spoja **2b** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

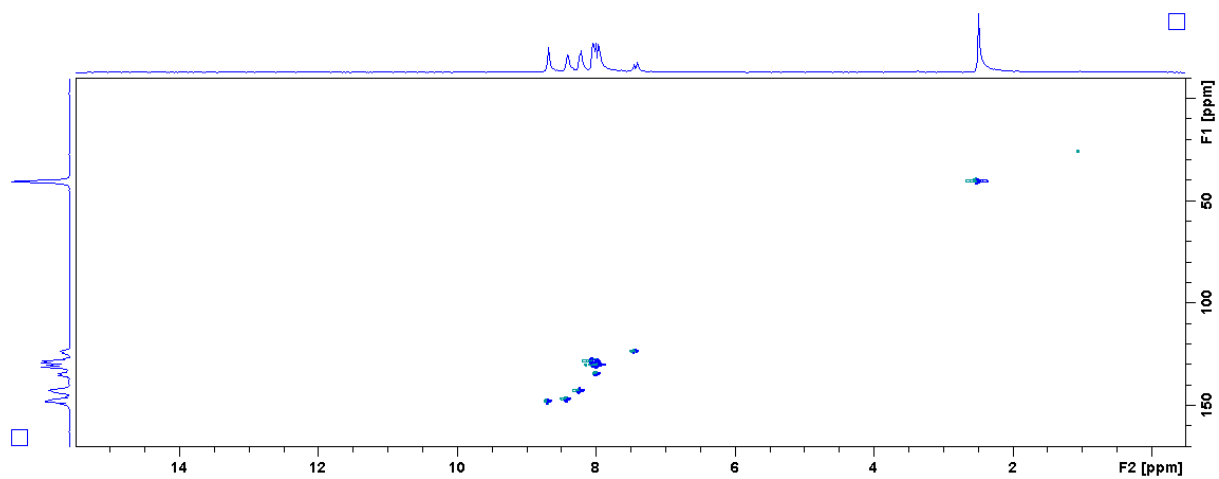
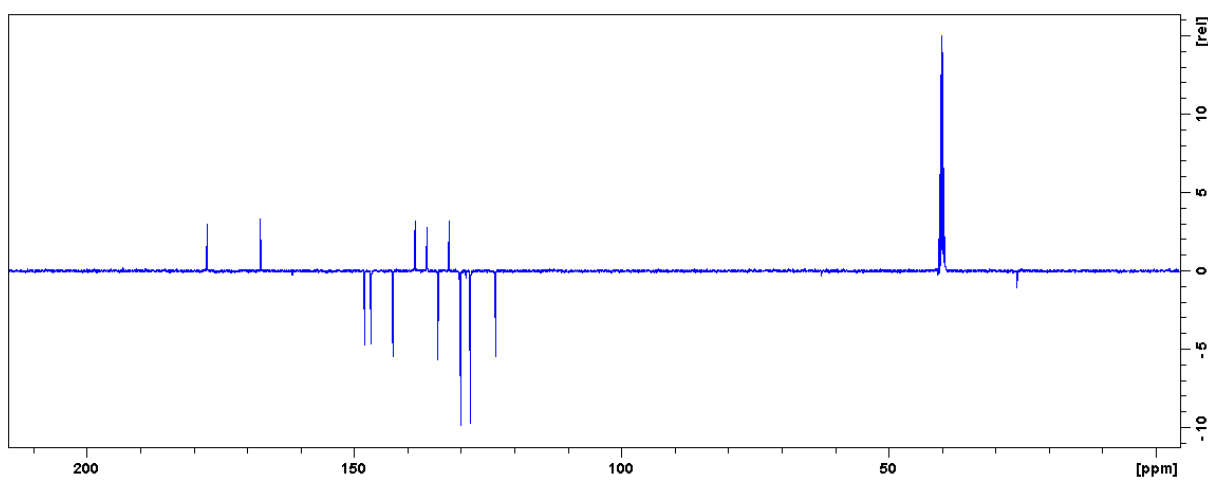
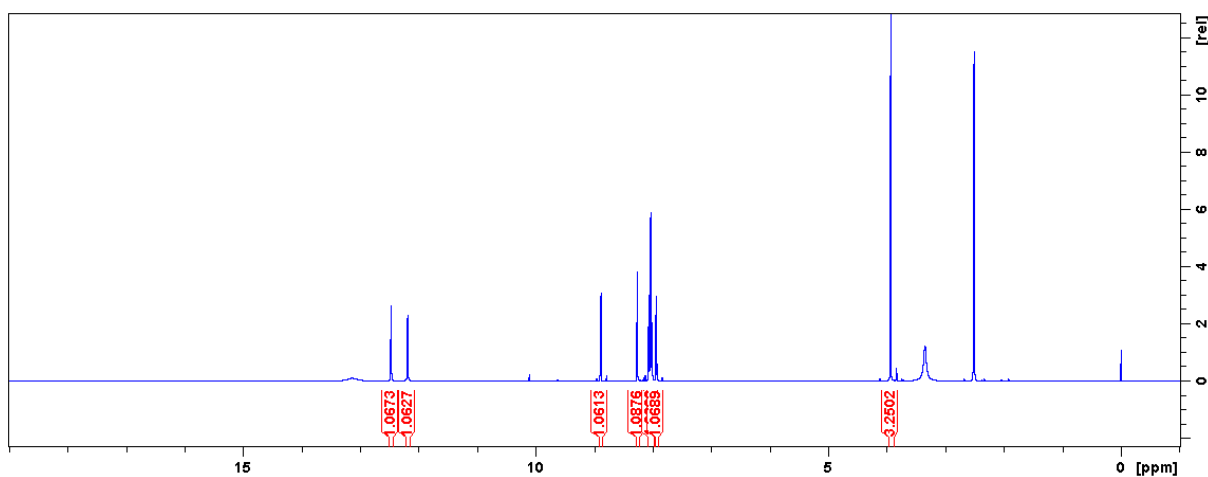


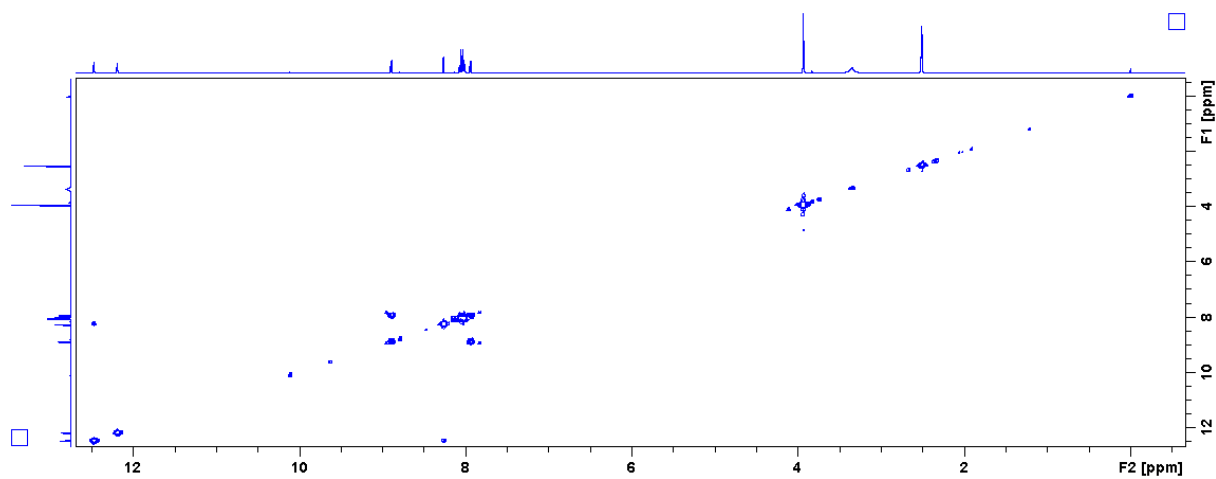
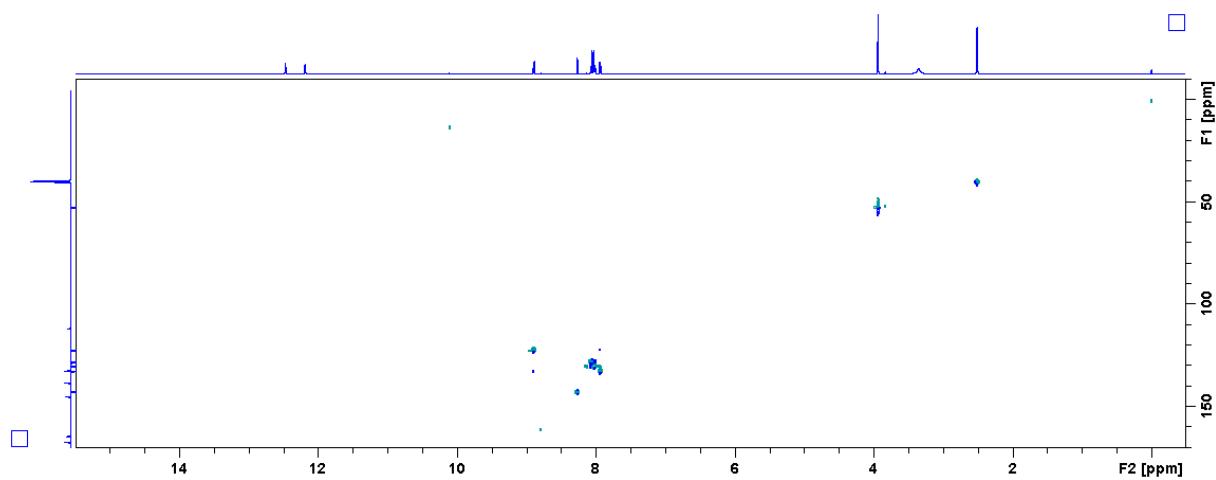
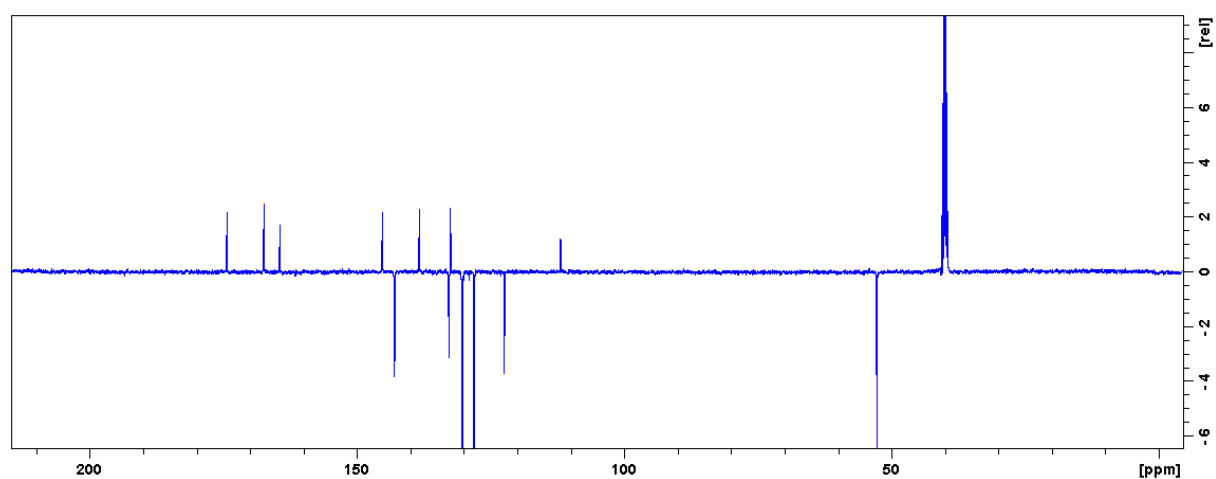
D2. Spektar ¹H NMR spoja **2c** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

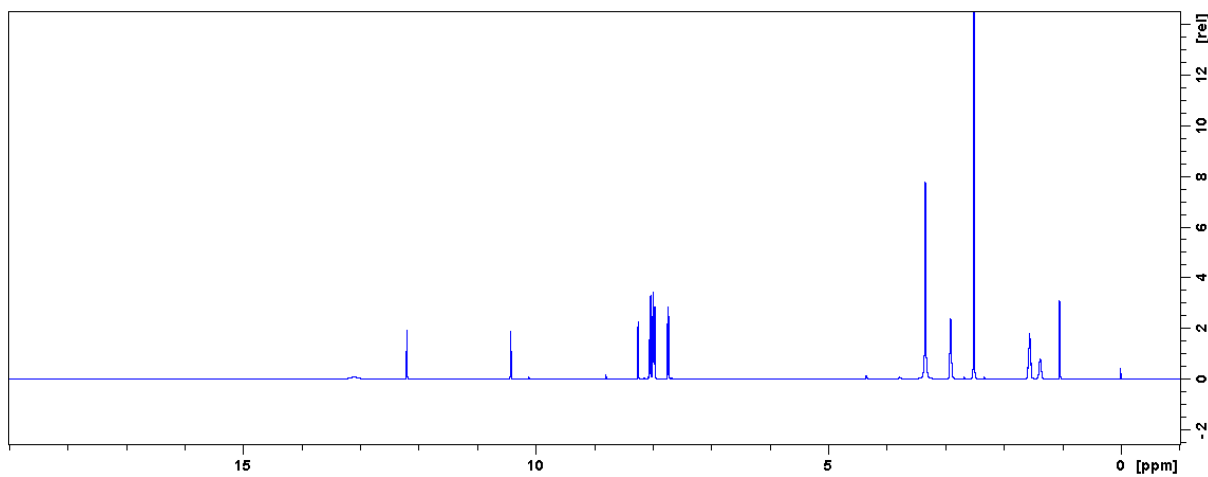
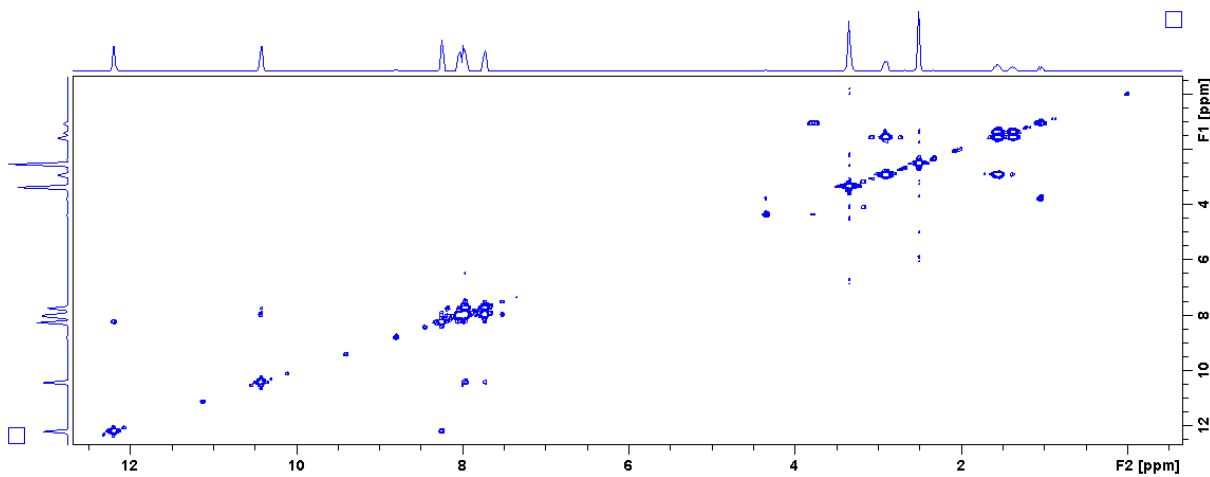
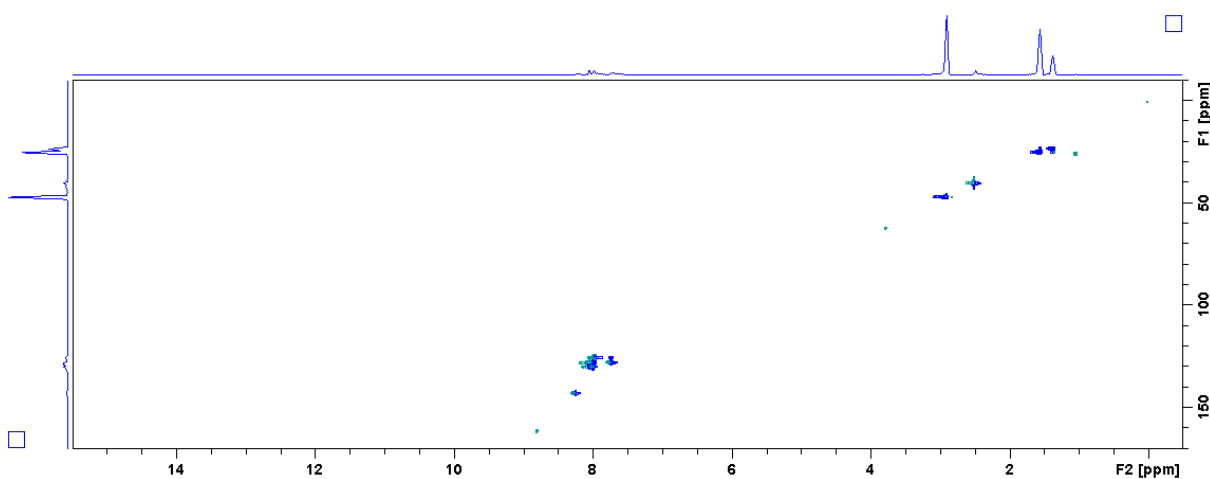


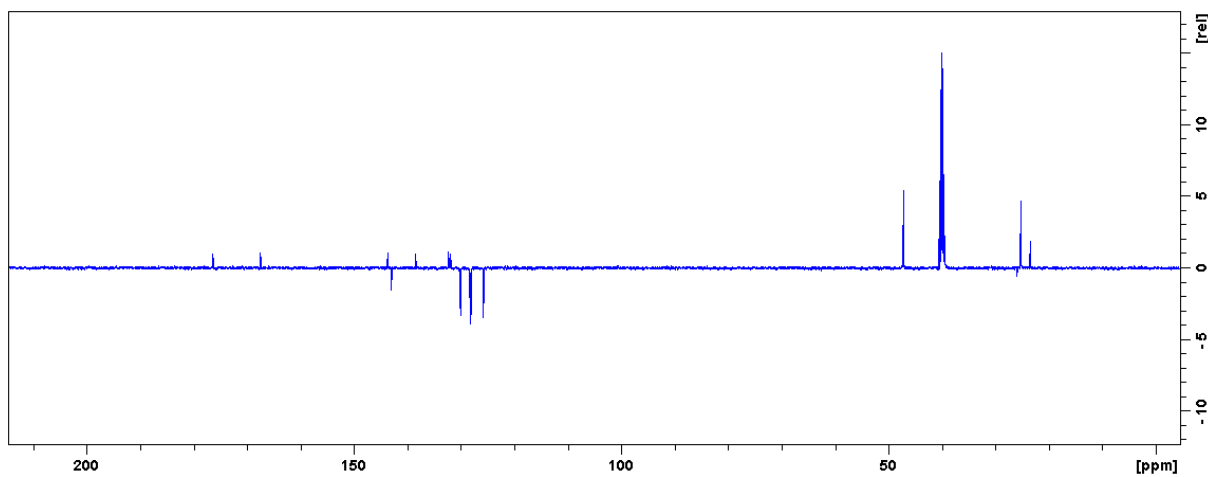
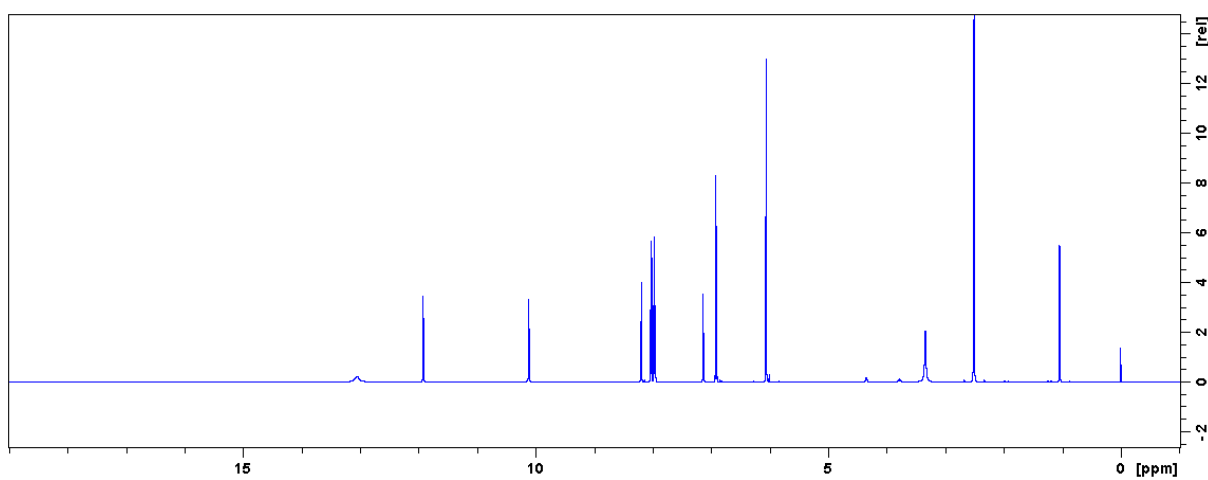
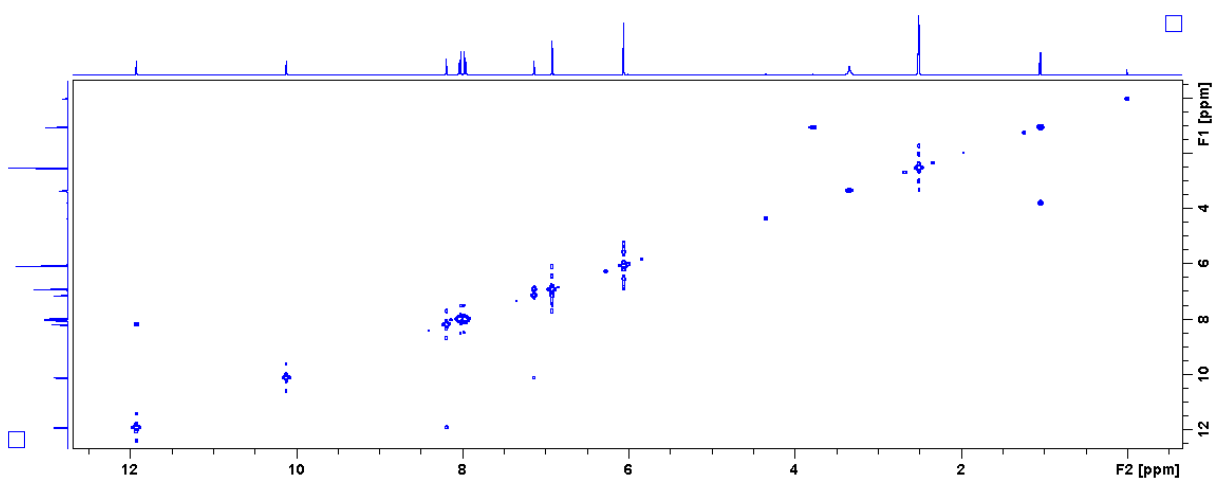
D3. Spektar ¹H NMR spoja **2d** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

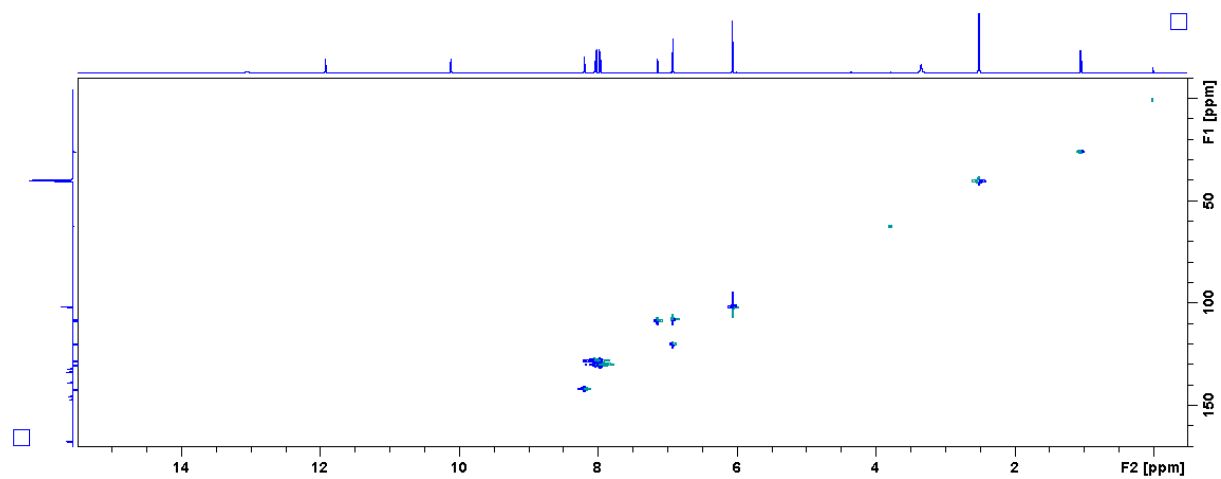
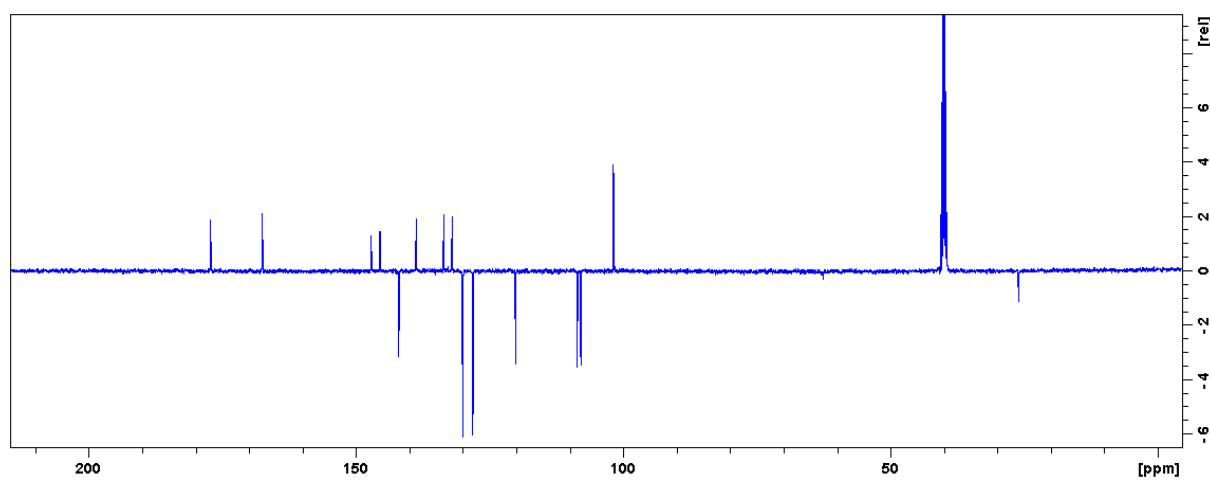
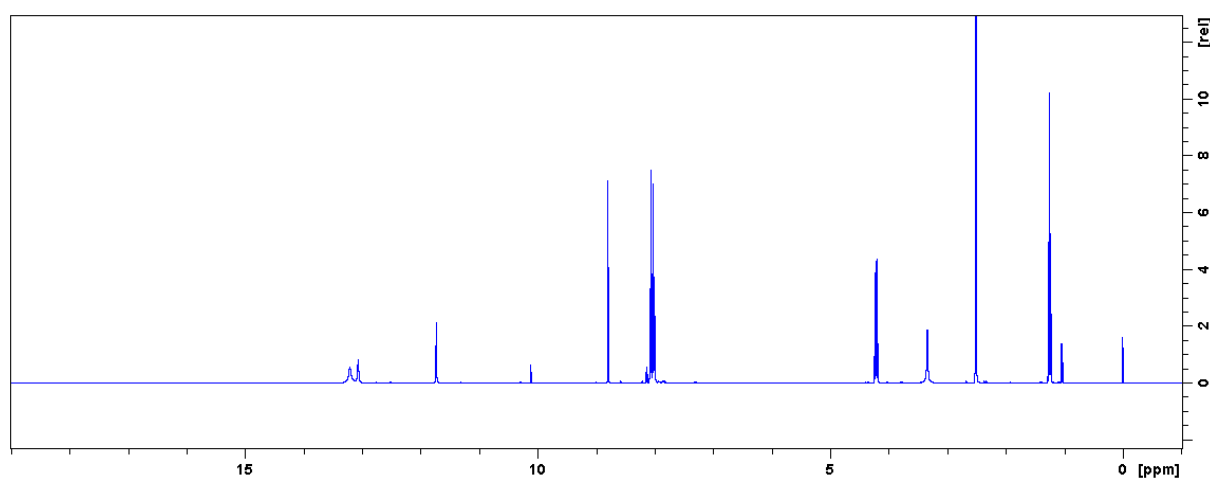
D4. Spektar ^1H NMR spoja **2e** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.D5. Spektar ^1H NMR spoja **3a** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.D6. Spektar COSY spoja **3a** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

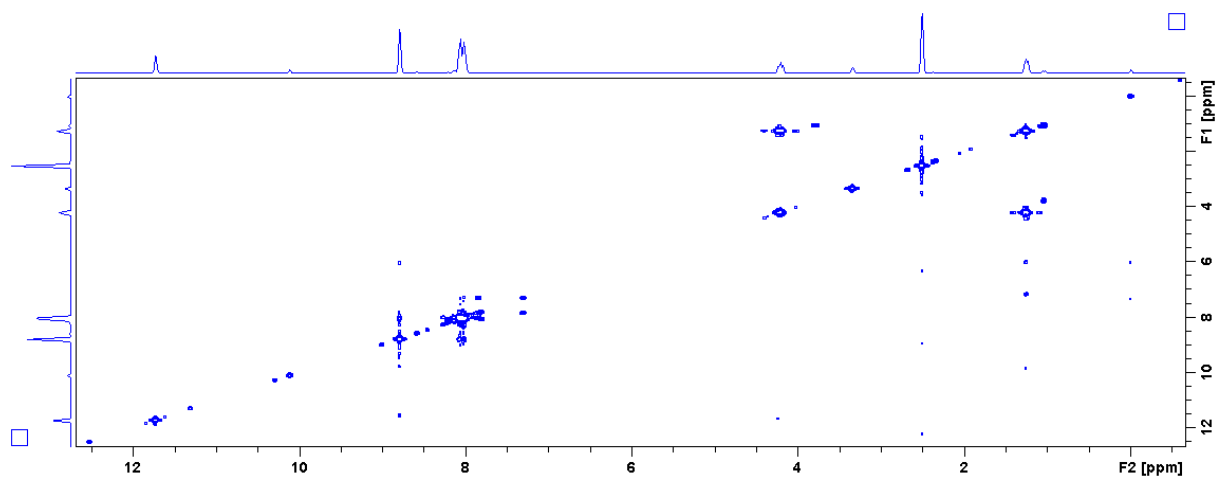
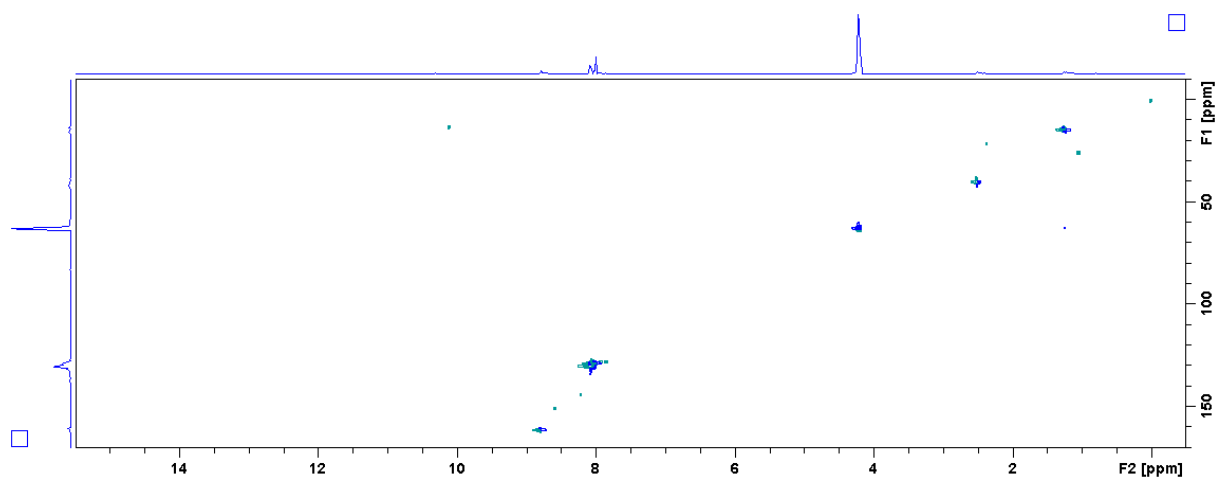
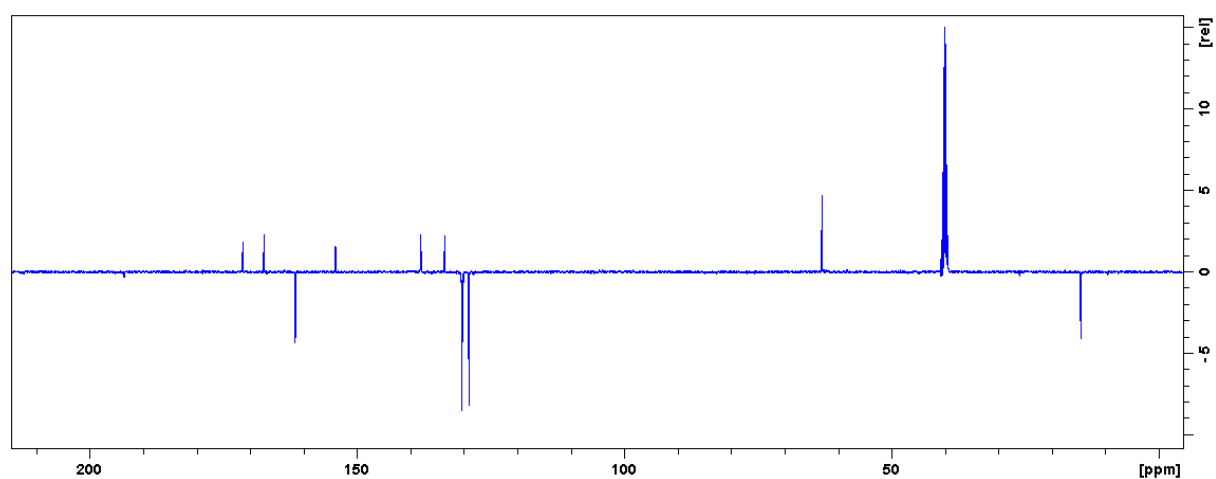
D7. Spektar HSQC spoja **3a** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D8. Spektar DEPT-Q-spoja **3a** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D9. Spektar ¹H NMR spoja **3b** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

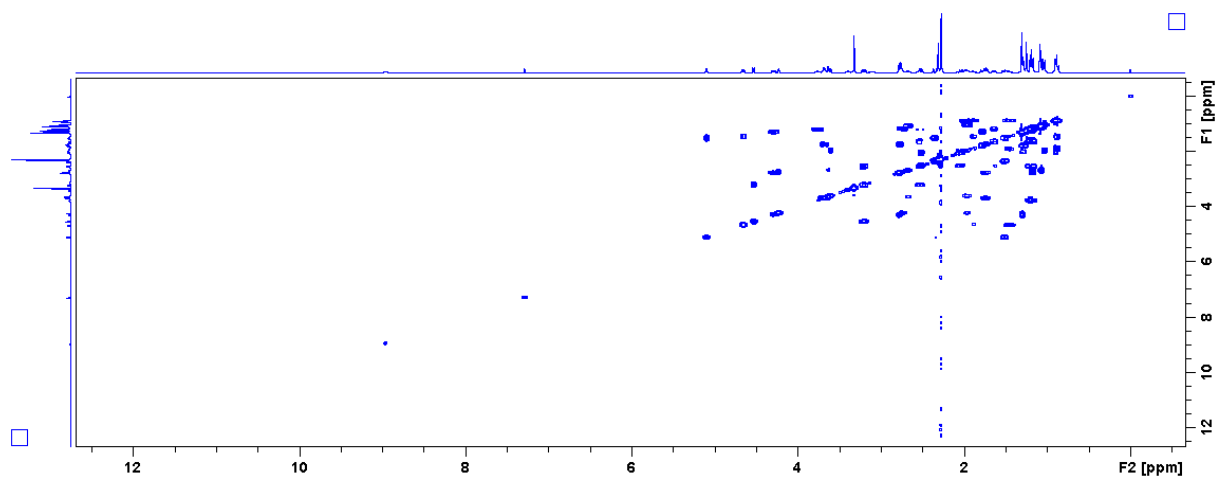
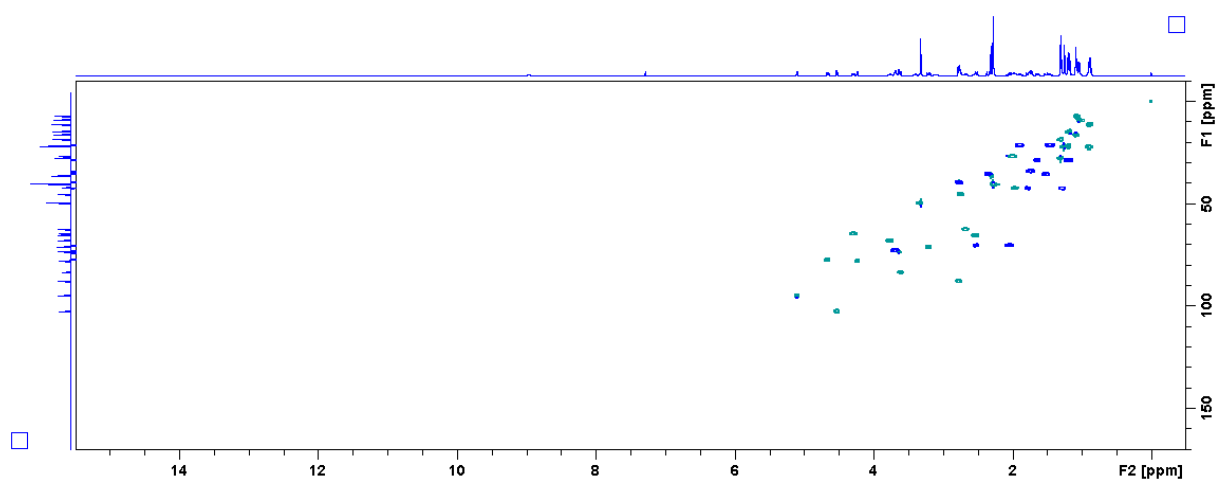
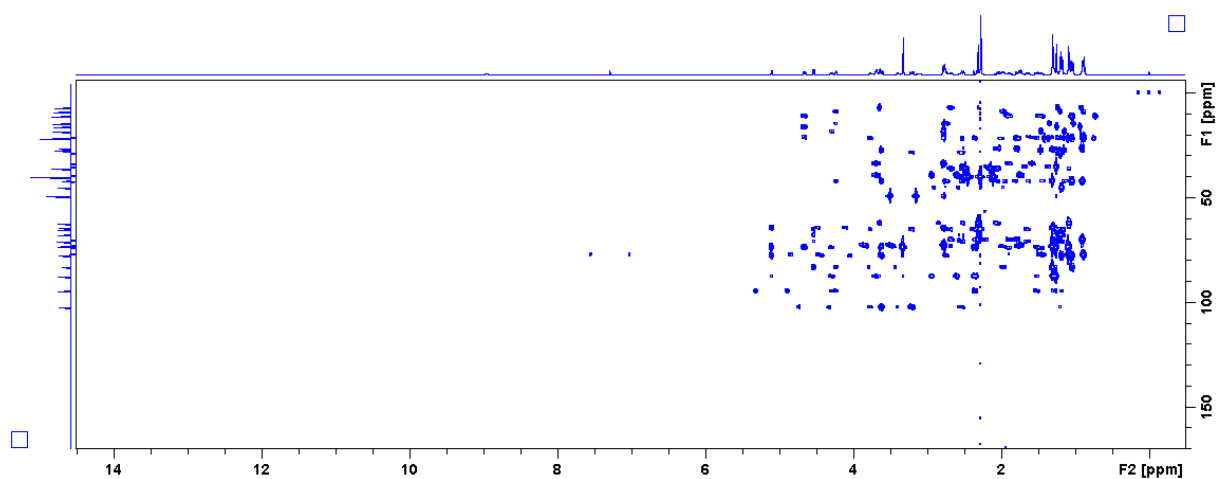
D10. Spektar COSY spoja **3b** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D11. Spektar COSY spoja **3b** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D12. Spektar DEPT-Q spoja **3b** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

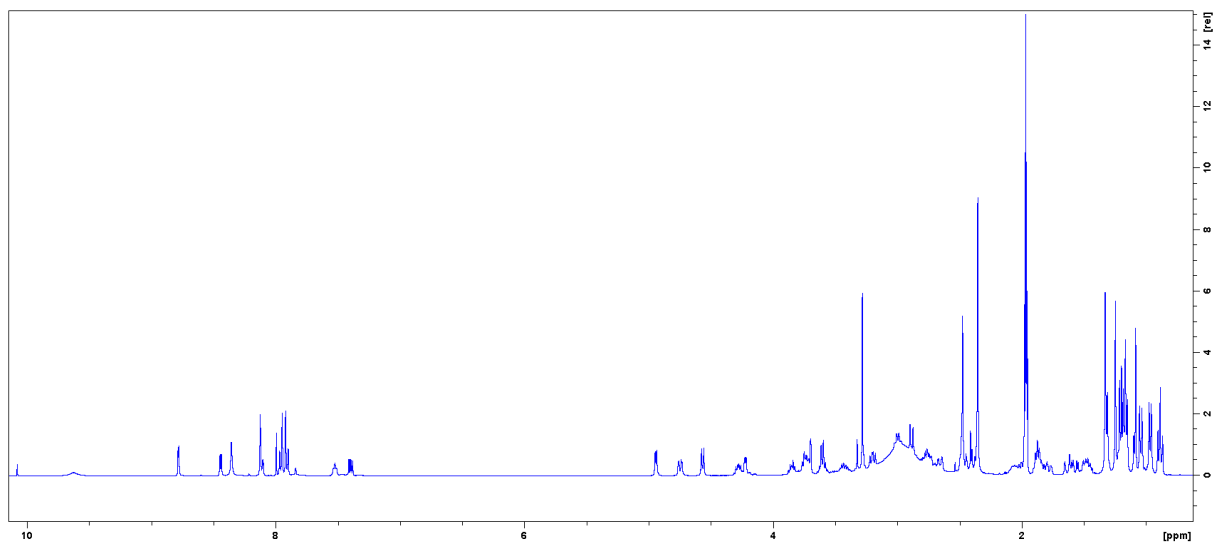
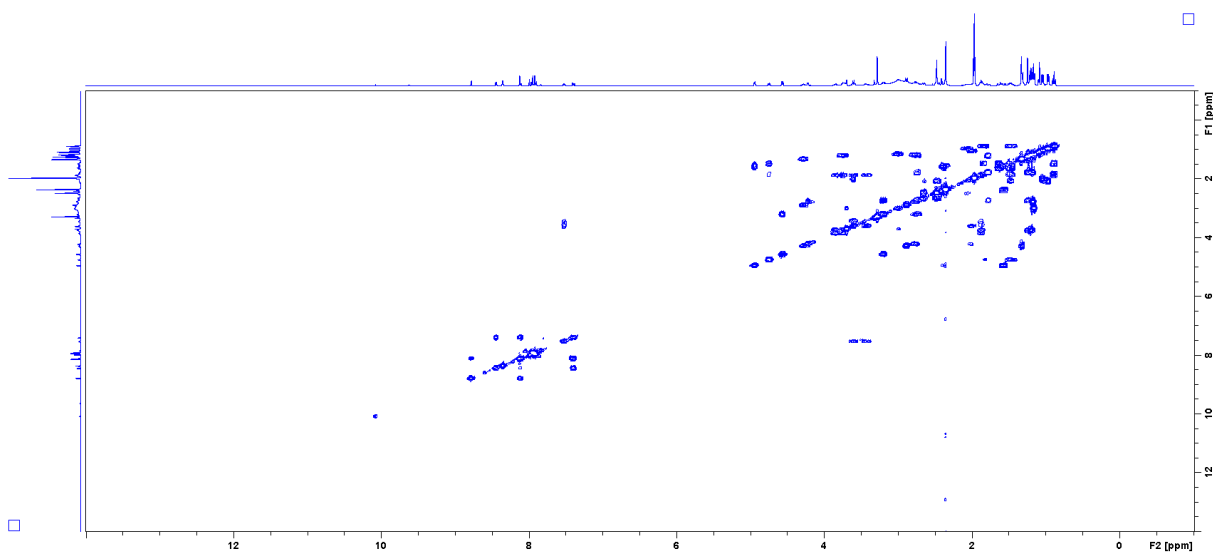
D13. Spektar ^1H NMR spoja **3c** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.D14. Spektar COSY spoja **3c** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.D15. Spektar HSQC spoja **3c** snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K.

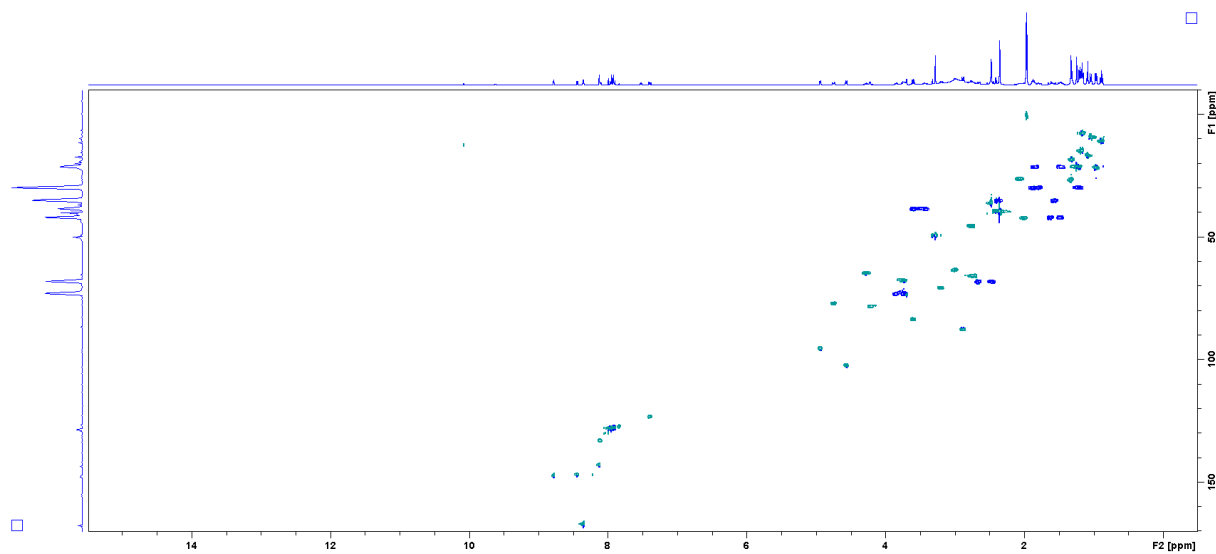
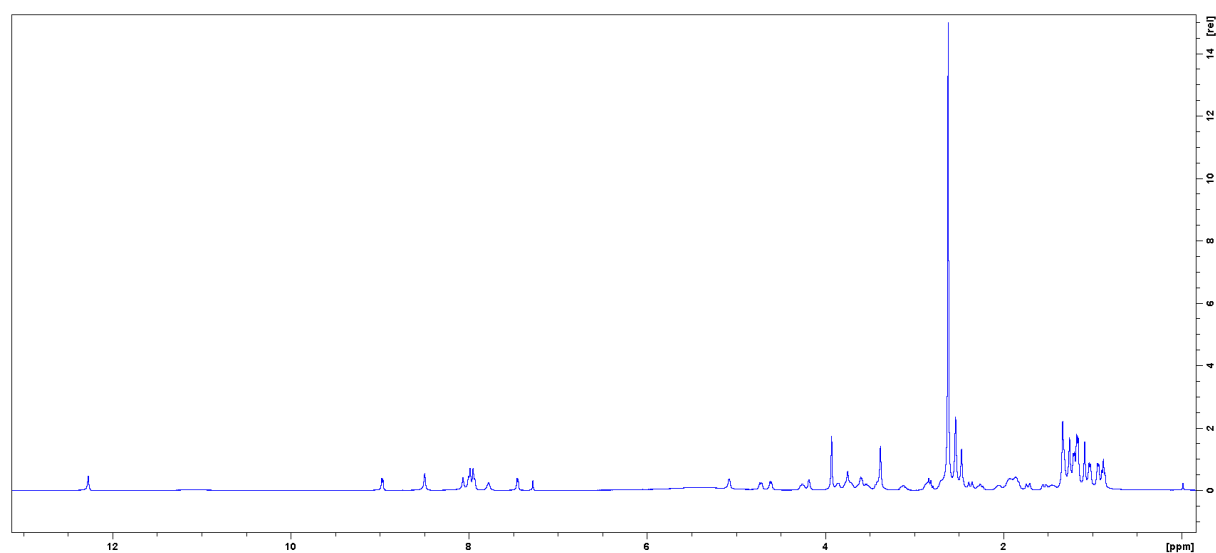
D16. Spektar DEPT-Q spoja **3c** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D17. Spektar ¹H NMR spoja **3d** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D18. Spektar COSY spoja **3d** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

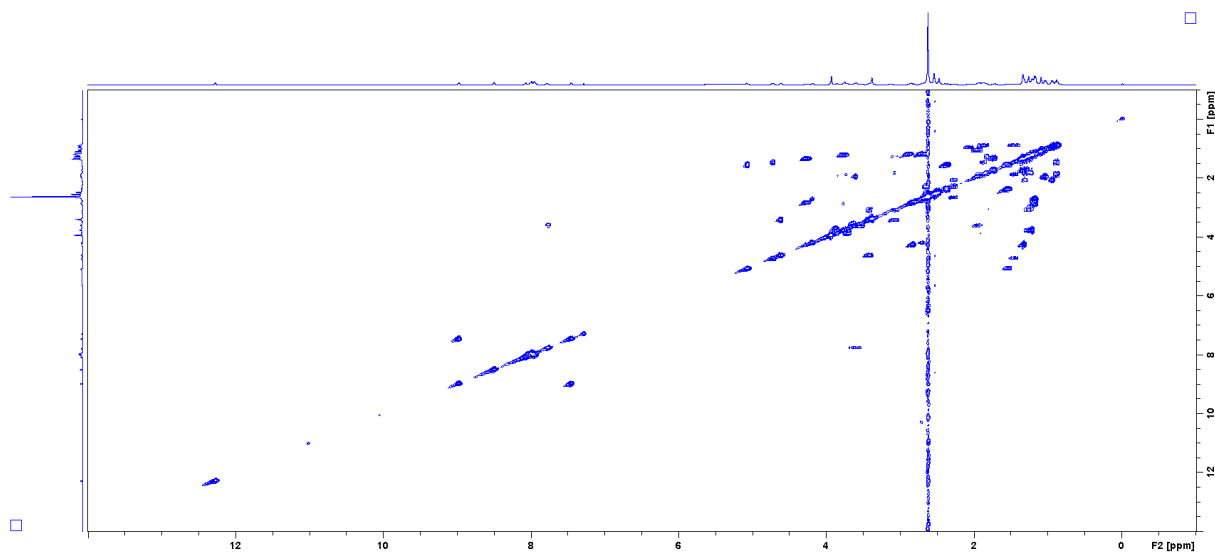
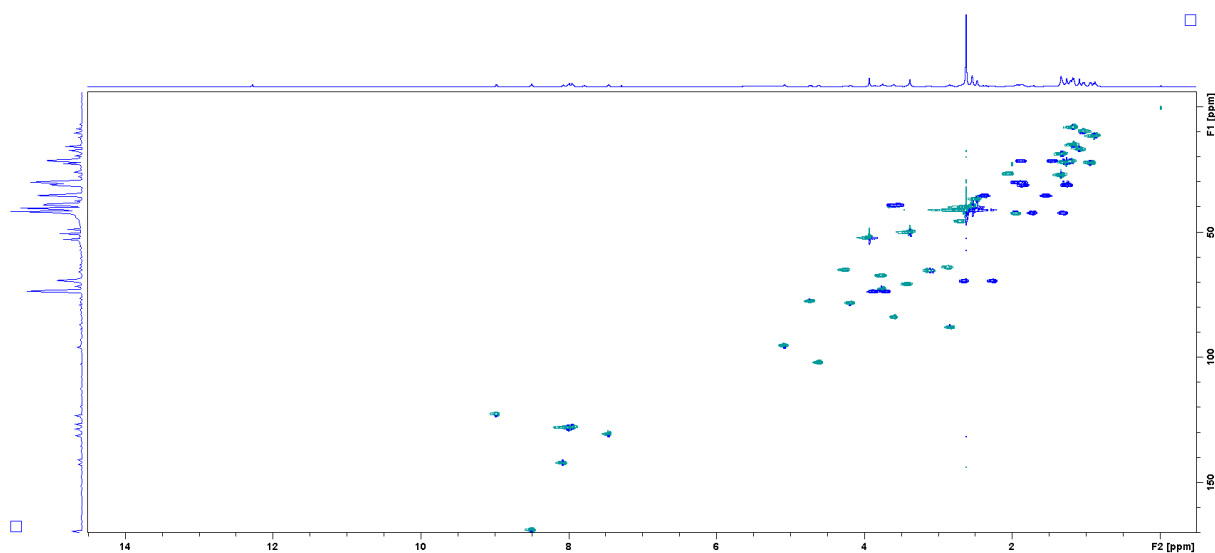
D19. Spektar HSQC spoja **3d** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D20. Spektar DEPT-Q spoja **3d** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D21. Spektar ¹H NMR spoja **3e** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

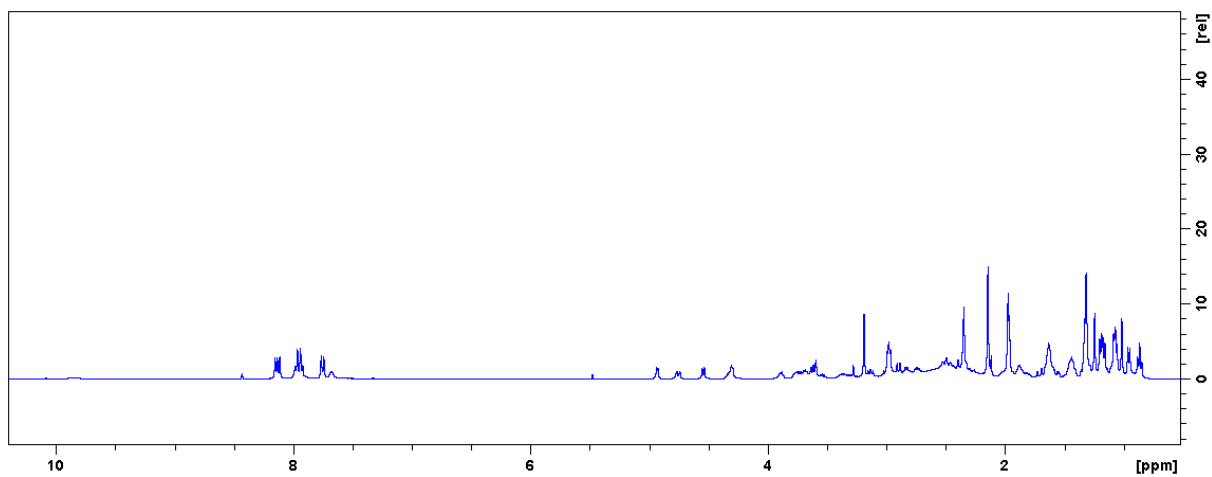
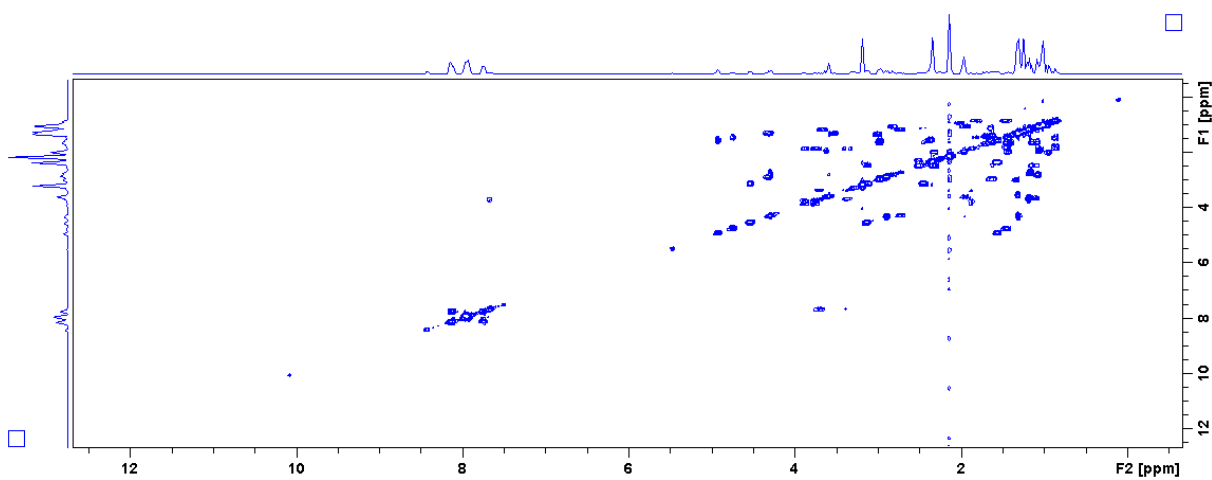
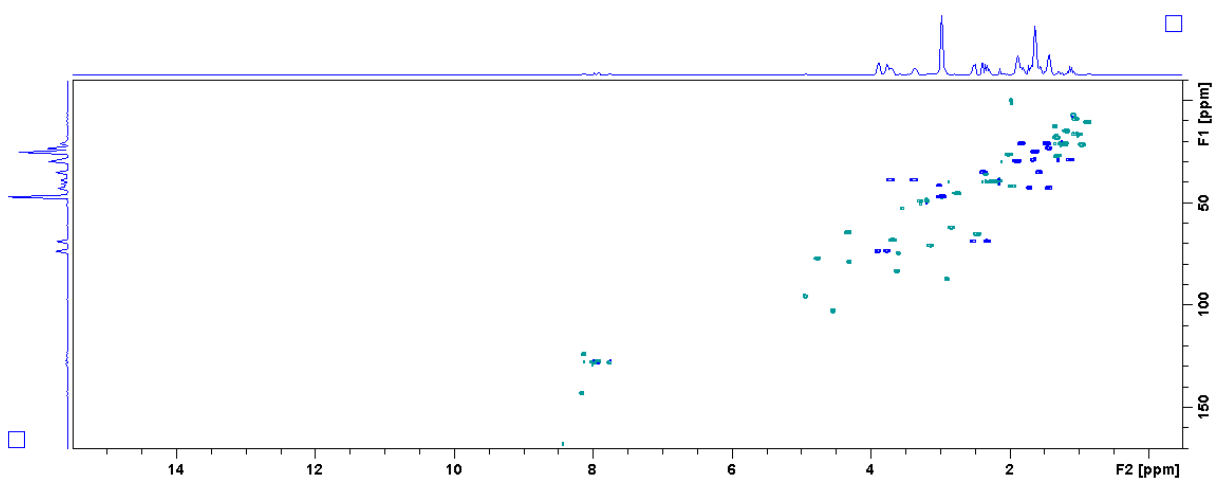
D22. Spektar COSY spoja **3e** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D23. Spektar HSQC spoja **3e** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.D24. Spektar DEPT-Q spoja **3e** snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K.

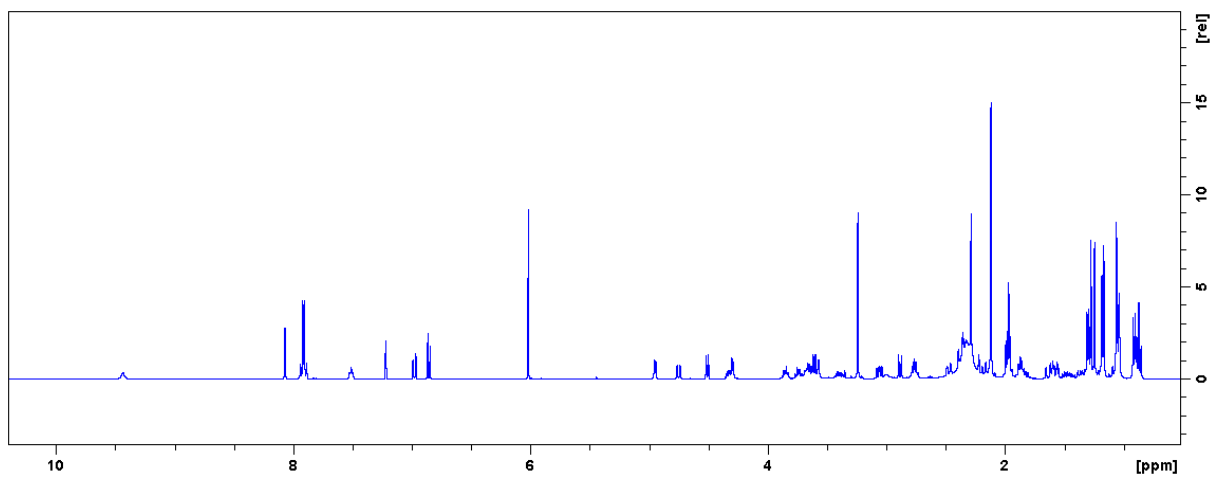
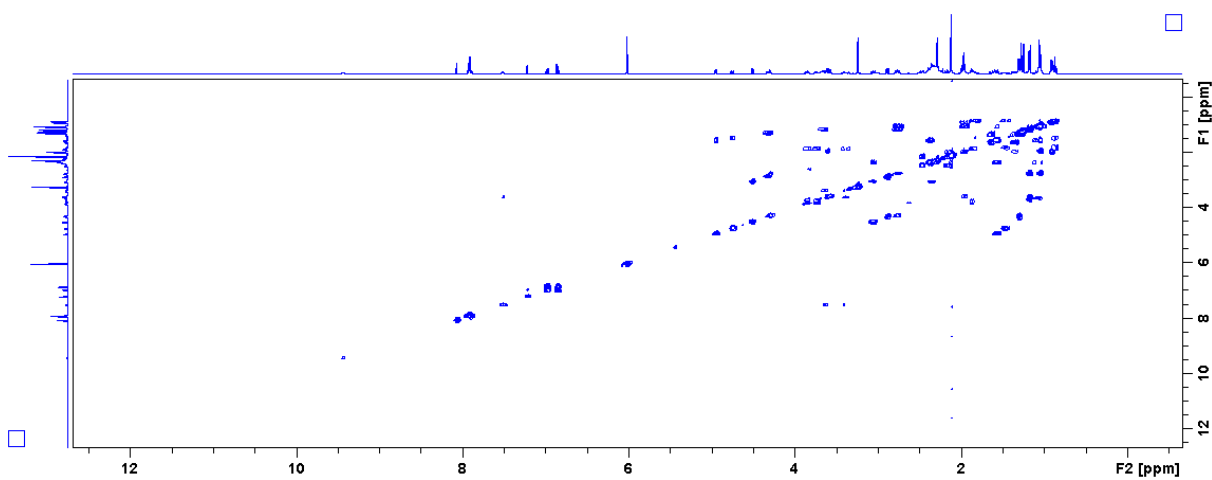
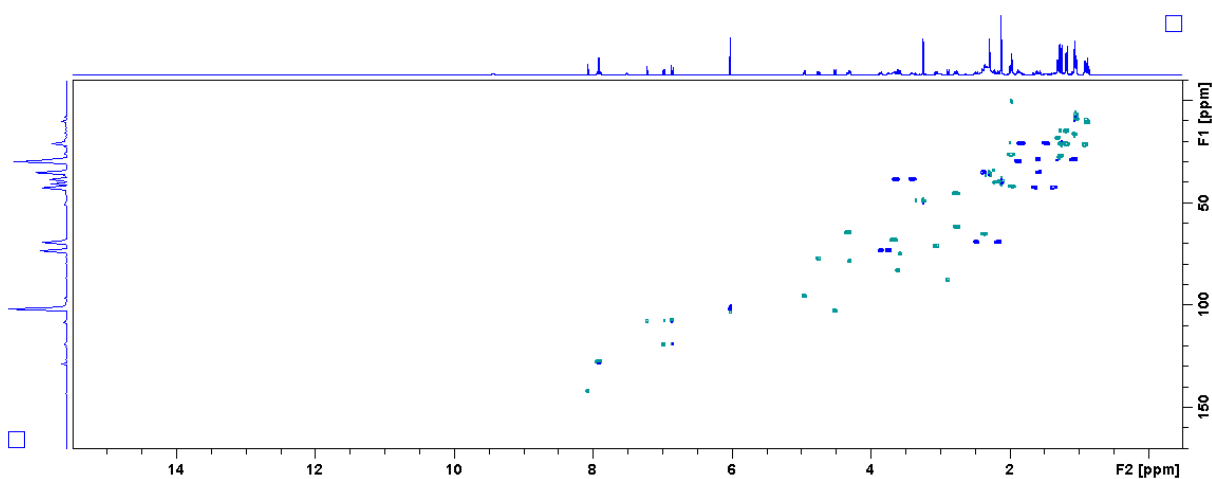
D25. Spektar COSY spoja **P₅** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.D26. Spektar HSQC spoja **P₅** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.D27. Spektar HMBC spoja **P₅** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.

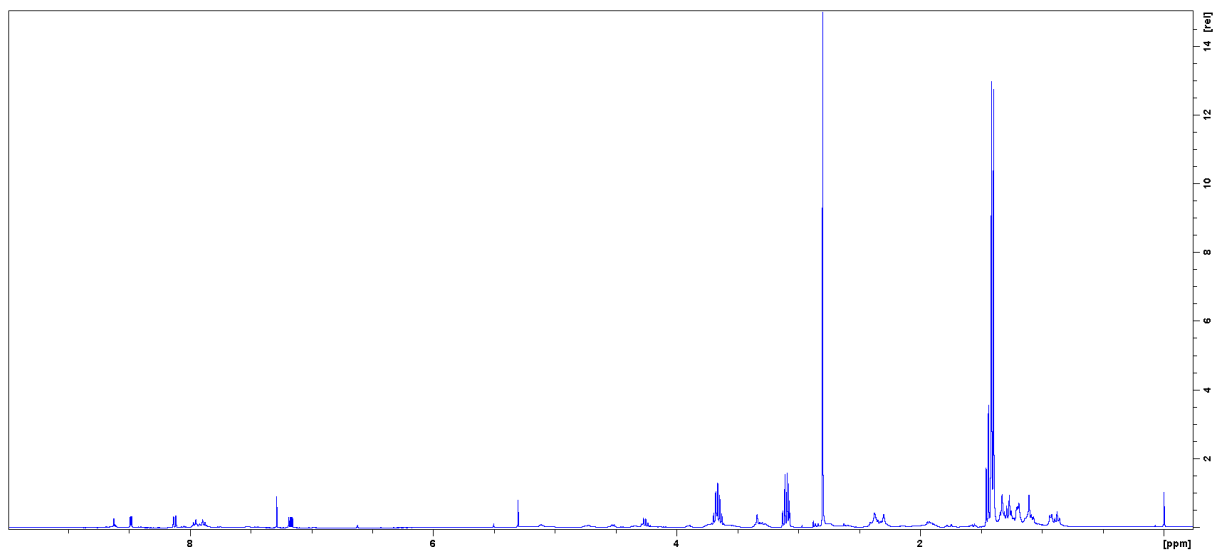
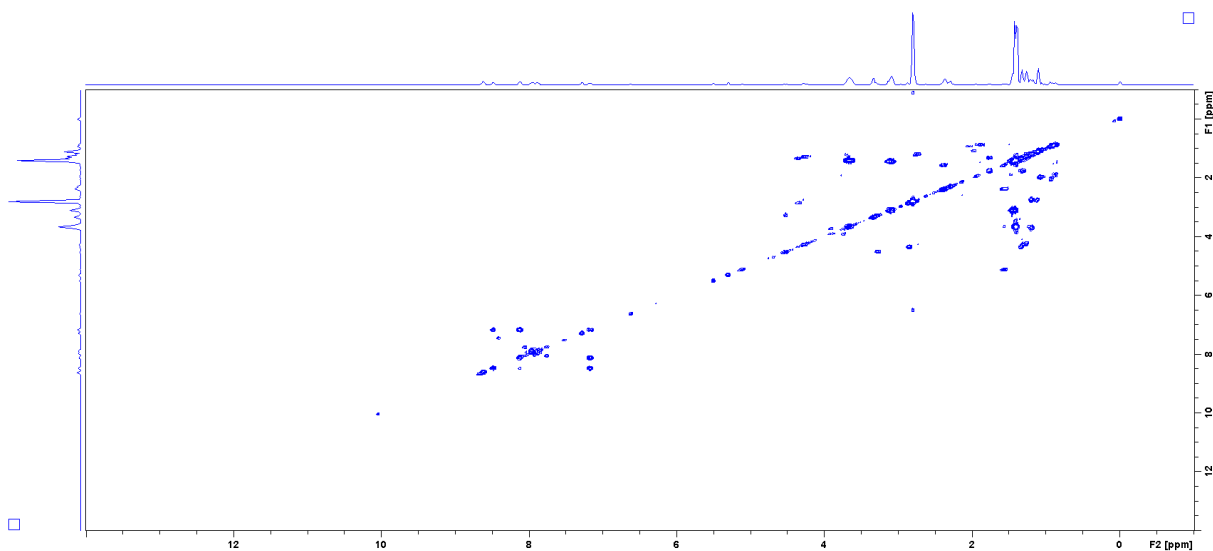
D28. Spektar ^1H NMR spoja **4a** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.D29. Spektar COSY spoja **4a** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

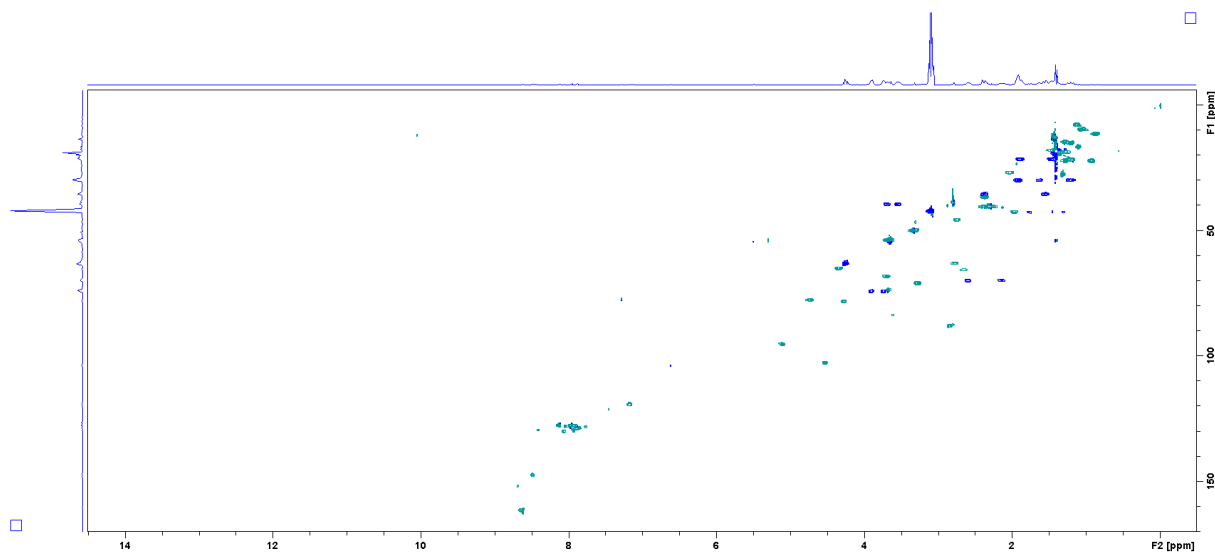
D30. Spektar HSQC spoja **4a** snimljen u acetonitrilu-d₃ pri 298 K.D31. Spektar ¹H-NMR spoja **4b** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.

D32. Spektar COSY spoja **4b** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.D33. Spektar HSQC spoja **4b** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.

D34. Spektar ^1H NMR spoja **4c** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.D35. Spektar COSY spoja **4c** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.D36. Spektar HSQC spoja **4c** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

D37. Spektar ^1H NMR spoja **4d** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.D38. Spektar COSY spoja **4d** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.D39. Spektar HSQC spoja **4d** snimljen u acetonitrilu- d_3 pri 298 K.

D40. Spektar ^1H NMR spoja **4e** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.D41. Spektar COSY spoja **4e** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.



D42. Spektar HSQC spoja **4e** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Antonio Barišić

Datum rođenja: 5. studenoga 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001.-2009. Osnovna škola OŠ Dragutina Tadijanovića, Zagreb

2009.-2013. Srednja škola VII. gimnazija, Zagreb

2013.-2017. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2017.- Diplomski sveučilišni studij; Analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014. Otvoreni dan kemije

2014. Smotra Sveučilišta u Zagrebu