

Priprava i razdvajanje enantiomera (\pm)-ektoina

Šišić, Marcela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:929787>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marcela Šišić

PRIPRAVA I ODVAJANJE ENANTIOMERA (±)-EKTOINA

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kiralne tehnologije, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Marina Roje, v. zn. sur. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Ines Primožič, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.

Diplomski rad izrađen je u okviru *Znanstvenog centra izvrsnosti za bioprospecting mora – BioProCro* (EK-KK.01.1.1.01.) i projekta *Bioprospecting Jadranskog mora* (EK-KF-KK.01.1.1.01.0002).

Zahvale

U prvom se redu zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Marinu Roji na izboru zanimljive teme, ukazanom povjerenju i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Posebno hvala na uloženom trudu, mnogobrojnim savjetima, raspravama, prenesenom znanju i pomoći kad god je trebala.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Ines Primožič, čiji su komentari doprinijeli kvaliteti ovog rada i zahvaljujem se na svom predanom znanju tijekom studija.

Zahvaljujem se cijelom Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu na pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju. Posebno se zahvaljujem dr. sc. Mladenki Jurin na strpljenju, stručnim savjetima i odgovorima na mnogobrojna pitanja.

Veliko hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su mi olakšali studij i polaganje ispita te na druženjima. Posebno hvala Eviti i Stanku bez kojih ne bih bila ovdje gdje sam sad.

Najveće hvala mami, tati i bratu.

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| SAŽETAK..... | IX |
| ABSTRACT | XI |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Prirodni izvor, struktura i svojstva ektoina..... | 2 |
| 2.1.1. Ektoin | 2 |
| 2.1.2. Osmoprotektanti..... | 3 |
| 2.1.3. Biosintetski put sinteze ektoina | 6 |
| 2.1.4. Mehanizam djelovanja ektoina | 10 |
| 2.1.5. Komercijalna upotreba ektoina..... | 12 |
| 2.2. Biotehnološka priprava ektoina..... | 13 |
| 2.3. Sintetska priprava ektoina | 16 |
| 2.3.1. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline | 17 |
| 2.3.2. Priprava N-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline | 20 |
| 2.3.3. Priprava etil-etanimidata..... | 23 |
| 2.4. Odvajanje enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti..... | 24 |
| 2.4.1. Kiralne stacionarne faze | 24 |
| 2.4.2. Kiralne stacionarne faze za odvajanje enantiomera nederivatiziranih aminokiselina | 28 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 30 |
| 3.1. Materijali i metode..... | 30 |
| 3.2. Priprava (±)-ektoina..... | 32 |
| 3.2.1. Priprava 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (1) | 32 |
| 3.2.2. Priprava 2-(2-oksotetrahidrofuran-3-il)izoindolin-1,3-diona (2)..... | 32 |
| 3.2.3. Priprava 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanske kiseline (3)..... | 33 |
| 3.2.4. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (4)..... | 33 |
| 3.2.5. Priprava 4-nitrofenil-acetata (5) | 34 |
| 3.2.6. Priprava N-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline (6) | 34 |
| 3.2.7. Priprava (±)-ektoina (7)..... | 36 |
| 3.3. Odvajanje enantiomera (±)-ektoina | 37 |
| 3.3.1. Instrumenti | 37 |
| 3.3.2. Metode i uvjeti..... | 37 |
| 3.4. Ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina u hranjivom mediju | 42 |

| | |
|--|---------------|
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 43 |
| 4.1. Priprava (±)-ektoina..... | 43 |
| 4.1.1. Priprava 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (1) | 44 |
| 4.1.2. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (4)..... | 51 |
| 4.1.3. Priprava 4-nitrofenil-acetata (5) | 53 |
| 4.1.4. Priprava N-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline (6) | 54 |
| 4.1.5. Priprava (±)-ektoina (7)..... | 57 |
| 4.2. Odvajanje enantiomera (±)-ektoina | 59 |
| 4.3. Ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina u hranjivom mediju | 68 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 73 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 74 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI..... | 75 |
| § 8. DODATAK..... | XV |
| 8.1. Spektri nuklearne magnetske rezonancije..... | xv |
| 8.2. IR spektri | xxviii |
| 8.3. Kromatogrami..... | xxxii |
| 8.3.1. Analiza reakcijske smjese i produkata sinteze spoja 1 plinskom kromatografijom | xxxii |
| 8.3.2. Odvajanje enantiomera (±)-ektoina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti | xxxv |
| 8.3.3. Ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina u hranjivom mediju | xlvi |
| § 9. ŽIVOTOPIS | LVIII |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA I ODVAJANJE ENANTIOMERA (\pm)-EKTOINA

Marcela Šišić

Optimiran je sintetski put pripreme (\pm)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilne kiseline, odnosno (\pm)-ektoina. Sintetski put započinje bromiranjem dihidrofuran-2(3*H*)-ona. Nastali 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-on prevodi se u nekoliko reakcijskih koraka u dihidroklorid 2,4-diaminobutanske kiseline. Dobivena 2,4-diaminobutanska kiselina kompleksira se s bakrovim(II) kationom kako bi se u reakciji s 4-nitrofenil-acetatom postigla selektivna acetilacija samo terminalne aminoskupine. Pripravljena 4-acetamido-2-aminobutanska kiselina u zadnjem sintetskom koraku termički se ciklizira u konačni spoj, (\pm)-ektoin. Odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina provedeno je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i postignuto je primjenom ChiralT kolone uz nekoliko različitih analitičkih metoda. Osim toga, ispitana je prisutnost (+)-ektoina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na Synergi polar – RP koloni u hranjivom mediju u kojem su rasli različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.* Utvrđena je prisutnost izlučenog (+)-ektoina u hranjivim medijima koji su sadržavali različite koncentracije natrijevog klorida.

(77 + LVII stranica, 17 slika, 19 shema, 10 tablica, 55 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: ektoin, odvajanje enantiomera, osmoprotektant.

Mentor: dr. sc. Marin Roje, v. zn. sur.
Nastavnik: prof. dr. sc. Ines Primožič

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
 2. prof. dr. sc. Nives Galić
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 23. rujna 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND ENANTIOSEPARATION OF (\pm)-ECTOINE

Marcela Šišić

The synthetic route of preparation of (\pm)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid or (\pm)-ectoine was optimized. The synthetic pathway begins with the bromination of dihydrofuran-2-(3*H*)-one. The resulting 3-bromodihydrofuran-2-(3*H*)-one is converted in several reaction steps to 2,4-diaminobutanoic acid dihydrochloride. The resulting 2,4-diaminobutanoic acid dihydrochloride is complexed with a copper(II) cation to achieve selective acetylation of only the terminal amino group by reaction with 4-nitrophenyl acetate. The prepared 4-acetamido-2-aminobutanoic acid in the last synthetic step is thermally cyclized to the final compound, (\pm)-ectoine. Separation of the (\pm)-ectoine enantiomers is achieved by high-performance liquid chromatography on a ChiralT column using several analytical methods. In addition, the presence of (+)-ectoine was determined by high-performance liquid chromatography on a Synergi polar - RP column in a fermentation broths inoculated with different strains of bacteria *Streptomyces sp.*, and different NaCl concentrations.

(77 + LVII pages, 17 figures, 10 tables, 19 schemes, 55 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: ectoine, enantioseparation, osmoprotectant

Mentor: Dr. Marin Roje, Senior Research Associate

Supervisor: Dr. Ines Primožič, Full Professor

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Full Professor
 2. Dr. Nives Galić, Full Professor
 3. Dr. Željka Soldin, Full Professor
- Substitute: Dr. Željka Car, Assistant Professor

Date of exam: September 23, 2021

§ 1. UVOD

Ektoin ((+)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilna kiselina) spada u skupinu spojeva koji se nazivaju osmoliti ili osmoprotektanti. To su male, nenabijene molekule čija prisutnost u stanici ne utječe negativno na metabolizam stanica, a imaju zaštitnu ulogu u uvjetima osmotskog stresa. Navedene molekule osim što djeluju osmoprotektivno na niz bakterija, arhea, protista i nekih mikroalgi, također stabiliziraju biomakromolekule tako što ih štite od denaturacije, topline, isušivanja i UV zračenja.¹ Zbog svog pozitivnog djelovanja na ljudske, životinjske i razne druge stanične kulture, ektoin se istaknuo kao zanimljiva molekula u znanstvenoj zajednici kao i u industrijskoj proizvodnji. Ektoin se trenutno proizvodi isključivo biotehnološkim procesima.¹⁻³ Poznato je svega nekoliko metoda pripreme ektoina primjenom organske sinteze.⁴

Prvi cilj ovog rada bila je optimiranje jednog od sintetskih putova pripreve (\pm)-ektoina koji su predložili Bazureau i suradnici.⁴ Početni spojevi potrebni za navedenu sintezu pripremljeni su prema sintetskom putu koji su predložili Talbot i suradnici.⁵ Optimizacija sintetskih postupaka bila je također predviđena u sklopu ovog rada. Nakon uspješne sinteze (\pm)-ektoina provedeno je odjeljivanje njegovih enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz optimizaciju postupka odjeljivanja, što je bio drugi cilj ovog rada. Treći i posljednji cilj ovog rada bilo je ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u hranjivim medijima u kojima su rasli različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.*, a koji su prethodno izolirani iz sedimenta Jadranskog mora. Pripremljena su 24 uzoraka hranjivih medija u kojima su bakterije različitih sojeva *Streptomyces sp.* rasle uz dodatak različite količine natrijevog klorida.

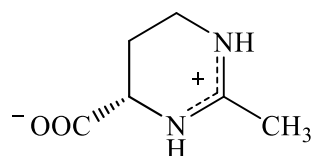
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Prirodni izvor, struktura i svojstva ektoina

2.1.1. Ektoin

Jedan od trenutačno najistraživanijih osmolita je upravo ektoin. Galinski i sur. otkrili su ektoin 1985. godine u izrazito halofilnoj bakteriji *Halorhodospira halophila*, izoliranoj iz Wadi El Natruna u Egiptu.⁶ Kasnije je ovaj osmoprotektant pronađen u širokom rasponu halofilnih i halotolerantnih bakterija. Ektoin se klasificira kao heterociklička aminokiselina ili kao djelomično hidrogenirani derivat pirimidina. U početku se ektoin smatrao izrazito rijetkim osmolitom. Međutim, poboljšanim postupcima detekcije pomoću HPLC-a i ¹³C NMR spektroskopije otkrivena je njegova visoka rasprostranjenost u mikroorganizmima kao odgovor na povećani salinitet. Rasprostranjenost ektoina uočena je u bakterijama,^{1,7,8} ograničenom broju arheja,⁹ nekoliko halofilnih protista¹⁰⁻¹² te čak i u mikroalgama.¹³

Ektoin ((*S*)-(+)-1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidinkarboksilna kiselina) ciklički je derivat aminokiseline koji se pri fiziološkom pH nalazi u obliku *zwitter*-iona (slika 1).



Ektoin

Slika 1. Struktura ektoina ((*S*)-(+)-1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidinkarboksilne kiseline).

Ektoin pri fiziološkom pH sadrži negativno nabijenu karboksilnu skupinu koja je vezana na heterociklički prsten koji sadržava delokalizani pozitivni naboj između dvaju atoma dušika. Dobiveno međudjelovanje hidrofилnih i hidrofobnih sila utječe na međudjelovanja voda-voda i voda-otopljena tvar, stoga ima snažne učinke na hidrataciju samog ektoina, vezanje iona i utjecaj na lokalnu strukturu vode. Simulacijama molekularne dinamike pokazano je da je ektoin snažno sredstvo za vezanje vode i da može oko sebe akumulirati sedam molekula vode na udaljenosti manjoj od 0,6 nm¹⁴ što je rezultat stvaranja velikog broja vodikovih veza na

specifičnim funkcijskim skupinama molekule. Pokazalo se da akumulacija molekula vode oko molekule ektoina nije narušena ni pri velikoj koncentraciji soli. Takva fizikalno-kemijska svojstva ektoina omogućavaju fiziološki odgovarajuću hidraciju citoplazme nakon akumulacije ektoina u odgovoru na osmotski stres što ima zaštitni utjecaj na stabilnost proteina i funkcionalnost fizioloških makromolekula.^{15,16}

2.1.2. Osmoprotektanti

Mikroorganizmi se susreću s raznim stresnim uvjetima u svojim prirodnim staništima, stoga je iznimno važna pravodobna reakcija i adaptacija na nepovoljne uvjete kako bi se osiguralo preživljavanje i rast. Među mnogobrojnim uvjetima koji mogu nepovoljno utjecati na mikroorganizme treba istaknuti osmotski stres. Osmotski stres kao posljedica povišenog ili sniženog saliniteta važan je čimbenik koji nepovoljno utječe na većinu mikroorganizama. Povećanje ili smanjenje osmotskog tlaka neizbježno utječe na protok vode kroz citoplazmatsku membranu, što uzrokuje isušivanje ili bubrenje stanica. Iako mikroorganizmi sadržavaju akvaporine, integralne membranske proteine koji čine specijalne transportne sustave koji omogućavaju ubrzane tokove vode difuzijom preko citoplazmatske membrane, ni jedan mikroorganizam ne može aktivno crpsti vodu s pomoću procesa koji troše energiju u stanicu ili iz nje kako bi se izjednačio osmotski tlak s vanjskim. Međutim, postoje mikroorganizmi koji ipak preživljavaju uvjete umjerenog ($0,6 \text{ mol dm}^{-3}$) do visokog saliniteta ($> 5 \text{ mol dm}^{-3}$), a oni se nazivaju halofilni mikroorganizmi.⁶ Navedeni mikroorganizmi aktivno utječu na smjer i količinu toka vode u stanicu ili iz nje dinamičkom modulacijom osmotskog potencijala citoplazme nakupljanjem ili izbacivanjem iona i organskih spojeva. Uglavnom se koriste jednom od dviju različitih strategija za regulaciju unutaršnjeg osmotskog tlaka, pri čemu se one temelje na akumulaciji anorganskih soli ili organskih osmolita kako bi se povećao osmotski potencijal citoplazme. Na taj način se sprječava istjecanje vode i potiče se dotok vode u uvjetima visokog saliniteta, čime se uravnotežuje vitalni osmotski gradijent preko citoplazmatske membrane u osmotski nepovoljnim okolišnim uvjetima. Osim toga, proteini halotolerantnih mikroorganizama imaju povećani broj nabijenih bočnih ogranaka i hidrofobnost, što je dodatni način adaptacije mikroorganizama na povećani salinitet.

Prva strategija kojom se halotolerantni organizmi brane od osmotskog stresa temelji se na povećanoj koncentraciji anorganskih soli, uglavnom KCl. Stanice tako izjednačavaju unutrašnji osmotski tlak s vanjskim. Zbog toga ne dolazi do izlivanja vode kad se stanice nalaze

u okolišu visokog saliniteta. U drugoj, raširenijoj strategiji mikroorganizmi u odgovoru na osmotski stres akumuliraju tvari koje se skupno nazivaju osmoliti ili osmoprotektanti. To su male molekule neutralnog naboja koje imaju nisku razinu toksičnosti pri visokim koncentracijama, a u stanici se akumuliraju unosom u stanicu i/ili *de novo* biosintezom. Osmoliti se mogu podijeliti u tri skupine:

- i. šećeri (trehaloza, saharoza) i polioli (glicerol, sorbitol, manitol);
- ii. aminokiseline (prolin, glutamin, alanin) i njihovi derivati (*N*-acetilirane diaminokiseline – *N*-acetilglutaminilglutamin amid, ektoini – ektoin i 5-hidroksiektoin);
- iii. betaini (glicin-betain) i slične molekule.

Ove molekule osiguravaju osmotsku ravnotežu bez ometanja važnih staničnih procesa i normalnog metabolizma. To je posljedica relativno malog učinka na citosolnu ionsku snagu zbog čega nije potrebna posebna prilagodba staničnih sustava. Najčešći osmoprotektanti u halofilnim mikroorganizmima su glicin-betain i ektoin, a vrsta osmoprotektanta koji se akumuliraju u halofilu određuje stupanj otpornosti na povišeni salinitet. Mikroorganizmi koji imaju nisku toleranciju na povišeni salinitet (do 0,7 mol dm⁻³ NaCl) uglavnom akumuliraju jednostavne šećere kao što je saharoza i/ili trehaloza, mikroorganizmi koji imaju umjerenu toleranciju na povišeni salinitet (do 1,8 mol dm⁻³ NaCl) akumuliraju glukozilglicerol, dok mikroorganizmi koji su otporni na visoki salinitet (do 3 mol dm⁻³ NaCl) uglavnom akumuliraju ektoin i betaine.¹⁷

Razina akumulacije osmoprotektanta određena je osmolarnošću okoliša i pronađena je linearna ovisnost između njih. Koncentracija osmolita u stanici može se kretati od milimolarne do 1 – 2 mol dm⁻³, a sama biosinteza i oslobađanje osmolita strogo su regulirani. Općenito, mikroorganizmi mogu akumulirati osmolite *de novo* sintezom ili preuzimanjem iz okoliša nespecifičnim transporterima.¹⁸ Postoje i specifični transporteri primjerice ektoina – transporter tipa BCCT EctM u *Marinococcus marinus*,¹⁹ ali većina osmoprotektanata unosi se u stanicu nespecifičnim transporterima. Važno je naglasiti da nakon hipoosmotskog šoka stanice mogu vrlo brzo vratiti osmotsku ravnotežu otpuštanjem osmolita putem mehanoosjetljivih kanala. Njihovo prolazno otvaranje omogućava brzo, nespecifično izbacivanje osmolita (i anorganskih iona i organskih spojeva) pri čemu se mehanoosjetljivi kanali zatvaraju kao rezultat smanjenja osmotskog potencijala citoplazme i osiguravanja smanjenja turgora. Stanica može time što se oslanja na otvaranje i zatvaranje mehanoosjetljivih kanala pravodobno odgovoriti na iznenada

nametnute osmotske neravnoteže.^{1,15,16} Otpuštene osmolite, bilo kroz mehanoosjetljive kanale ili prilikom razgradnje stanice, drugi mikroorganizmi mogu ponovno upotrijebiti ili kao osmoprotektante ili reciklirati kao hranjive tvari.²⁰

Osmoliti uz svoju zaštitnu ulogu u uvjetima osmotskog stresa mogu ublažiti i neke druge štetne utjecaje kao što su toplinski stres, smrzavanje, isušivanje, utjecaj radikalnih kisikovih vrsta, zračenja, uree i drugih denaturirajućih tvari koje utječu nepovoljno na integritet proteina, nukleinskih kiselina, biomembrana, pa čak i cijelih stanica. Ektoin i njegov derivat 5-hidroksi ektoin nisu iznimke, pa tako uz osmoprotektivno svojstvo posjeduju i druga zaštitna svojstva kao što je očuvanje funkcionalnosti proteina, zaštita DNA od oštećenja, stabilizacija lipidnih dvosloja, otpornost na oksidacijski stres, itd. U tablici 1. prikazani su neki od važnijih bioloških utjecala ektoina.

Tablica 1. Pregled pronađenih bioloških učinaka ektoina na biomakromolekule i cijele stanice tijekom zadnjih 30 godina.

Uporaba ektoina u zaštiti bioloških makromolekula i cijelih stanica

Stabilizacija enzima pri zagrijavanju, zaleđivanju i isušivanju²¹

Zaštita LDH od topline i smrzavanja²²

Zaštita od proteolitičkog cijepanja antitijela¹

Inhibicija stvaranja amiloida inzulina²³

Smanjenje apoptoze uzrokovane produktom gena MJD²⁴

Inhibicija agregacije i neurotoksičnosti beta-amiloida kod Alzheimerove bolesti²⁵

Stabilizacija *E. coli* tijekom sušenja i skladištenja²⁶

Osmoprotektivno svojstvo kod bakterija mliječne kiseline²⁷

Stabilizacija stanica duhana pod utjecajem hiperosmotskog stresa²⁸

Blokiranje oslobađanja ceramida izazvanog UVA zračenjem u ljudskim keratinocitima²⁹

Zaštita ljudskih eritrocitnih membrana¹

Zaštita mitohondrijske DNA u ljudskim dermalnim fibroblastima³⁰

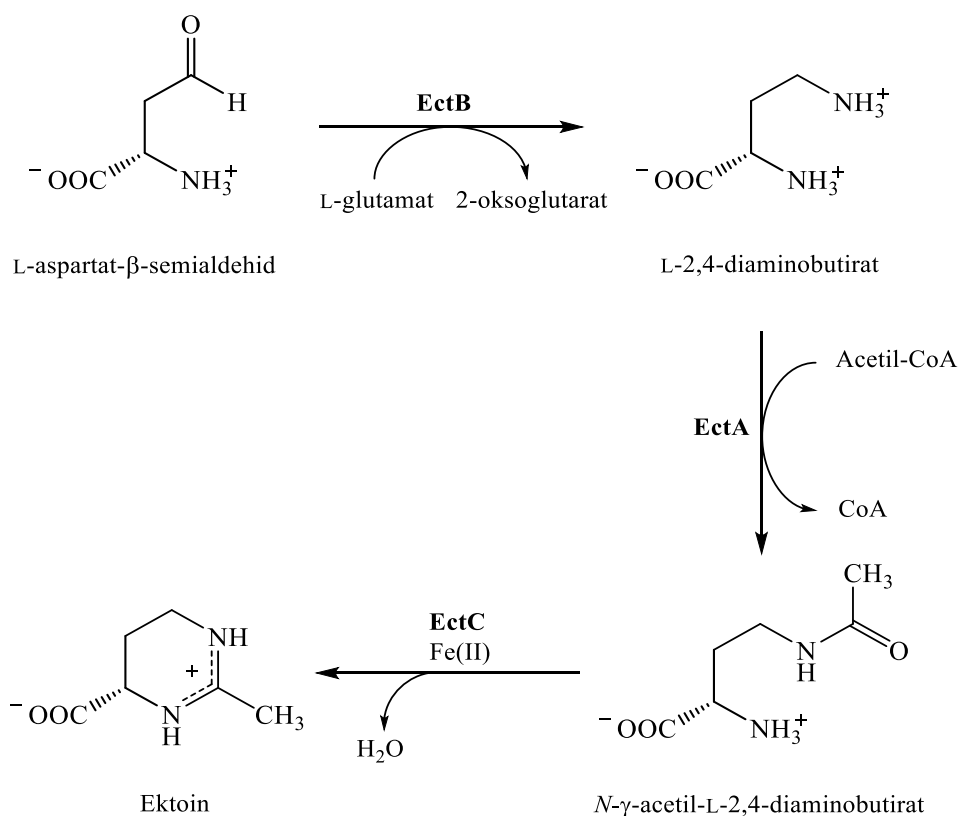
Galinski i Lippert još su 1992. godine pokazali da ektoin štiti aktivnost enzima u nepovoljnim uvjetima kao što su smrzavanje, odmrzavanje, zagrijavanje i sušenje smrzavanjem. To su dokazali na primjeru dvaju enzima: laktat-dehidrogenazi i fosfofruktokinazi.²¹ Nadalje, osim što ektoin pomaže u očuvanju aktivnosti enzima, isto tako štiti i proteine od proteolize pomoću tripsina i tripsinogena, pomaže renaturirati pogrešno smotane ili agregirane proteine i inhibira formaciju amiloida.¹

Osim učinka na aktivnost enzima i očuvanje strukture proteina pokazalo se da ektoin izaziva promjene i u strukturi DNA zbog čega mnoge restriksijske endonukleaze nisu mogle cijepati DNA. Ovo svojstvo osmolita može se iskoristiti tijekom PCR reakcije jer osmoliti mogu promijeniti konformaciju DNA tako što utječu na temperaturu mekšanja i sparivanje polimeraze s početnicom. Također je potvrđeno da ektoin povećava toplinsku stabilnost DNA polimeraze i smanjuje temperaturu mekšanja dvolančane DNA.¹

2.1.3. Biosintetski put sinteze ektoina

Cjeloviti biosintetski put ektoina prvi su razjasnili Peters i sur.³¹ analizom enzimskih aktivnosti prisutnih u ekstraktima bakterija bez stanica *Halorhodospira halochloris* i *Halomonas elongata*, a zatim su i Ono i sur.³² uvelike doprinijeli razjašnjavanju biokemije tog biosintetskog puta proučavanjem pročišćenih enzima iz bakterije *Halomonas elongata* koji kataliziraju reakcije u biosintezi ektoina.

Biosintetski put ektoina započinje iz prekursora L-aspartat- β -semialdehida, a u ovoj biosintezi ključna su tri enzima: L-2,4-diaminobutirat-2-oksoglutarat-transaminaza (EctB; EC 2.6.1.76), L-2,4-diaminobutirat-acetiltransferaza (EctA; EC 2.3.1.178) i ektoin-sintaza (EctC; EC 4.2.1.108). Shema 1. prikazuje specifični dio biosintetskog puta.



Shema 1. Biosintetski put ektoina iz L-aspartat-β-semialdehida. **Polumasnim tiskom slova istaknuti** su enzimi koji sudjeluju u ovom biosintetskom putu (EctB, EctA i EctC).

Kao što se može vidjeti na shemi 1., biosinteza ektoina započinje transaminacijom prekursora L-aspartat-β-semialdehida. Tu reakciju katalizira L-2,4-diaminobutirat-2-oksoglutarat-transaminaza (EctB). Kao i ostale transaminaze, ovaj je enzim ovisan o pirodoksal-5'-fosfatu (PLP), a za očuvanje aktivnosti i stabilnosti potrebni su mu K^+ ioni. EctB smješta L-aspartat-β-semialdehyd u svoje aktivno mjesto pa katalizira reverzibilni prijenos aminoskupine iz L-glutamata na aldehydnu skupinu supstrata i tako tvori L-2,4-diaminobutirat (DABA) i 2-oksoglutarat. EctB izoliran iz *Halomonas elongata* je homoheksamerni proteini koji ima optimalnu katalitičku aktivnost pri temperaturi od 25 °C, pH oko 8,6 i u prisutnosti 0,5 mol dm⁻³ KCl. Primijećena je i pojačana aktivnost ovog enzima dodatkom NaCl (0,05 do 0,5 mol dm⁻³) umjesto KCl. Drugi korak u biosintezi ektoina je N-acetilacija DABA s pomoću kosupstrata acetil-koenzima A pri čemu nastaju N-γ-acetil-2,4-diaminobutirat (N-γ-ADABA) i koenzim A. Tu reakciju katalizira L-2,4-diaminobutirat-acetiltransferaza (EctA). Ovaj enzim spada u veliku porodicu GCN5-srodnih N-acetiltransferaza koje kataliziraju prijenos acetilne skupine iz acetil-koenzima A na primarni amin pri čemu nastaje amidna veza. Djelomično pročišćen EctA iz

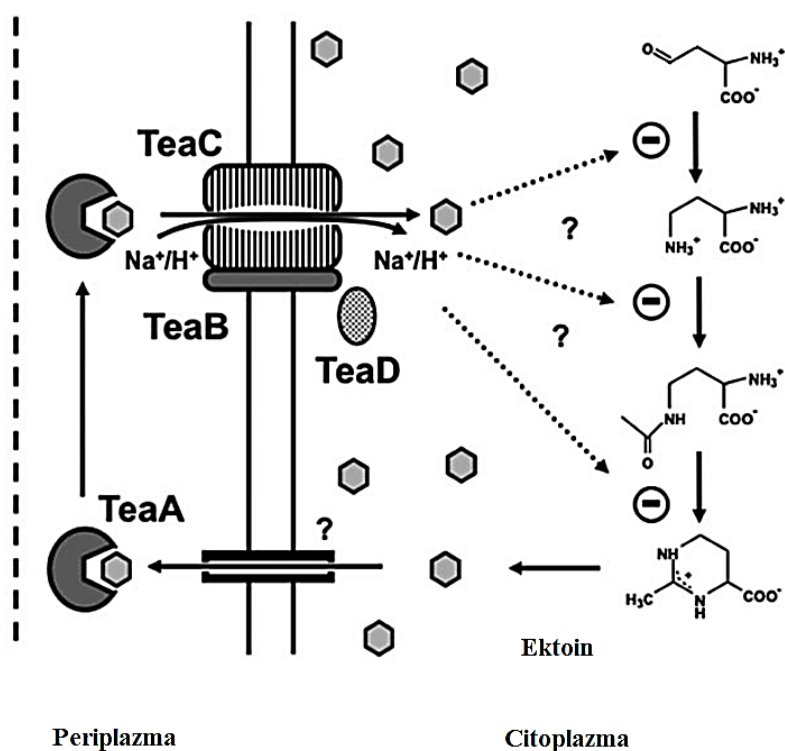
bakterije *Halomonas elongata* pokazao je optimalnu enzimsku aktivnost pri temperaturi od 20 °C, pH oko 8,2 i u prisutnosti 0,4 mol dm⁻³ NaCl. Provedenim eksperimentima određeno je da je EctA iz bakterije *Halomonas elongata* homoheksamerni protein molekularne mase oko 45 kDa.³² Posljednji korak u biosintezi ektoina, odnosno zatvaranje prstena kako bi nastao ektoin, katalizira enzim ektoin-sintaza (EctC). Ovaj enzim katalizira intramolekularnu kondenzaciju *N*- γ -ADABA eliminacijom vode iz karbonilne skupine u supstratu i stvaranjem intramolekularne iminoveze. Ektoin-sintaza izolirana iz bakterije *Halomonas elongata* pokazuje najveću enzimsku aktivnost pri temperaturi od 15 °C, pH 8,5 – 9,0 i u prisutnosti 0,5 mol dm⁻³ NaCl.³² Ovaj enzim pripada raznolikoj porodici enzima koji se nazivaju cupin proteini. Većina članova ove porodice, pa tako i EctC, enzimi su ovisni o metalu. Okarakterizirana su tri aminokiselinska ostatka (Glu57, Tyr85, His93) proteina EctC izoliranog iz *Sphingopyxis alaskensis* koji su evolucijski iznimno očuvani, a čiji bočni lanci strše u lumen bačvaste cijevi koja je aktivno mjesto ovog enzima.^{16,31–35}

Dokazano je da u uvjetima osmotskog stresa dolazi do biosinteze i posljedično akumulacije iznimno visokih unutarstaničnih koncentracija ektoina, pri čemu postoji linearna veza između vanjske osmolarnosti, odnosno saliniteta i količine sintetiziranog ektoina. U biosintezi ektoina upotrebljavaju se produkti ciklusa limunske kiseline, pa zbog povećane potrebe za njegovom sintezom dolazi do pokretanja anaplerotičkih puteva kako bi se nadomjestili međuprodukti potrebni za ciklus limunske kiseline. Zbog velike akumulacije ektoina u stanicama, a nakon smanjenja osmotskog stresa, dolazi do otpuštanja ektoina najčešće kroz mehanoosjetljive kanale ili sekrecijom, a nešto rjeđe razgradnjom mikrobnih stanica. S time na umu, nije iznenađujuće to što su ektoin i njegovi derivati pronađeni u raznim ekosustavima.^{16,36}

Transportni sustavi ektoina koji sudjeluju u ublažavanju osmotskog ili temperaturnog stresa okarakterizirani su kod različitih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, a ovisno o mikroorganizmu mogu se podijeliti u četiri skupine:

- i. ABC transporteri ovisni o proteinima koji upotrebljavaju ATP za poticanje translokacije supstrata preko citoplazmatske membrane;
- ii. transporteri ovisni o gradijentu protona;
- iii. transporteri betain-kolin-karnitin koji su potaknuti ili protonskim ili natrijevim gradijentom;
- iv. tripartitna ATP neovisna obitelj periplazmatskih transportera.

Često transporteri koji se rabe za uvoz ektoina pokazuju široku specifičnost supstrata, ali su isto tako poznati i namjenski uvoznici ektoina kao što je, primjerice, TeaABCD sustav iz *Halomonas elongata*, čiji je model prikazan na slici 2.³⁷ Zbog toga što se kod nekih tipova transporta događa i kotransport Na^+ ili H^+ iona, važni su i učinkoviti sustavi za izvoz kotransportiranih iona.¹⁶



Slika 2. Model koji opisuje staničnu regulaciju biosinteze ektoina pomoću transportera ABCD koji je reguliran osmotskim tlakom. Slika preuzeta i prilagođena iz H. Kunte, G. Lentzen, E. Galinski, *Curr. Biotechnol.* **3** (2014) 10–25.

Na slici 2. može se vidjeti da se ektoin koji se u citoplazmi akumulira biosintezom *de novo* transportira u periplazmu. Ektoin koji se nalazi u periplazmi može se ponovno unijeti u stanicu pomoću transportera ABCD, a taj unos regulira, odnosno inhibira *de novo* sintezu. Iz slike se vidi da nije još uvijek u potpunosti razjašnjen ovaj model, međutim on se temelji na činjenicama da bakterije kao što je *Halomonas elongata* otpuštaju ektoin u hranjivi medij u kojem raste ukoliko su specifični transporteri inaktivni i da unos osmoprotektanta u stanicu inhibira *de novo* sintezu.²

Za razliku od gena za biosintezu ektoina koji su uglavnom sadržani u evolucijski očuvanoj strukturi operona, operoni za katabolizam ektoina su raznovrsniji u pogledu poretka

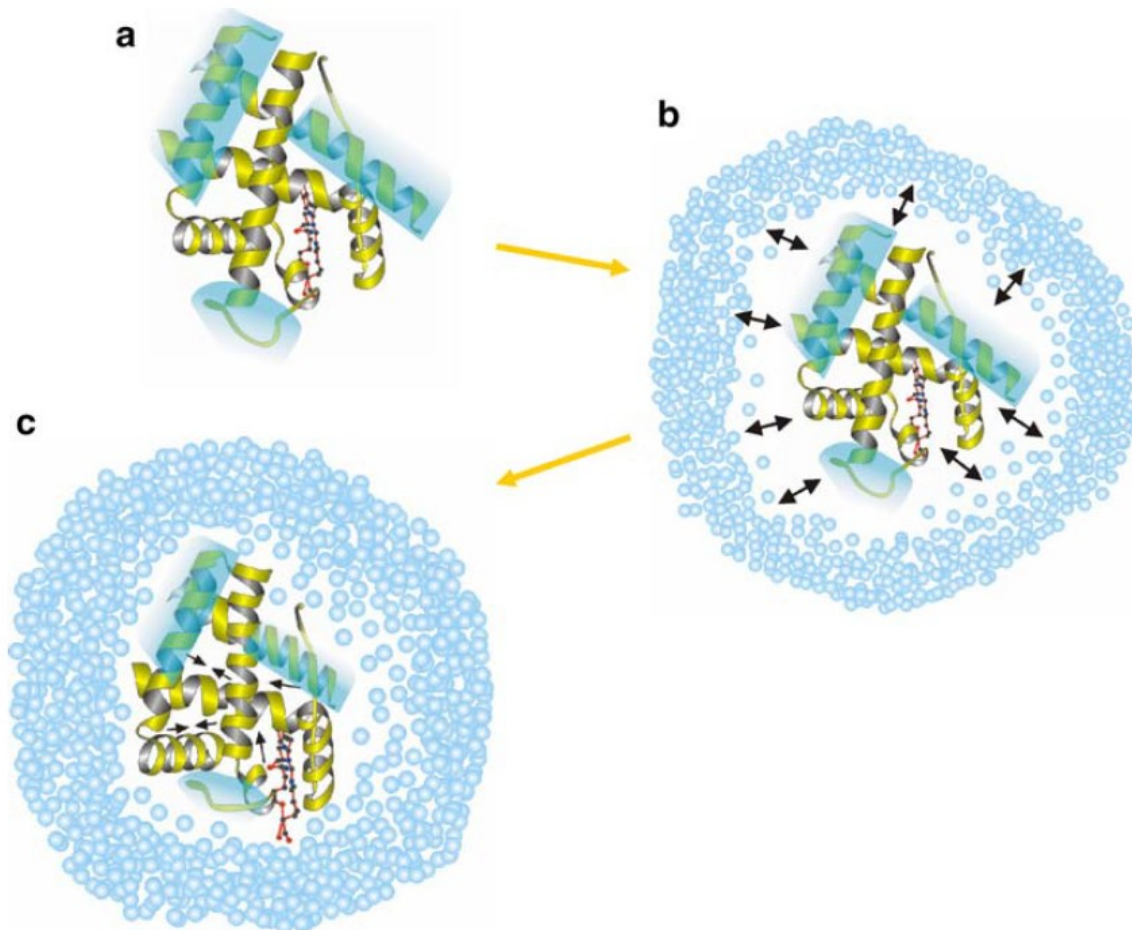
gena i u pogledu sadržaja. Međutim, zajednički nazivnik kataboličke genske skupine jest prisutnost bimodula EutD/EutE enzima, koji se smatra središnjim za iskorištavanje ektoina kao nutrijenta.²⁰ Prvi prijedlog za put razgradnje ektoina predložili su Schwibbert i sur.¹⁴ prema nacrtu sekvencioniranja genoma bakterije *Halomonas elongata*. Predložili su da katabolizam ektoina započinje enzimskim otvaranjem ektoinskog prstena s pomoću ektoin-hidrolaze (DoeA/EutD; EC 3.5.4.44) pri čemu nastaje *N*- α -ADABA kao ključni međuprodukt koji se dalje katabolizira s pomoću *N*- α -acetyl-L-2,4-diaminobutirat deacetilaze (DoeB/EutE; EC 3.5.1.125) u acetat i DABA. Enzim DoeD/Atf zatim reakcijom transaminacije pretvara DABA u L-aspartat- β -semialdehid i L-glutamat. Enzim DoeD/Atf pripada porodici acetyl-ornitin-aminotransferaza. Nastali L-aspartat- β -semialdehid oksidira se u L-aspartat s pomoću enzima DoeC/Ssd. Protein DoeC/Ssd enzim je srodan sukcinatnim semialdehid dehidrogenazama. Zanimljivo je da katabolizam ektoina prati biosintetski put ektoina unatrag uz različite enzime i različit međuprodukt u prvom koraku kataboličkog puta, odnosno zadnjem koraku anaboličkog puta. Nastajanje *N*- α -ADABA u katabolizmu u odnosu na nastajanje *N*- γ -ADABA u anabolizmu mogao bi biti elegantni način regulacije koji sprječava uzaludnu proizvodnju ili potrošnju ektoina. Važno je spomenuti i da su biosintetski geni ektoina osmotski inducirani, dok su oni za razgradnju supstratno inducibilni kad se ektoin doda u medij za rast.^{14,20}

2.1.4. Mehanizam djelovanja ektoina

Mikroorganizmi rabe osmolite kao sredstva za zaštitu od osmotskog stresa. Međutim, mehanizam djelovanje ektoina kao i ostalih osmolita nije još uvijek u potpunosti razjašnjen. Postoji nekoliko hipoteza koje objašnjavaju biofizička načela na kojima se temelji njihovo djelovanje. Model preferencijalne isključenosti (engl. *preferential exclusion model*) najprihvaćenija je hipoteza. Ovaj model predlaže da se mehanizam osmolita temelji na tome da se oni ne nalaze u neposrednoj blizini površine proteina, nego da se odmiču od njihove površine. Izuzimanje osmolita iz neposredne blizine površine proteina dovodi do preferirane hidratacije proteina. Zbog toga je protein prisiljen zauzeti manji volumen kako bi minimizirao izloženost površine proteina čime se potiče njegova nativna konformacija. Budući da osmoliti ne stupaju u izravnu interakciju s proteinima, katalitička aktivnost enzima uglavnom je neometana. Opisani mehanizam djelovanja osmolita može se vidjeti na slici 3.^{1,7,10,29}

Simulacija molekularne dinamike izvedena za model mješavine ektoina i vode s pomoću inhibitora kimotripsina 2 kao ciljnog proteina u skladu je s idejom da ektoin ne stupa

u interakciju s površinom proteina niti mijenja strukturu hidratacije. Umjesto toga, mijenja se svojstvo otapala, tj. vode, što dovodi do velikog usporavanja difuzije vode i time stabilizacije proteinske konformacije.³⁹



Slika 3. Mehanizam djelovanja osmolita. Tercijarna struktura hidratiziranog globularnog proteina u vodenoj otopini prikazana je na dijelu slike **a**. Ta tercijska struktura stabilizirana je u prisutnosti osmolita (**b**) koji grade hidratacijske klastere koji su preferirano isključeni iz hidratacijske ljuske proteina. To dovodi do kompaktnije tercijske strukture sa smanjenom površinom, što se vidi na dijelu slike **c**. Iz ovih prikaza vidi se da otopljeni osmoliti ne stupaju u direktnu interakciju s proteinom, nego je njihov stabilizacijski učinak posljedica modifikacije svojstava otapala (vode). Slika preuzeta iz G. Lentzen, T. Schwarz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72** (2006) 623–634.

2.1.5. Komercijalna upotreba ektoina

Nadovezujući se na prethodna poglavlja u kojima su istaknute biološke uloge ektoina na biološke makromolekule, važno je spomenuti da su ta svojstva ektoina našla primjenu ponajviše u kozmetičkoj industriji. Zbog svojstva ektoina da jako dobro veže vodu istražena je njegova uporaba u raznim kozmetičkim pripravcima te se pokazao kao koristan agens za sprječavanje dehidracije u suhoj atopijskoj koži, oporavku vitalnosti kože i sprječavanju starenja kože.⁴⁰

UV zračenje kojem smo izloženi tijekom izlaganja Sunčevoj svjetlosti može oštetiti ljudsku kožu te igra ključnu ulogu u preranom i ubrzanom starenju kože. Zbog toga se stalno pokušava pronaći formulacija kozmetičkih pripravaka koji bi štitili kožu od štetnih UV zračenja, a primarni zadatak tih istraživanja pronalazak je novih molekula koje pokazuju upravo ta svojstva. Dokazano je da ektoin pruža zaštitu od neželjenih učinaka UVA zračenja na stanice ljudske kože *in vitro* smanjenjem protuupalne ekspresije gena poput ICAM-1 i ekspresijom Hsp70 (engl. *Heat shock protein 70*) koji štite stanice od toplinskog stresa i otrovnih kemikalija.^{30,41} Zaštita kože od oštećenja nastalih izlaganjem UV, a ponajviše UVA zračenju još je jedno od svojstava ektoina zbog kojih se sve češće nalazi na popisu sastojaka kozmetičkih pripravaka namijenjenih primjeni na koži.

Stabilizacija membrana efektom hidratacije površine, stabilizacije lipidnih dvoslojeva i smanjenje upale bila su privlačna svojstva zbog kojih je ispitana aktivnost ektoina u svrhu liječenja alergijskog rinitisa. Kao dobru alternativu za farmakološke lijekove ispitani su sprej za nos i kapi za oči koje su sadržavale ektoin pri čemu je dokazana dobra djelotvornost i neškodljivost tih pripravaka.⁴²

2.2. Biotehnološka priprava ektoina

Nakon što je otkriven širok spektar biološke aktivnosti ektoina, porasla je i potražnja za ektoinom što je značilo da je bilo potrebno razviti oblik proizvodnje ektoina koji bi osigurao industrijsku količinu ektoina. Prvi razvijeni biotehnološki proces proizvodnje ektoina na industrijskoj razini naziva se *bacterial milking*, a u čijem se središtu nalazi halotolerantna Gram-negativna bakterija *Halomonas elongata*. Optimalni uvjeti pri kojima raste ova bakterija koncentracije su soli između 3 % i 6 % (w/v), ali pokazano je da može rasti u mediju koji sadržava i više od 20 % (w/v) soli. U ovom biotehnološkom procesu koristi se sojem bakterije koji proizvodi visoku količinu ektoina u uvjetima visokog saliniteta i njegovo nespecifično oslobađanje iz stanica kroz prolazno otvaranje mehanoosjetljivih kanala nakon pada osmotskog tlaka. Zbog zaštitne uloge mehanoosjetljivih kanala koji sprječavaju pucanje stanica biomasa dobivena nakon uklanjanja ektoina može se ponovno iskoristiti u drugom ciklusu biosinteze ektoina. Sauer i Galinski predložili su metodu biotehnološke proizvodnje ektoina koja je uključivala aerobnu kulturu bakterije *Halomonas elongata* pri 25 °C, u hranjivom mediju s 15 % NaCl (w/v, 2,57 mol dm⁻³) u *fed-batch* reaktoru. Koristili su se glukozom kao izvorom ugljika, a amonijevim kloridom kao izvorom dušika. Nakon što je dosegnuta visoka gustoća stanica u bioreaktoru (do 48 g_{cdw} L⁻¹), upotrijebljena je metoda ekstrakcije koja se naziva *bacterial milking* primjenom hipoosmotskog šoka. Hipoosmotski uvjeti potiču stanicu na otvaranje mehanoosjetljivih kanala i nespecifično otpuštanje ektoina i drugih osmolita u medij. Nakon uklanjanja biomase hranjivi medij koji sadržava ektoin i razne druge topljive tvari koje su bile sadržane u stanici podliježe se raznim tehnikama pročišćavanja kao što su dijaliza, filtracija, kromatografija itd. Razvojem ove metode za biotehnološku proizvodnju ektoina s pomoću bakterije *Halomonas elongata* uvedena je uporaba soja bakterije *Halomonas elongata* kojem nedostaje TeaABC sustav, odnosno TRAP transporter koji je specifičan za ektoin te koji može poslužiti za recikliranje ektoina. Uporabom spomenutih mutanata postiže se kontinuirana akumulacija ektoina u mediju za rast.^{3,16}

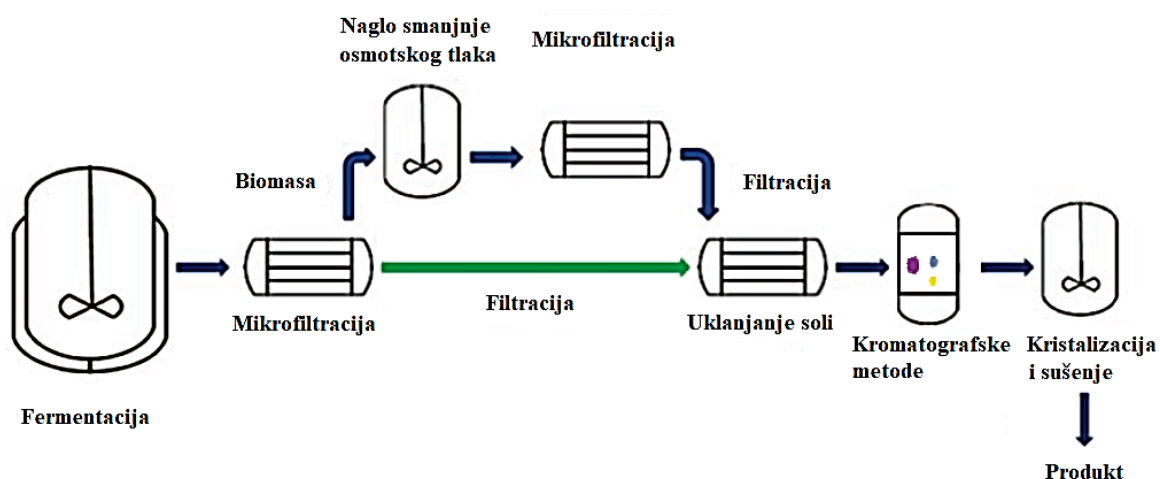
Općenito, postoje dva biološka sustava prikladna za proizvodnju ektoina: prirodni (halofilni) proizvođači kao što su bakterija *Halomonas elongata* i nehalofilni mikroorganizmi koji nose heterologne gene za sintezu ektoina. Međutim, u većini slučajeva pokazalo se da halofilni organizmi akumuliraju ektoin u većim unutarstaničnim koncentracijama. Ovisno o odabiru sustava za biosintezu ektoina potrebno je odabrati odgovarajuću konfiguraciju reaktora. Kad stanice rastu u uvjetima visokog saliniteta, stalno moraju sintetizirati ektoin. Međutim,

najveće koncentracije ektoina postižu se kad se dosegne stacionarna faza kulture. Zbog toga je za visoku proizvodnju ektoina važno postići visoku gustoću stanica u fermentatoru. Maksimalna gustoća stanica koja se može postići s danim mikroorganizmom jako ovisi o uvjetima hranjivog medija u kojem raste, a to uključuje pH, količinu kisika, sastav medija i temperaturu.

Dvije su najčešće izvedbe reaktora za bioprosesnu proizvodnju ektoina – *fed-batch* i *batch* reaktor. Prednost *fed-batch* reaktora je postizanje veće maksimalne količine biomase u usporedbi s *batch* reaktorima zbog toga što se povremeno dodaju komponente potrebne za rast mikroorganizama. Zbog toga se u industrijskoj proizvodnji najčešće upotrebljava *fed-batch* reaktor, a zatim se akumulirani ektoin u stanicama ekstrahira s pomoću metode *bacterial milking*. Glavna prednost ove metode za ekstrakciju je što omogućava ekstrakciju ektoina u više ciklusa bez znatnog gubitka vitalnosti stanica. Međutim, navedeni je proces primjenjiv samo na Gram-negativnim mikroorganizmima. Gram-pozitivne bakterije bolje podnose promjene u osmotskom tlaku zbog rigidnije stanične stijenke, a posljedica toga je da ne izlučuju unutarstanične akumulirane osmolite u hipoosmotskim uvjetima. Zbog toga je u slučaju Gram-pozitivnih bakterija potrebno ukloniti sol iz medija, a zatim ekstrahirati ektoin organskim otapalima. Kako bi se izbjegla uporaba organskih otapala za ekstrakciju, opisana je metoda toplinske permeabilizacije u kojoj se koristi samo destiliranom vodom za izmjenu medija. Glavni nedostatak uporabe Gram-pozitivnih bakterija jest metoda ekstrakcije ektoina koja onemogućava recikliranje stanica što uzrokuje smanjen prinos procesa, ali prednost je uklanjanje soli prije procesa pročišćavanja ektoina što olakšava daljnje čišćenje. Kod *bacterial milkinga* potrebno je održavati minimalnu količinu soli u hranjivom mediju pri ekstrakciji zbog očuvanja vitalnosti stanice što posljedično komplicira izolaciju ektoina iz hranjivog medija. Glavni problem u industrijskoj proizvodnji koja upotrebljava *fed-batch* reaktore za postizanje kultura visoke gustoće i *bacterial milkinga* kao metodu ekstrakcije velika su slanost potrebna u većini procesa opisanih dosad koja uzrokuje koroziju i uništavanje opreme koja služi za uzgoj i procese pročišćavanja. Pri uporabi rekombinantnih nehalofilnih bakterija (npr. *Escherichia coli*) postupci pročišćavanja pojednostavnjeni su jer ovi sojevi ne zahtijevaju sol u mediju rasta. Međutim, takvi su mikroorganizmi pokazali nižu unutarstaničnu akumulaciju ektoina u odnosu na prirodne halofilne mikroorganizme.¹

Osim već spomenute metode koja se naziva *bacterial milking* razvijena je još jedna metoda za izolaciju ektoina koja omogućava njegovu nešto jednostavniju izolaciju, a koja se

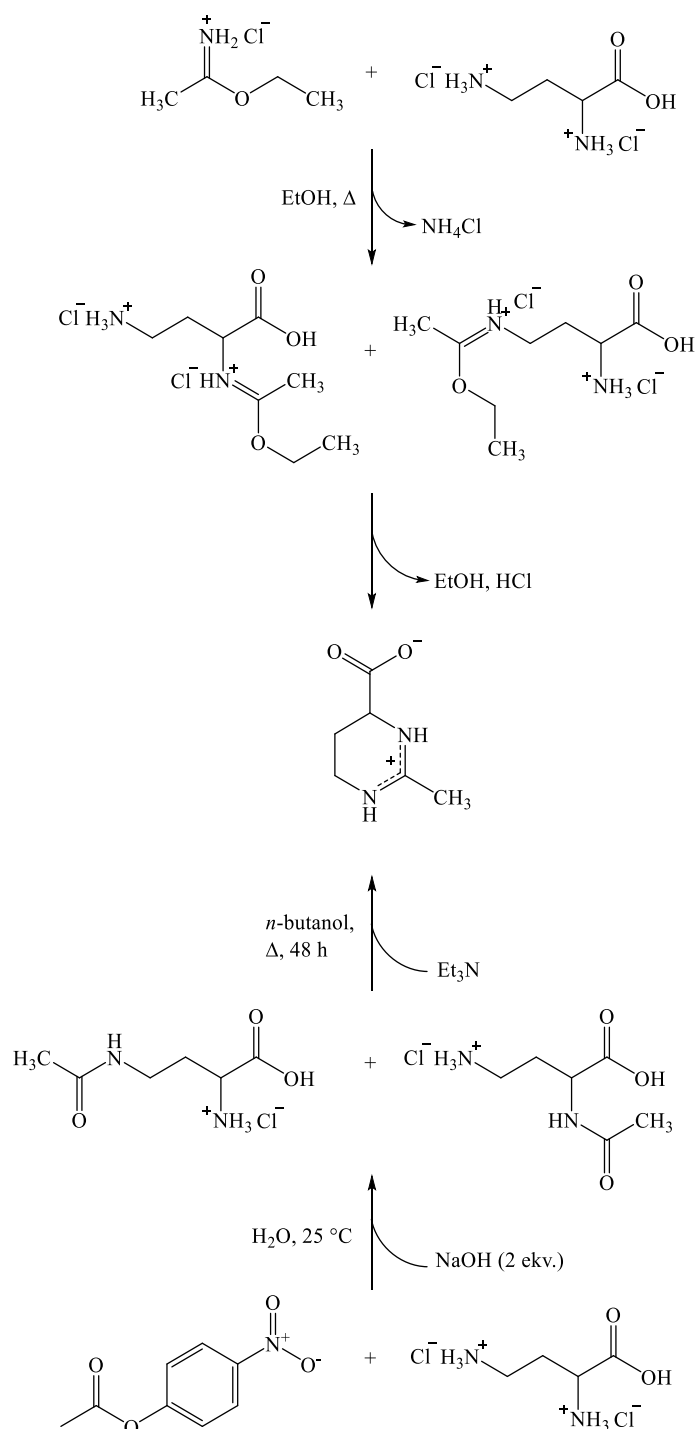
naziva „leaky“ mutant metoda. U ovoj metodi koristi se mutant bakterije *Halomonas elongata* koji sekrecijom oslobađa ektoin u hranjivi medij. Ovom soju bakterije *Halomonas elongata* mutiran je ABCD transporter čija inaktivnost uzrokuje sekreciju ektoina u hranjivi medij. Ova metoda ima nekoliko prednosti prilikom industrijske proizvodnje na velikoj skali u usporedbi s metodom *bacterial milking*. Osim jednostavnije izolacije i pročišćavanja ektoina (slika 4.), ovom metodom omogućava se veća proizvodnja ektoina zbog toga što se ektoin ne akumulira u stanici nego se kontinuirano ispušta zbog čega stanica kontinuirano sintetizira ektoin. Takva kontinuirana sinteza ektoina u stanici koja ima aktivni transporter ABCD nije moguća zbog toga što ektoin inhibitorno regulira *de novo* biosintezu. Uz to, količina soli koja se koristi tijekom metode „leaky“ mutant znatno je manja od količine soli potrebne u metodi *bacterial milking* zbog toga što je potrebna samo minimalna količina koja će inicirati biosintezu ektoina.



Slika 4. Prikaz dvije metode biotehnološke proizvodnje ektoina. U metodi *bacterial milking* (plave strelice) nakon prve mikrofiltracije potrebno je naglo smanjiti osmotski tlak razrjeđivanjem vodom kako bi bakterijske stanice ispustile sintetizirani ektoin u hranjivi medij nakon čega slijedi druga mikrofiltracija. U metodi „leaky“ mutant (zelena strelica) nije potrebno naglo snižavanje osmotskog tlaka zbog kontinuiranog ispuštanja ektoina u hranjivi medij. Nakon prve mikrofiltracije u metodi „leaky“ mutant proces izolacije i pročišćavanja je jednak za obje metode, a uključuje uklanjanje soli elektrodijalizom, korištenje ionsko-izmjenjivačkih kromatografskih smola za uklanjanje nečistoća i na kraju kristalizaciju i sušenje. Slika preuzeta i prilagođena iz H. Kunte, G. Lentzen, E. Galinski, *Curr. Biotechnol.* **3** (2014) 10–25.

2.3. Sintetska priprava ektoina

U literaturi postoji svega nekoliko načina priprave ektoina sintetskim putem zato što je glavni put proizvodnje onaj biotehnoški, na čijem se razvoju ponajviše i radilo. Bazureau i sur.⁴ predložili su dva sintetska puta priprave ektoina (shema 2.).



Shema 2. Dva predložena sintetska puta dobivanja (\pm)-ektoina.⁴

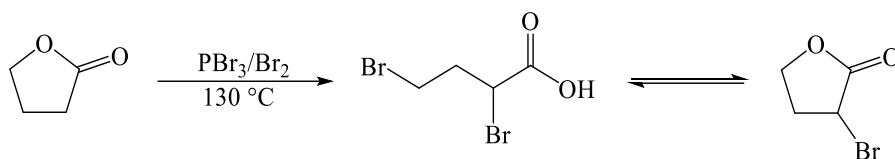
Oba sintetska puta temelje se na ciklizaciji derivata 2,4-diaminobutanske kiseline. U jednom sintetskom putu dolazi do termičke ciklizacije 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline ili 2-acetamido-4-aminobutanske kiseline. Navedene *N*-acetilirani hidrokloridi 2,4-diaminobutanske kiseline nastaju u reakciji dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline i 4-nitrofenil-acetata u baznim uvjetima. Dok u drugom sintetskom putu dolazi do ciklizacije 2-amino-4-((1-etoksietiliden)amino)butanske kiseline ili 4-amino-2-((1-etoksietiliden)amino)butanske kiseline koje se mogu pripremiti reakcijom dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline i etil-etanimidata.

Bazureau i sur.⁴ detaljnije su opisali sintetski put koji uključuje ciklizaciju *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline. Nakon što se pripreme dva izomera, α - i γ -, *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline prema opisanom sintetskom putu, isti se prevode u ektoin termičkom ciklizacijom. Reakcijski uvjeti uključuju refluksiranje *N*-acetiliranih 2,4-diaminobutanskih kiselina u *n*-butanolu uz dva ekvivalenta trietilamina tijekom 48 sati. Nakon 48 sati, dobivena je smjesa ektoina (70 %) i reaktanta (30 %). Ektoin je pročišćen uparavanjem *n*-butanola na rotacijskom uparivaču i kromatografijom te je dobiveno iskorištenje od 50 %.

2.3.1. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline

Polazni spoj u oba sintetska puta (shema 2.) čini dihidroklorid 2,4-diaminobutanske kiseline. Ova kiselina spada u skupinu α -aminokiselina koja sadržava dvije slobodne aminoskupine. Mogući sintetski putovi pripreme ove kiseline mogu se podijeliti na tri općenita tipa reakcija: sinteza koja uključuje ftalimido-spojeve, degradacija aminokiselina s pomoću Hoffmannove eliminacije, Curtiusove pregradnje ili Schmidtove reakcije te na kraju reakcijom etil-akrilata i diazometana. Međutim, kao najpovoljniji načini sinteze izdvojeni su oni sintetski putovi koji polaze od dihidrofurana-2(3*H*)-ona koji nakon reakcija s kalijevim ftalimidom u konačnici daje željenu α -aminokiselinu.^{5,43}

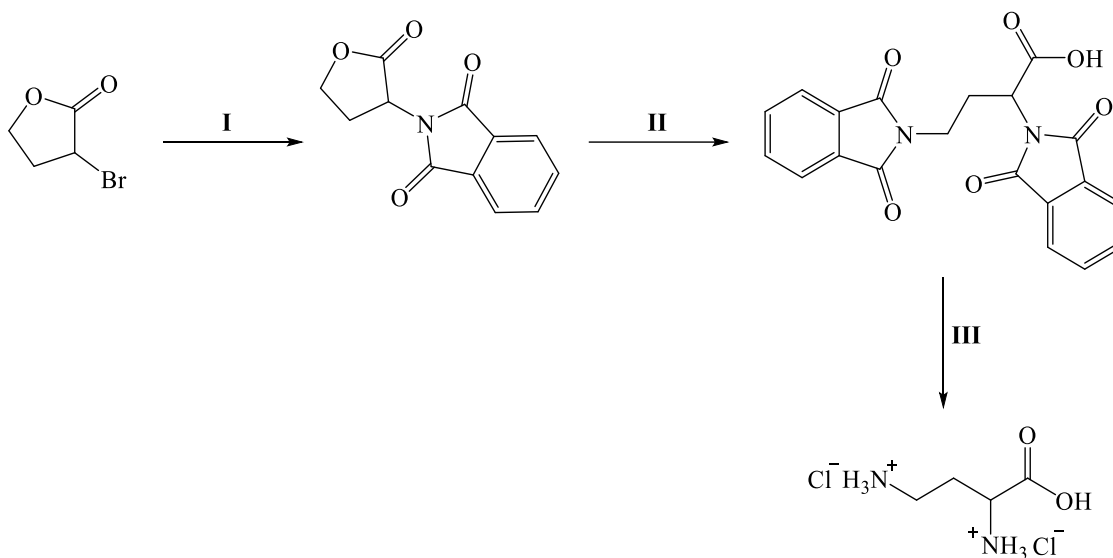
Jedan od sintetskih putova dobivanja dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline predložili su Talbot i suradnici⁵, a uključuje tri reakcije. Prva reakcija polazi od komercijalno dostupnog 3-bromdihidrofurana-2(3*H*)-ona koji se također može pripremiti i prema postupku kojeg su opisali Livak i suradnici.⁴⁴ Reakcija dobivanja 3-bromdihidrofurana-2(3*H*)-ona prikazana je na shemi 3.



Shema 3. Priprava 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona.

3-Bromdihidrofuran-2(3*H*)-on priprema se bromiranjem dihidrofuran-2(3*H*)-ona, a kao međuprodukt nastaje 2,4-dibrombutanska kiselina. Dobivena 2,4-dibrombutanska kiselina destilacijom pri sniženom tlaku ili u prisutnosti baze otpušta HBr pri čemu nastaje 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-on. Livak i suradnici upotrebljavali su destilaciju pri sniženom tlaku koji je iznosio 7 mmHg, a željeni spoj destilirao je pri temperaturi 120 – 140 °C. Dobiveni sirovi materijal destilirali su još jednom pri tlaku od 8 mmHg, a temperatura pri kojoj je željeni produkt destilirao bila je 130 – 131 °C. Reakcija je u konačnici dala iskorištenje od 82 %.

3-Bromdihidrofuran-2(3*H*)-on Talbot i suradnici⁵ preveli su u dihidroklorid 2,4-diaminobutanske kiseline kroz tri koraka (shema 4.).

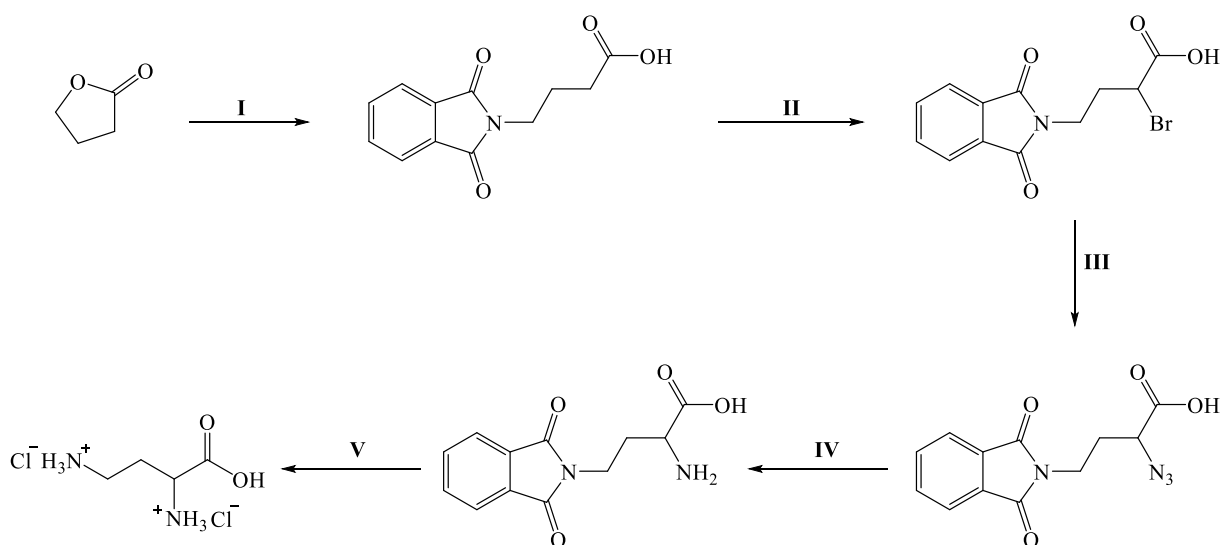


Shema 4. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline iz 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona prema Talbotu i suradnicima.⁵ Reakcijski uvjeti: **I** – kalijev ftalimid (1 ekvivalent), DMF, 100 °C, 12 sati; **II** – kalijev ftalimid (1 ekvivalent), DMF, refluks, 7 sati; **III** – HCl ($v : v = 1 : 1$), refluks, 12 sati.

U prvoj reakciji dolazi do supstitucije broma s ftalimidom pri čemu nastaje 2-(2-(2-oksotetrahidrofuran-3-il)izoindolin-1,3-dion. Reakcijska smjesa koja sadržava 3-

bromdihidrofuran-2(3*H*)-on i kalijev ftalimid u DMF-u zagrijava se uz miješanje na 100 °C. Nakon 12 sati u reakcijsku se smjesu dodaje voda kako bi netopljivi 2-(2-oksotetrahidrofuran-3-il)izoindolin-1,3-dion istaložio. Druga reakcija uključuje otvaranje laktonskog prstena 2-(2-oksotetrahidrofuran-3-il)izoindolin-1,3-diona drugom molekulom ftalimida pri čemu nastaje 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanska kiselina. U toj se reakciji ponovno upotrebljava DMF kao otapalo te se reakcijska smjesa grije uz refluks 7 sati. Nakon završetka reakcije, u reakcijsku smjesu doda se ledena octena kiselina te voda kako bi ponovno netopljiva sol 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanske kiseline istaložila. Zadnji korak uključuje hidrolizu 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanske kiseline pri čemu kao nusprodukt nastaju dva ekvivalenta ftalne kiseline. Dobivena 2,4-diaminobutanska kiselina u obliku je dihidroklorida. Tako se jednostavno uvode dvije aminoskupine i dobiva se željeni dihidroklorid 2,4-diaminobutanske kiseline uz iskorištenja reakcija od 86 %, 88 % i 79 %.

Drugi način pripreve dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline predložio je Zaoral u svom radu, a opisani sintetski put prikazan je na shemi 5.⁴³



Shema 5. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline prema Zaoralu.⁴³ Reakcijski uvjeti: **I** – kalijev ftalimid (1 ekvivalent), 180 – 200 °C, 45 minuta; **II** – Br₂/PBr₃ (procedura koju su opisali Gabriel i Colman); **III** – NaN₃, EtOH, refluks, 5 sati; **IV** – katalitička hidrogenacija ili redukcija jodovodičnom kiselinom; **V** – konc. HCl, refluks, 5 sati.

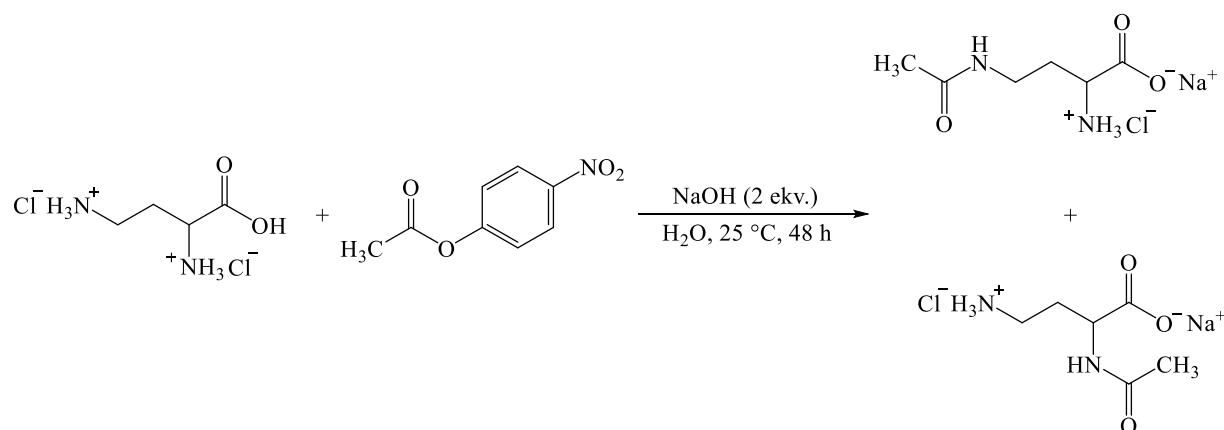
Sinteza započinje od komercijalno dostupnog dihidrofuran-2(3*H*)-ona koji u reakciji s kalijevim ftalimidom daje 4-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butansku kiselinu. Navedena kiselina

bromira se na položaju dva, pri čemu nastaje 2-brom-4-(1,3-dioksoizindolin-2-il)butanska kiselina. U sljedećem se koraku uvedeni brom na položaju dva supstituira s azidom pri čemu nastaje 2-azido-4-(1,3-dioksoizindolin-2-il)butanska kiselina. Uvedena azidoskupina prevodi se u slobodnu aminoskupinu katalitičkom hidrogenacijom ili redukcijom jodovodičnom kiselinom. Zadnji korak uključuje hidrolizu 2-amino-4-(1,3-dioksoizindolin-2-il)butanske kiseline u kojem kao produkt nastaje dihidroklorid 2,4-diaminobutanske kiseline, a kao nusprodukt nastaje ftalna kiselina.

2.3.2. Priprava *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline

Sljedeći korak u pripravi ektoina je *N*-acetilacija 2,4-diaminobutanske kiseline. Budući da 2,4-diaminobutanska kiselina sadržava dvije slobodne aminoskupine koje imaju gotovo ista kemijska svojstva važno je postići selektivnu acetilaciju samo jedne aminoskupine. Međutim, za svrhu dobivanja ektoina nije važno acetilira li se aminoskupina na položaju dva ili četiri jer termičkom ciklizacijom i 2-acetamido-4-aminobutanske kiseline i 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline nastaje ektoin kao produkt.

Uvođenje acetilne skupine na aminoskupinu 2,4-diaminobutanske kiseline moguće je provesti s pomoću 4-nitrofenil-acetata (shema 6.).



Shema 6. Uvođenje acetilne skupine na aminoskupinu 2,4-diaminobutanske kiseline.

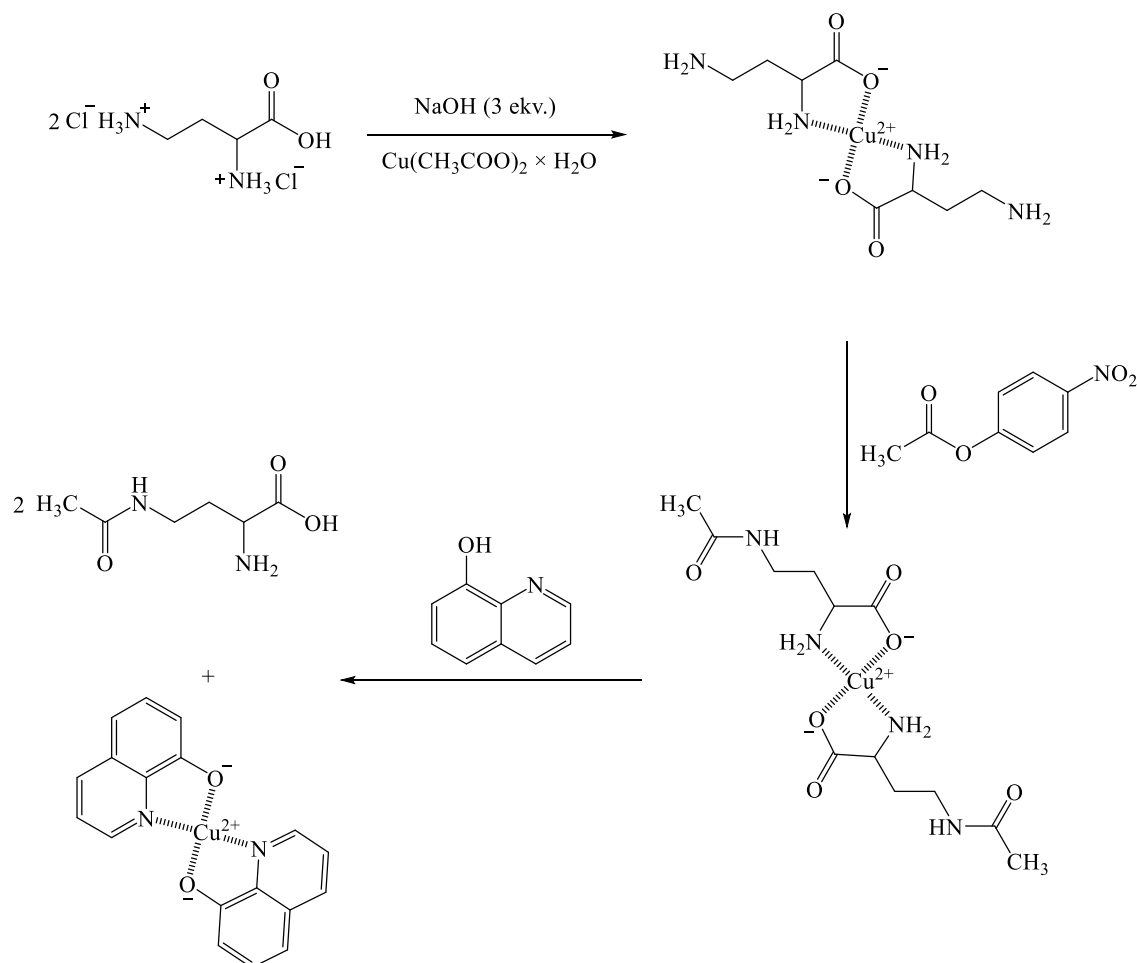
Dodatkom dva ekvivalenta NaOH prvo dolazi do deprotoniranja karboksilne skupine i jedne od aminoskupina prisutnih u molekuli. Time bi se trebali postići uvjeti u kojima će se samo jedna aminoskupina acetilirati. Slobodna aminoskupina dobar je nukleofil koji napada karbonilni ugljik 4-nitrofenil-acetata pri čemu nastaje tetraedarski međuprodukt. Izlaskom 4-nitrofenola

nastaju željeni produkti, odnosno dva strukturna izomera *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline. Dakle, ovisno o tome koja se aminoskupina deprotonira, odnosno koja aminoskupina nukleofilno napadne karbonilni ugljik 4-nitrofenil-acetata, nastaje ili 2-acetamido-4-aminobutanska kiselina ili 4-acetamido-2-aminobutanska kiselina.

Kao reagens za acetiliranje upotrebljava se već spomenuti 4-nitrofenil-acetat koji se može pripremiti reakcijom 4-nitrofenola i acetanhidrida. Zagrijavanjem uz refluks tijekom 12 sati dobiva se kvantitativna količina 4-nitrofenil-acetata.⁴ Ovaj reagens služi za selektivnu acetilaciju aminoskupine na položaju 2, odnosno 4. Leclerc i Benoiton opisali su ovisnost selektivne acetilacije o pH i o ekvivalentima 4-nitrofenil-acetata.⁴⁵ Dobiveni rezultati pokazuju da u slučaju 2,4-diaminobutanske kiseline pri pH = 11 nastaje 98,8 % 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline u odnosu na 2-acetamido-4-aminobutansku kiselinu. U odsutnosti baze, acetilacija 2,4-diaminobutanske kiseline 4-nitrofenil-acetatom nastaje 14 % 2-acetamido-4-aminobutanske kiseline u odnosu na 4-acetamido-2-aminobutansku kiselinu. Na primjeru lizina pokazano je da dodatak suviška 4-nitrofenil-acetata ne utječe na omjer nastalih strukturnih izomera *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline.⁴⁵

Međutim, na opisani način može doći do nastanka određene količine 2,4-diacetamidobutanske kiseline koja je u sljedećem koraku pripreve ektoina nereaktivna, a koju je zbog prirode ovih spojeva teško ukloniti iz reakcijske smjese. Reakcijska smjesa tako se po završetku reakcije sastoji od neizreagiralog dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline, oba strukturna izomera *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline i 2,4-diacetamidobutanske kiseline. Sve navedene vrste ionskog su karaktera, pa se kao najbolje rješenje njihove separacije i pročišćavanja predlaže ionsko-izmjenjivačka kromatografija.

Povoljniji način pripreve monoacetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline uključuje kompleksaciju 2,4-diaminobutanske kiseline s bakrovim(II) ionima te acetilaciju nastalog kompleksa 4-nitrofenil-acetatom (shema 7.).⁴⁶⁻⁴⁸



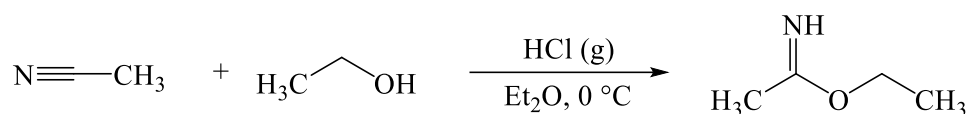
Shema 7. Selektivna acetilacija samo terminalne aminoskupine dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline.

U lužnatim uvjetima dihidroklorid 2,4-diaminobutanske kiseline prelazi u potpuno deprotonirani natrijev 2,4-diaminobutanoat koji se zatim preko α -aminoskupine i alkosidne skupine kompleksira s bakrovim(II) ionom iz bakrova(II) acetata monohidrata. Tako nastali kompleks bakrova(II) iona i dvije molekule 2,4-diaminobutanoata acetilira se s 4-nitrofenil-acetatom. α -Aminoskupina zaštićena je, pa zbog toga dolazi do selektivne acetilacije samo terminalne aminoskupine u reakciji s 4-nitrofenil-acetatom. Kako bi se izolirala 4-acetamido-2-aminobutanska kiselina, potrebno je u suspenziju bakrova(II) kompleksa s 4-acetamido-2-butanskom kiselinom dodati 8-hidroksikinolin. Bakrovi(II) ioni imaju veći afinitet prema 8-hidroksikinolinu, pa dolazi do nastajanja stabilnijeg kompleksa između bakrovih(II) iona i dvije molekule 8-hidroksikinolina. Kompleks bakrovih(II) iona i 8-hidroksikinolina, kao i sam 8-

hidroksikinolin, netopljiv je u vodi, pa je time olakšana izolacija 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline koja je dobro topljiva u vodi.

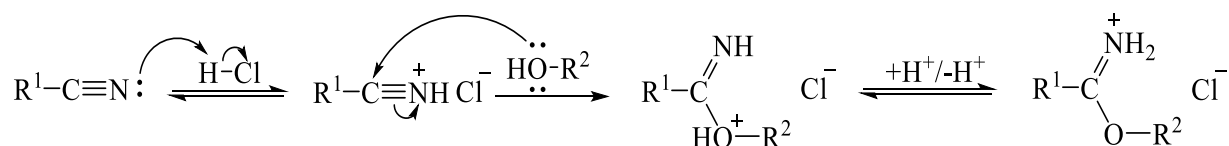
2.3.3. Priprava etil-etanimidata

U sintetskom putu koji rabi 2-amino-4-((1-etoksietiliden)amino)butanske kiselinu ili 4-amino-2-((1-etoksietiliden)amino)butanske kiselinu polazi se iz 2,4-diaminobutanske kiseline i etil-etanimidata. Etil-etanimidat sintetizira se Pinnerovom reakcijom. Pinnerova reakcija kiselo je katalizirana reakcija nitrila s alkoholom u svrhu dobivanja alkil-imidatne soli. Reakcija priprave etil-etanimidata prikazana je na shemi 8.



Shema 8. Priprava etil-etanimidata Pinnerovom reakcijom.

Acetonitril dodan u mješavinu etoksietana i etanola pri 0 °C protonira se klorovodikom, a kao produkt nastaje alkil-imidatna sol poznatija pod imenom Pinnerova sol. Predloženi mehanizam, koji je prikazan na shemi 9., uključuje protonaciju nitrila jakim kiselinom, odnosno klorovodikom, pri čemu nastaje snažno aktivirani nitrilijev kation. U sljedećem koraku alkohol može napasti aktivirani nitrilijev kation i na posljepku transfer protona daje alkil-imidatni hidroklorid.



Shema 9. Općeniti mehanizam Pinnerove reakcije.

2.4. Odvajanje enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Za odvajanje enantiomera ne mogu se primijeniti klasični kromatografski postupci koji uključuju akiralnu stacionarnu i mobilnu fazu jer su sva fizička i kemijska svojstva enantiomera jednaka, a jedino po čemu se razlikuju su kirooptička svojstva (cirkularni dikroizam, vibracioni cirkularni dikroizam, optička rotacijska disperzija, optička rotacija). Odvajanje enantiomera s pomoću HPLC-a moguće je provesti izravnim i neizravnim metodama. Neizravne metode temelje se na dodatku kiralnih aditiva mobilnoj fazi, nakon čega optički izomeri reagiraju s kiralnim aditivom i posljedično nastaju diastereomeri koji se zatim mogu odijeliti na akiralnoj stacionarnoj fazi. S druge strane, izravnim se metodama odvajaju enantiomere na kiralnoj stacionarnoj fazi. Takvo odvajanje temelji se na interakciji enantiomera s optički čistom kiralnom stacionarnom fazom pri čemu dolazi do formacije kratkoživućih diastereomernih molekularnih kompleksa različitih stabilnosti. Takvi kompleksi nastaju vrlo brzo, a samo je vezanje enantiomera za kiralnu stacionarnu fazu reverzibilno. Onaj enantiomer koji tvori stabilniji diastereizomerni kompleks zadržava se duže na kiralnoj stacionarnoj fazi te posljedično izlazi kasnije s kromatografske kolone.

2.4.1. Kiralne stacionarne faze

Kiralne stacionarne faze mogu se podijeliti prema osnovnim strukturnim značajkama i prema vrsti privlačnih sila koje djeluju između stacionarne faze i pojedinih enantiomera. Danas je dostupan iznimno velik i raznolik izbor kiralnih stacionarnih faza koje nastaju adsorpcijom ili kovalentnim vezanjem kiralnih selektora na sferični prozni silika-gel. Neke od najčešće korištenih kiralnih stacionarnih faza prikazane su u tablici 2.^{49,50}

Tablica 2. Pregled najčešće korištenih komercijalno dostupnih kiralnih stacionarnih faza.

| Naziv kolone | Kiralni selektor | Proizvođač |
|---|--|------------|
| Polisaharidne kiralne stacionane faze | | |
| Chiralcel OD | Celuloza 3,5-dimetilfenilkarbamat | Daicel |
| Chiralcel OF | Celuloza 4-klorfenilkarbamat | Daicel |
| Chiralcel OG | Celuloza 4-metilefnilkarbamat | Daicel |
| Chiralcel OJ | Celuloza <i>p</i> -metilbenzoat | Daicel |
| Chiralcel OK | Celuloza cinamat | Daicel |
| Chiralpak IB | Imobilizirana celuloza 3,5-dimetilfenilkarbamat | Daicel |
| Chirapak AD | Amiloza 3,5-dimetilfenilkarbamat | Daicel |
| Chiralpak AS-V | Amiloza (<i>S</i>)-feniletilkarbamat | Daicel |
| CTA | Celuloza triacetat | Daicel |
| Kiralne stacionarne faze građene od sintetičkih polimera | | |
| ChiraSpher | Poli[(<i>S</i>)- <i>N</i> -akriloilfenilalanin etil ester] | Merck |
| Kiralne stacionarne faze koje sadržavaju ciklodekstrine | | |
| ChiraDex | β -ciklodekstrin | Astec |
| Cyclobond | α -, β -, γ -ciklodekstrin | Merck |
| Kiralne stacionarne faze koje uključuju izmjenu liganda | | |
| Chiralpak WH | Prolin | Daicel |
| Chiralpak MA(+) | <i>N,N</i> -dioktil-L-alanin | Daicel |
| Četkolike kiralne stacionarne faze | | |
| DNBLeu | 3,5-dinitrobenzoilleucin | Regis |
| DACH-DNB | Diaminocikloheksan 3,5-dinitrobenzamid | Regis |

| | | |
|----------|--|-------|
| Whelk-O1 | 3,5-dinitrobenzoil tetrahidrofenantren amin | Regis |
| ULMO | Difeniletilen diamin 3,5- dinitrobenzamid | Regis |

Proteinske kiralne stacionarne faze

| | | |
|----------------|----------------------------------|------------|
| Chiralpak HSA | Humani serumski albumin | Daicel |
| Resolvosil BSA | Goveđi serumski albumin | Phenomenex |
| Chiralpak AGP | α 1-kiselina glikoprotein | Daicel |

Kiralne stacionarne faze koje sadržavaju makrocikličke glikopeptide

| | | |
|-----------------|--------------------------|-------|
| Chirobiotic T | Teicoplanin | Astec |
| Chirobiotic TAG | Modificirani teicoplanin | Astec |
| Chirobiotic V | Vancomycin | Astec |
| Chirobiotic R | Ristocetin A | Astec |

Kiralne stacionarne faze koje sadržavaju krunaste etere

| | | |
|------------------------|--|--------|
| Crownpak CR (+) / (-) | Derivat krunastog etera | Daicel |
| Chirosil RCA (+) / (-) | (+)(-)-(18-kruna-6)-tetrakarboksilna kiselina | Regis |

Ionsko-izmjenjivačke kiralne stacionarne faze

| | | |
|--------------------|--|--------|
| Chiralpak ZWIX (+) | Kinin s (<i>S,S</i>)- <i>trans</i> -2- aminocikloheksaesulfonskom kiselinom | Daicel |
| Chiralpak ZWIX (-) | Kinidin s (<i>R,R</i>)- <i>trans</i> -2- aminocikloheksansulfonskom kiselinom | Daicel |
| Chiralpak QN-AX | O-9-(<i>tert</i> -butilkarbamoil) kvinin | Daicel |

Polisaharidne stacionarne faze najčešće su korištene kiralne stacionarne faze građene od derivatiziranih polisaharida. Polisaharidne stacionarne faze sastoje se uglavnom od derivata celuloze i amiloze na nosaču od silika-gela. Derivatizacijom polisaharidnih hidroksilnih skupina s raznim bočnim lancima dobivaju se različite helikalne supramolekulske strukture. Unutrašnjost je takve helikalne strukture kiralna i može uvelike favorizirati vezanje jednog enantiomera u odnosu na drugi što dovodi do separacije enantiomera. Interakcija analita i polisaharidnih kiralnih stacionarnih faza temelji se i na privlačnim interakcijama (vodikove veze, π - π interakcije, dipol-dipol interakcijama) i na nastanku inkluzijskih kompleksa. Ove kiralne stacionarne faze najčešće se upotrebljavaju s nepolarnim mobilnim fazama (alkani – heksan ili heptan) i polarnim modifikatorima mobilne faze (alkoholi – izopropil alkohol ili etanol). Postoje i polisaharidne kiralne stacionarne faze namijenjene reverznoj fazi (Chiralpak AD-RH, AS-RH, Chiralcel OD-RH i OJ-RH) koje su pogodne za analizu spojeva netopljivih u nepolarnim mobilnim fazama.

Sljedeća skupina kiralnih stacionarnih faza koja također stupa u interakciju s analitom stvarajući inkluzijske spojeve jesu kiralne stacionarne faze koje imaju vezane ciklodekstrine. Ove stacionarne faze pripremaju se vezanjem raznih ciklodekstrina na nosač, odnosno silika-gel. Ciklodekstrini su kiralne molekule koje se sastoje od šest ili više glukoznih podjedinica povezanih u prsten. Kompleksacija uključuje interakcije nepolarnog dijela analita s nepolarnom unutrašnjošću ciklodekstrina. Što se bolje analit smjesti u unutrašnjosti ciklodekstrina, to je veća vjerojatnost za kiralno prepoznavanje. Najčešće je potrebno da analit ima jedan ili više aromatskih prstenova da bi nastao inkluzijski kompleks.

U stacionarnim fazama koje uključuju izmjenu liganada aminokiselina kao što je L-prolin vezana je na nosač silika-gela. Odvajanje se temelji na stvaranju enantioselektivnog kompleksa između aminokiseline (fiksni ligand), iona prijelaznog metala u pokretnoj fazi (obično iona bakra) i otopljene tvari (mobilnog liganda). Razlika u stabilnosti između kompleksa s *R* i *S* enantiomerom (kiralni analit) dovodi do odvajanja enantiomera. Kod ove vrste kiralnih stacionarnih faza selektivnost i efikasnost odjeljivanja enantiomera ovisi o pH, ionskoj jakosti mobilne faze i temperaturi. Da bi došlo do stvaranja kompleksa, analit mora imati dvije polarne funkcijske skupine koje su dovoljno udaljene da mogu poslužiti kao ligandi. Ove kiralne stacionarne faze pogodne su za odjeljivanje enantiomera nederivatiziranih aminokiselina i karboksilnih kiselina.

Četkolike kiralne stacionarne faze ili Pirke stacionarne faze oslanjaju se na nekoliko diskretnih molekularnih interakcija pri odjeljivanju enantiomera. Ove kiralne stacionarne faze sadržavaju kiralne selektore malih molekularnih masa koji će stupati u točno određene interakcije koje su ključne za odjeljivanje enantiomera. Odvajanje na ovakvim stacionarnim fazama temelji se na minimalno trima točkama interakcije pri čemu se stvaraju diastereomerni kompleksi s analitom privlačnim silama kao što su vodikova veza, π - π interakcije, dipol-dipol interakcija i minimizacijom odbojnih interakcija. Za većinu analita mjesta interakcije između kiralnog selektora i analita moraju biti u blizini kiralnog centra. Nadalje, ove kiralne stacionarne faze najčešće se upotrebljavaju s nepolarnim mobilnim fazama koje sadržavaju heksan i polarni mobilni modifikator (alkohol). Napolarne mobilne faze najčešće se rabe radi maksimizacije polarnih privlačnih sila između analita i kiralne stacionarne faze.

Proteinske kiralne stacionarne faze sadržavaju imobilizirani protein na silika-gel nosaču. Neki proteini kao što su α 1-kiseli glikoprotein (AGP), albumin iz humanog seruma (HSA) i albumin iz goveđeg seruma (BSA) mogu reverzibilno vezati male molekule pri čemu to vezanje može biti stereospecifično.

2.4.2. *Kiralne stacionarne faze za odvajanje enantiomera nederivatiziranih aminokiselina*

Kiralne stacionarne faze koje su se pokazale kao najpogodnije za odvajanje nederivatiziranih aminokiselina kiralne su stacionarne faze koje sadržavaju makrocikličke glikopeptide, krunaste etere i kiralne selektore za ionsku izmjenu.

Makrociklički glikopeptidi kovalentno vezani na silika-gel nosač vrsta su kiralnih stacionarnih faza koje omogućavaju uporabu širokog raspona mobilnih faza, nepolarnih i polarnih, koje su idealne za analitičko i preparativno odjeljivanje neutralnih, polarnih i ionskih spojeva. Ove kiralne stacionarne faze tvore interakciju s analitom kroz šest različitih molekularnih interakcija, a koje uključuju ionske interakcije, vodikove veze, π - π interakcije, dipol-dipol interakcije, hidrofobne i steričke interakcije. Osim navedenih molekularnih interakcija makrociklički glikopeptidi sadržavaju nekoliko inkluzijskih mjesta koja potiču selektivnost s obzirom na geometrijski oblik analita. Najvažnije obilježje ovih stacionarnih faza jest mogućnost stvaranja ionskih interakcija između analita i kiralne stacionarne faze što omogućava odvajanje nederivatiziranih aminokiselina koje se pri fiziološkom pH nalaze u obliku *zwitter*-iona.⁴⁹

Kiralne stacionarne faze koje sadržavaju krunaste etere kovalentno vezane na nosač silika-gela također su se pokazale kao dobar izbor za odjeljivanje enantiomera nederivatiziranih prirodnih i neprirodnih aminokiselina. Mehanizam odjeljivanja enantiomera aminokiselina s pomoću krunastih etera temelji se na kompleksaciji protonirane aminoskupine unutar šupljine krunastih etera. Dodatno, ako krunasti eter sadržava neke vezane funkcijske skupine, kao što je karboksilna skupina kod ChiroSil stacionarne faze, na odjeljivanje mogu utjecati i molekularne interakcije kao što su steričke interakcije i vodikove veze. Uz ove stacionarne faze potrebno je upotrebljavati kisele polarne mobilne faze kako bi se dobilo najbolje odjeljivanje aminokiselina.^{49,51,52}

Ionsko-izmjenjivačke kiralne stacionarne faze sadržavaju anionsko-izmjenjivačke ili kationsko-izmjenjivačke funkcijske skupine koji služe kao kiralni selektori i koji su imobilizirani na nosaču od silika-gela. Postoje i kiralne stacionarne faze koje imaju *zwitter*-ionske kiralne selektore koji sadržavaju i anionsko-izmjenjivačke i kationsko-izmjenjivačke funkcijske skupine. Ovi kiralni selektori specifično su namijenjeni odjeljivanju molekula koje se nalaze u obliku *zwitter*-iona kao što su primjerice nederivatizirane aminokiseline. Ove kiralne stacionarne faze mogu se rabiti sa svim učestalim HPLC otapalima, a zbog ionskog svojstva kiralnog selektora kao i analita u mobilnu fazu potrebno je dodati kiselinu ili bazu.⁵³

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Pri provedbi eksperimentalnog dijela diplomskog rada koristilo se komercijalno dostupnim kemikalijama i otapalima analitičke čistoće: oksolan-2-on (*Sigma-Aldrich*), brom (Br_2 , *Fluka*), fosforov tribromid (PBr_3 , *Merck*), 3-bromoksolan-2-on (*Sigma-Aldrich*) i (*S*)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilna kiselina (*Sigma-Aldrich*), 4-nitrofenol (*Aldrich*), kalijev ftalimid (*Merck*), bakrov(II) acetat monohidrat ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, *Fluka*), kinolin-8-ol (*Kemika*), natrijev karbonat (Na_2CO_3 , *Kemika*), natrijev hidroksid (NaOH , *Kemika*), bezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4 , *Kemika*), *N,N*-dietiletanamin (Et_3N), ledena octena kiselina (AcOH), klorovodična kiselina (HCl), dimetilformamide (DMF), *n*-butanol (*n*-BuOH), izopropanol (*i*-PrOH), etanol (EtOH), metanol (MeOH), aceton, diklormetan (DCM), acetonitril (ACN).

Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silika-gela (*Merck* TLC Silica gel 60 F254) u različitim sustavima otapala koji su prikazani u tablici 3. Otkrivanje spojeva na TLC pločicama provedeno je UV lampom pri 254 nm i/ili otopinom kalijeva permanganata ili ninhidrina uz zagrijavanje. Tijekom sinteze upotrijebljena je i preparativna tankoslojna kromatografija (*Analtec Silica gel GF*, preparativni sloj s UV 254, 20 000 μm).

Tablica 3. Sustavi otapala korišteni za praćenje tijeka reakcija tankoslojnom kromatografijom.

| Sustav otapala | Volumni omjeri otapala |
|----------------|--|
| A | EtOAc : heksan = 9 : 1 |
| B | DCM : MeOH = 25 : 1 |
| C | <i>i</i> -PrOH : AcOH : H ₂ O = 7 : 3 : 2 |

Stupanj čistoće dobivenih spojeva određen je snimanjem ^1H NMR spektara, a svi dobiveni spojevi identificirani su s pomoću ^1H i ^{13}C NMR spektara. ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker AV 300 na sobnoj temperaturi pri 300 MHz (^1H) i 75 MHz (^{13}C). Otapala korištena pri snimanju spektara bila su deuterirani kloroform (CDCl_3), deuterirana voda (D_2O),

deuterirani dimetilsulfoksid (DMSO- d_6) i deuterirani metanol (CD₃OD). Spektri su vizualizirani u programu MestReNova. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm). Unutrašnji standard kod snimanja ¹H spektara bio je tetrametilsilan (TMS) čiji se signal nalazi na 0 ppm, dok je kod spektara ¹³C kao referencija služio srednji signal otapala.⁵⁴ Signali su označeni kao singlet (s), dublet (d), dublet dubleta (dd), triplet (t), i multiplet (m).

Spojevima su snimljeni i IR spektri na *PerkinElmer UATR Two* spektrometru. Svi uzroci snimljeni su ATR metodom u rasponu od 450 cm⁻¹ do 4000 cm⁻¹, uz razlučivost 4 cm⁻¹ i 8 skenova po spektru.

Sintetiziranim spojevima određene su točke tališta s pomoću polarizacijskog optičkog mikroskopa *Olympus System Microscope* (model BX51TF) opremljenog s grijaćim stolićem *Linkman THMS 600* i sustavom za kontrolu temperature *TMS 93* te digitalnom kamerom *Olympus C 5050 ZOOM*. Ciklusi grijanja uzorka provedeni su brzinom 5 °C/min.

Za praćenje tijeka reakcije pripreve 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona (**10**) korištena je plinska kromatografija, a koristio se uređaj Agilent 8860 GC sustav s FID detektorom i autosamplrom. Kromatografska kolona korištena tijekom analiza bila je Agilent technologies HP-5 (dužina 30 m, promjer 0,32 mm, film 0,25 μm). Korištena metoda tijekom GC analize prikazana je u tablici 4. Uzorci su pripremljeni otapanjem 1 mg uzorka u 1 mL DCM-a. Prilikom analize injektirano je 2 μl.

Tablica 4. Metoda korištena u GC analizi reaktanta, produkata i reakcijske smjese prilikom pripreve 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona (**10**).

| Vrijeme (min) | Temperatura (°C) |
|------------------|---------------------|
| 0 | 100 |
| 2 | 100 |
| 3 | 110 |
| 4 | 120 |
| 5 | 130 |
| 6 | 140 |
| 7 | 150 |

3.2. Priprava (\pm)-ektoina

3.2.1. Priprava 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (1)

U dvogrlu tikvicu doda se dihidrofuran-2(3H)-on (4,00 mL, 0,052 mol) i katalitička količina fosforova tribromida (100 μ L, 1,10 mmol). Reakcijska smjesa zagrije se do 100 °C uz miješanje na magnetskoj miješalici. Kad reakcijska smjesa dosegne zadanu temperaturu, u reakcijsku smjesu dokapava se brom (2,68 mL, 0,052 mol) tijekom četiri sata. Nakon što se doda sav brom, temperatura reakcijske smjese povisi se na 130 °C i reakcijska se smjesa miješa još četiri sata. Tijek reakcije prati se na TLC pločicama, a kao mobilna faza služi sustav otapala A. Spojevi se otkrivaju bojenjem otopinom kalijeva permanganata uz zagrijavanje. Zaostali dihidrofuran-2(3H)-on potrebno je ukloniti destilacijom pri sniženom tlaku. U ostatak nakon vakuumske destilacije doda se zasićena otopina Na₂CO₃ pa se ekstrahira tri puta DCM-om. Organski slojevi prikupe se i suše nad bezvodnim Na₂SO₄ nakon čega se DCM upari na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiveni spoj **1** tekućina je svjetlo žute boje.

$R_f = 0,87$ (sustav otapala A)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ / ppm: 2,46 – 2,55 (m, 1H), 2,74 – 2,87 (m, 1H), 4,40 – 4,47 (m, 2H), 4,49 – 4,57 (m, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ / ppm: 33,76, 37,62, 67,06, 173,13.

IR $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2916,75 (C–H istezanje), 1770,10 (C=O istezanje), 1478,90 (C–H savijanje), 1200,75 (C–O istezanje), 677,42 (C–Br istezanje).

3.2.2. Priprava 2-(2-oksotetrahidrofuran-3-il)izoindolin-1,3-diona (2)

U okruglu tikvicu doda se spoj **1** (20,000 g, 0,121 mol), kalijev ftalimid (22,424 g, 0,121 mol) i DMF (60 mL). Reakcijska smjesa zagrije se do 100 °C i miješa se četiri sata. Tijek reakcije prati se na TLC pločici uz sustav otapala B, a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom i otopinom kalijeva permanganata uz zagrijavanje. U ohlađenu reakcijsku smjesu doda se 300 mL destilirane vode i ohladi se u ledenoj kupelji. Talog se filtrira kroz Büchnerov lijevak i ispere se hladnom destiliranom vodom (dva puta po 50 mL). Prikupljeni talog osuši se u sušioniku na 60 °C. Dobiveno je 24,477 g ($\eta = 87,3$ %) spoja **2** ($t_f = 127,7 - 164,1$ °C) koji je praškasta krutina krem boje.

$R_f = 0,68$ (sustav otapala B)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 2,55 – 2,66 (m, 1H), 2,73 – 2,88 (m, 1H), 4,36 – 4,45 (m, 1H), 4,67 (td, $J = 9,2$, $J = 2,2$ Hz, 1H), 5,11 (dd, $J = 11,0$ Hz, $J = 9,6$ Hz, 1H), 7,73 – 7,90 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 26,71; 47,28; 65,97; 123,89; 131,80; 134,63; 167,03; 172,34.

$\text{IR } \tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2922,88 (C–H istežanje), 1760,09 (C=O istežanje, γ -lakton), 1706,37 (C=O istežanje, tercijarni amid), 1188,32 (C–N istežanje),

3.2.3. Priprava 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanske kiseline (3)

Suspenzija spoja **2** (24,421 g, 0,105 mol) i kalijeva ftalimida (19,539 g, 0,105 mol) u DMF-u (60 mL) grije se uz refluks jedan sat. Tijek reakcije, odnosno potrošnja početnog spoja **2** prati se na TLC pločici uz sustav otapala B ($R_f = 0$ za spoj **3**), a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom. Nakon završetka reakcije u reakcijsku se smjesu dodaje destilirana voda (300 mL) i ledena octena kiselina (40 mL). Reakcijska smjesa ohladi se u ledenoj kupelji. Talog se filtrira kroz Büchnerov lijevak i ispere se hladnom destiliranom vodom (dva puta po 50 mL). Prikupljeni talog osuši se u sušioniku na 60 °C. Dobiveno je 31,478 g ($\eta = 78,7$ %) spoja **3** ($t_f = 186,2 - 188,1$ °C) koji je praškasta krutina prljavo bijele boje.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 2,61 – 2,89 (m, 2H), 3,70 – 3,87 (m, 2H), 4,93 (dd, $J = 10,3$ Hz, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,66 – 7,88 (m, 8H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 27,43; 35,15; 49,56; 123,47; 123,79; 131,87; 132,03; 134,16; 134,41; 167,67; 168,30; 173,72.

$\text{IR } \tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3061,20 (O–H istežanje), 1776,71 (C=O istežanje, karboksilna kiselina), 1711,12 (C=O istežanje, tercijarni amid), 1612,36 (N–H savijanje), 1396,70 (O–H savijanje).

3.2.4. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (4)

Spoj **3** (23,7631 g, 0,0628 mol) suspendira se u razrijeđenoj HCl (v/v 1 : 1, 600 mL). Suspenzija se grije uz refluks 16 sati. Tijek reakcije prati se na TLC pločici uz sustav otapala C, a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom pri 254 nm i otopinom ninhidrina uz zagrijavanje. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi, filtrira kroz Büchnerov lijevak, a matičnica se upari na rotacijskom

uparivaču uz sniženi tlak i povišenu temperaturu vodene kupelji. Dobiveni se talog resuspendira u minimalnom volumenu hladnog apsolutnog etanola i filtrira se kroz sinter lijevak, ispere se s nekoliko volumena hladnog apsolutnog etanola te se filtrat prikupi i osuši. Dobiveno je 8,5124 g ($\eta = 70,9\%$) spoja **4** ($t = 180,0 - 181,4\text{ }^\circ\text{C}$) prljavo bijele boje.

$R_f = 0,16$ (sustav otapala C)

$^1\text{H NMR (D}_2\text{O, 300 MHz) } \delta/\text{ppm}$: 2,20 – 2,41 (m, 2H), 3,17 – 3,34 (m, 2H), 4,13 (dd, $J = \text{Hz}$, $J = \text{Hz}$, 1H).

$^{13}\text{C NMR (D}_2\text{O, 75 MHz) } \delta/\text{ppm}$: 27,59; 36,07; 50,79; 171,18.

$\text{IR } \tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2876,59 (O–H istezanje), 1732,95 (C=O, istezanje), 1580,19 (N–H, savijanje).

3.2.5. Priprava 4-nitrofenil-acetata (**5**)

U okrugloj tikvici suspendira se 4-nitrofenol (15,000 g, 0,108 mol) u acetanhidridu (23,60 mL, 0,250 mol). Reakcijska smjesa grije se uz refluks dva sata na magnetskoj miješalici. Tijek reakcije prati se na TLC pločici uz sustav otapala B, a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom pri 254 nm. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi, neutralizira se 30-postotnom vodenom otopinom Na_2CO_3 . Nakon što se postigne $\text{pH} = 7$, ekstrahira se tri puta DCM-om. Organski se slojevi prikupe i suše nad bezvodnim Na_2SO_4 . DCM se upari na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiveno je 19,216 g ($\eta = 98,4\%$) spoja **5** ($t = 78,6 - 79,7\text{ }^\circ\text{C}$) svijetložute boje.

$R_f = 0,89$ (sustav otapala B)

$^1\text{H NMR (CDCl}_3, 300 \text{ MHz) } \delta/\text{ppm}$: 2,35 (s, 3H), 7,27 – 7,31 (m, 2H), 8,24 – 8,30 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3, 300 \text{ MHz) } \delta/\text{ppm}$: 21,23; 122,57; 125,32; 145,45; 155,50; 168,50.

$\text{IR } \tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3113,20 (C–H istezanje), 1757,62 (C=O istezanje), 1516,87 (N–O istezanje).

3.2.6. Priprava N-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline (**6**)

Općeniti postupak A

U okruglu tikvicu doda se spoj **4** (0,100 g, 0,523 mmol), baza, destilirana voda (5 mL) i spoj **5**. Korištena baza i njena količina, količina spoja **5**, kao i reakcijski uvjeti, u šest različitih

modifikacija općenitog postupka A (A1 – A6) prikazani su u tablici 5. Tijek reakcije prati se na TLC pločicama uz sustav otapala B, a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom ($\lambda = 254$ nm).

Tablica 5. Reakcijski uvjeti modifikacija općenitog postupka A sinteze *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline (**6**).

| Postupak | <i>n</i> (4-nitrofenil-acetata) (mol) | Baza | Vrijeme | Temperatura |
|----------|---------------------------------------|---|---------|-------------|
| A1 | 0,523 | 1,046 mol NaOH | 16 h | 25 °C |
| A2 | 0,523 | 1,046 mol NaOH | 3 h | 70 °C |
| A3 | 1,046 | 1,046 mol NaOH | 3 h | 70 °C |
| A4 | 0,628 | 1,046 mol NaOH | 72 h | 25 °C |
| A5 | 0,523 | NaOH (aq) ($c = 2$ mol/dm ³), održavanje pH = 11 1,046 mol | 3 h | 25 °C |
| A6 | 0,523 | Na ₂ CO ₃ | 16 h | 25 °C |

Postupak B

Spoj **4** (8,465 g, 0,0443 mol) otopi se u vodenoj otopini NaOH (3 mol/dm³, 44,3 mL). U otopinu se doda bakrov(II) acetat monohidrat (4,255 g, 0,0222 mol) koji je prethodno otopljen u destiliranoj vodi (22,2 mL). U lijevak za dokapavanje doda se spoj **5** (9,630 g, 0,0532 mol) koji je prethodno otopljen u acetonu (89,2 mL) i dokapava se u reakcijsku smjesu koja se miješa na sobnoj temperaturi 48 sati. Tijek reakcije, odnosno potrošnja spoja **5**, prati se na TLC pločicama uz sustav otapala B, a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom pri 254 nm. Reakcijska smjesa filtrira se kroz Büchnerov lijevak. Filtrat se ispere hladnom smjesom acetona i vode ($v : v = 2 : 1$) nakon čega se filtrat prikupi i osuši. Dobiveno je 7,065 g ($\eta = 83,1$ %) kompleksa bakrova(II) iona i 4-acetamid-2-aminobutanske kiseline svijetloplave boje.

IR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3310,81 (N–H istezanje), 3228,18 (O–H istezanje), 2911,63 (C–H istezanje), 1614,16 (C=O istezanje).

Dobiveni bakrov(II) kompleks (7,065 g, 0,0184 mol) suspendira se u acetonu (36,8 mL) te se miješa petnaest minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se doda destilirana voda (36,8 mL) pa se miješa još deset minuta. U reakcijsku smjesu doda se kinolin-8-ol (6,944 g, 0,0478 mol) i destilirana voda (220,8 mL) i miješa se četiri sata na sobnoj temperaturi. Precipitat bakrova(II) kinolin-8-ola filtrira se kroz Büchnerov lijevak, a filtrat se ispere hladnom destiliranom vodom. Matičnica se upari na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku. Dobiveno je 5,844 g ($\eta = 99,2\%$) spoja **6** prljavo bijele boje.

$R_f = 0,37$ (sustav otapala C)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 1,90 (s, 3H), 1,93 – 2,07 (m, 2H), 3,14 – 3,33 (m, 2H), 3,62 (dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 5,6$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 21,78; 30,20; 35,43; 52,43; 174,22; 174,64.

$\text{IR } \tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3251,80 (N–H istezanje), 2958,90 (O–H istezanje), 2891,83 (C–H istezanje), 1632,81 (C=O savijanje), 1412,2 (C–H savijanje).

3.2.7. Priprava (\pm)-ektoina (**7**)

U okrugloj tikvici suspendira se spoj **6** (5,844 g, 0,0365 mol) u *n*-butanolu (500 mL) uz dodatak Et_3N (10,17 mL, 0,0730 mol). Reakcijska smjesa miješa se uz refluks 48 sati. Tijek reakcije prati se na TLC pločicama uz sustav otapala C, a spojevi se otkrivaju UV svjetiljkom ($\lambda = 254$ nm) i otopinom ninhidrina uz zagrijavanje. Nakon završetka reakcije *n*-butanol upari se na rotacijskom uparivaču pri sniženom tlaku i povišenoj temperaturi vodene kupelji. Dobiveni produkt pročisti se trituracijom hladnim apsolutnim etanolom, dok se talog filtrira kroz Büchnerov lijevak. Dobiveno je 3,2607 g ($\eta = 62,7\%$) čistog spoja **7** bijele boje.

$R_f = 0,41$ (sustav otapala C)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 1,97 – 2,07 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 3,15 – 3,40 (m, 2H), 3,97 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 21,78; 30,20; 35,43; 52,43; 174,22; 174,64.

$\text{IR } \tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$: 3191,94 (N–H istezanje), 2851,12 (C–H istezanje), 2663,07(O–H istezanje), 1655,22 (C=N istezanje).

3.3. Odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina

3.3.1. Instrumenti

Tijekom provedbe odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina korišten je sljedeći HPLC uređaj:

- Agilent 1200 Systems, proizvod tvrtke Agilent Technologies, Njemačka, sastavljen od sljedećih dijelova: vakuumski membranski degaser G1322A, kvaterna gradijentna pumpa G1311A, automatski uzorkivač G1329A, grijač odjeljka za kolonu G1330B, MW detektor G1365D.

Podaci dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti prije ispisa obrađeni su računalom u programu EZChrom Elite, proizvod tvrtke Agilent Technologies, Njemačka. Korištene kiralne kolone i njihove specifikacije prikazane su u tablici 6., a korišteni sustavi mobilnih faza kao i ostali parametri kromatografske analize prikazani su u tablici 7.

Tablica 6. Popis korištenih kromatografskih kolona tijekom razvoja metodi analiza za odjeljivanje enantiomera (\pm)-ektoina.

| Naziv kolone | Specifikacije | Proizvođač |
|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| (<i>R,R</i>)-WhelkO1 | 250 × 4,60 mm, 5 μ m | Regis Technologies, Inc. |
| Chiralcel OJ-RH | 150 × 4,60 mm, 5 μ m | Daicel |
| Chiralcel OD-RH | 250 × 4,60 mm, 5 μ m | Daicel |
| Chiralpak AD | 250 × 4,60 mm, 5 μ m | Daicel |
| Chiralpak AS-H | 250 × 4,60 mm, 5 μ m | Daicel |
| ChiralT | 150 × 4,60 mm, 2,7 μ m | Agilent |

3.3.2. Metode i uvjeti

Tijekom analiza provedenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) rabila su se otapala čistoće predviđene za HPLC analize: MeOH, ACN, i MiliQ H₂O. Sve su mobilne faze prije korištenja degazirane na ultrazvučnoj kupelji. Parametri kromatografskih analiza i kromatografske kolone korištene tijekom razvoja metode za odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina prikazani su u tablici 7.

Prije svake analize odvajanja enantiomera pripravljene su otopine (\pm)-ektoina masenih koncentracija od 0,25 – 0,5 mg/mL, a kao otapalo upotrebljavala se odgovarajuća mobilna faza.

Prije uporabe odabrana se kolona kondicionirala propuštanjem 30 mL mobilne faze. Za određivanje (+) i (-)-enantiomera upotrebljavala se otopina komercijalno dostupnog (+)-ektoina. Mrtvo vrijeme za kolonu ChiralT određeno je prema piku otapala.

Tablica 7. Parametri kromatografskih analiza ispitanih tijekom razvoja metode za odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

| Metoda | Naziv korištene kromatografske kolone | Sastav mobilne faze | Protok (mL min ⁻¹) | Temperatura kolone (°C) | Duljina trajanja analize (min) |
|--------|---------------------------------------|--|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 1 | (<i>R,R</i>)-WhelkO1 | MeOH uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 2 | (<i>R,R</i>)-WhelkO1 | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 3 | (<i>R,R</i>)-WhelkO1 | MeOH : H ₂ O = 7 : 3 uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 4 | (<i>R,R</i>)-WhelkO1 | ACN : H ₂ O = 7 : 3 | 1 | 25 | 15 |
| 5 | (<i>R,R</i>)-WhelkO1 | ACN : H ₂ O = 15 : 85 | 1 | 25 | 15 |
| 6 | Chiralcel OJ-RH | ACN : H ₂ O = 5 : 95 | 1 | 25 | 15 |
| 7 | Chiralcel OJ-RH | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 8 | Chiralcel OJ-RH | ACN : H ₂ O = 15 : 85 | 1 | 25 | 15 |
| 9 | Chiralcel OJ-RH | ACN : H ₂ O = 15 : 85 uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 10 | Chiralcel OJ-RH | ACN : H ₂ O = 1 : 9 | 1 | 25 | 15 |
| 11 | Chiralcel OJ-RH | ACN : H ₂ O = 3 : 7 | 1 | 25 | 15 |

| | | | | | |
|----|-----------------|-------------------------------------|-----|----|----|
| 12 | Chiralcel OJ-RH | ACN : H ₂ O = 7 : 3 | 1 | 25 | 15 |
| 13 | Chiralcel OD-RH | ACN : H ₂ O = 15 : 85 | 1 | 25 | 15 |
| 14 | Chiralcel OD-RH | MeOH uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 15 | Chiralpak AD | MeOH uz 0,1 % AcOH | 1 | 25 | 15 |
| 16 | ChiralT | MeOH | 1 | 30 | 65 |
| 17 | ChiralT | MeOH uz 0,1 % FA | 1 | 25 | 15 |
| 18 | ChiralT | MeOH uz 0,01 % FA | 1 | 25 | 15 |
| 19 | ChiralT | MeOH uz 0,01 % TEA | 1 | 25 | 20 |
| 20 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 9 : 1 | 1 | 30 | 30 |
| 21 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 9 : 1 | 1 | 35 | 30 |
| 22 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 9 : 1 | 1 | 40 | 25 |
| 23 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 7,5 : 2,5 | 0,5 | 30 | 30 |
| 24 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 7,5 : 2,5 | 0,5 | 40 | 30 |
| 25 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 7,5 : 2,5 | 1,0 | 40 | 15 |
| 26 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 7,5 : 2,5 | 1,2 | 40 | 10 |

| | | | | | |
|----|---------|--|------|----|----|
| 27 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 | 0,5 | 40 | 15 |
| 28 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 | 0,75 | 40 | 10 |
| 29 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 | 1,0 | 30 | 10 |
| 30 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 | 1,0 | 35 | 10 |
| 31 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 | 1,0 | 40 | 10 |
| 32 | ChiralT | MeOH : H ₂ O = 1 : 1 | 1,0 | 45 | 10 |
| 33 | ChiralT | MeOH : amonijev formijat (0,025 mol/dm ³ , pH = 3,0) = 7 : 3 | 1,0 | 40 | 10 |
| 34 | ChiralT | MeOH : amonijev formijat (0,025 mol/dm ³ , pH = 3,0) = 1 : 1 | 1,0 | 40 | 10 |
| 35 | ChiralT | ACN : H ₂ O = 8 : 2 | 1,0 | 30 | 20 |

3.4. Ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina u hranjivom mediju

Prikupljeni uzorci hranjivih medija u kojima su rasli različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.*, a koji su prethodno izolirani iz sedimenta Jadranskog mora, analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. U hranjivim podlogama raslo je 16 različitih sojeva bakterija *Streptomyces sp.* Sojevi bakterija rasli su uz različite masene udjele NaCl, a kao kontrola neki sojevi rasli su u hranjivom mediju bez dodatka NaCl.

Uređaj koji se upotrebljavao za određivanje prisutnosti (+)-ektoina u navedenim hranjivim medijima bio je *Shimadzu LC-2010HTC* s detektorom s nizom fotodioda. Korištena kromatografska kolona bila je Synergi Polar – RP (veličina čestica 4 μm , veličina pora 80 Å, dimenzije 150 \times 4,60 mm). Uzorci su pripremljeni filtriranjem kroz PTFE filter (0,20 μm , Ø13 mm) i nisu se dodatno razrjeđivali ni obrađivali. Metoda korištena tijekom HPLC analize hranjivih medija prikazana je u tablici 8. Protok je postavljen na 1,0 mL min⁻¹, temperatura na 30 °C, a vrijeme analize iznosilo je 30 minuta. Tijekom analize injektirano je 20 μL uzorka. Spojevi su otkriveni pri 210 i 220 nm.

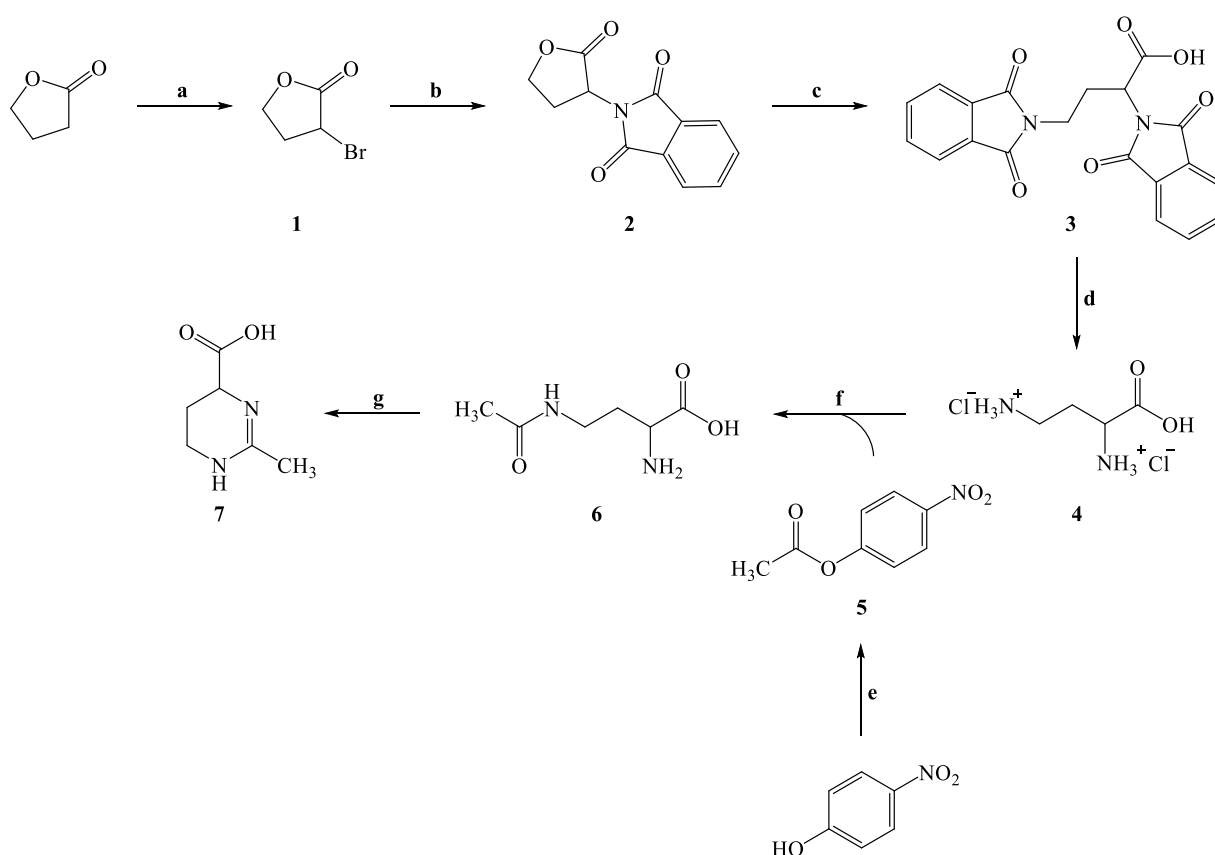
Tablica 8. Metoda korištena u HPLC analizi prisutnosti (+)-ektoina u hranjivih podloga.

| Vrijeme | $\Psi(\text{H}_2\text{O})$ (%) | $\Psi(\text{ACN})$ (%) |
|---------|--------------------------------|------------------------|
| 0,00 | 100 | 0 |
| 7,00 | 100 | 0 |
| 20,00 | 0 | 100 |
| 25,00 | 0 | 100 |
| 25,01 | 100 | 0 |
| 30,00 | 100 | 0 |

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava (\pm)-ektoina

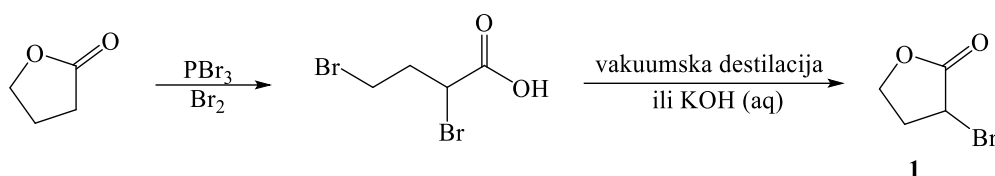
U okviru ovog rada opisana je priprava (\pm)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilne kiseline, odnosno (\pm)-ektoina (**7**). Provedeni sintetski put priprave (\pm)-ektoina (**7**) prikazan je na shemi 10.



Shema 10. Priprava (\pm)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilne kiseline (**7**): (a) PBr_3 , Br_2 ; (b) kalijev ftalimid, DMF; (c) (1) kalijev ftalimid, DMF, (2) CH_3COOH (konc.); (d) HCl (aq) (v/v 1 : 1); (e) Ac_2O ; (f) (1) NaOH , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, aceton, spoj **5**, (2) kinolin-8-ol, aceton, voda; (g) Et_3N , *n*-butanol.

4.1.1. Priprava 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (**1**)

Prva reakcija u sintetskom putu dobivanja (\pm)-ektoina (**7**) je bromiranje dihidrofuran-2(3H)-ona na položaju 3. Naizgled jednostavnu reakciju komplicira izolacija konačnog produkta. Predložen reakcijski put dobivanja 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (**1**) prikazan je na shemi 11.



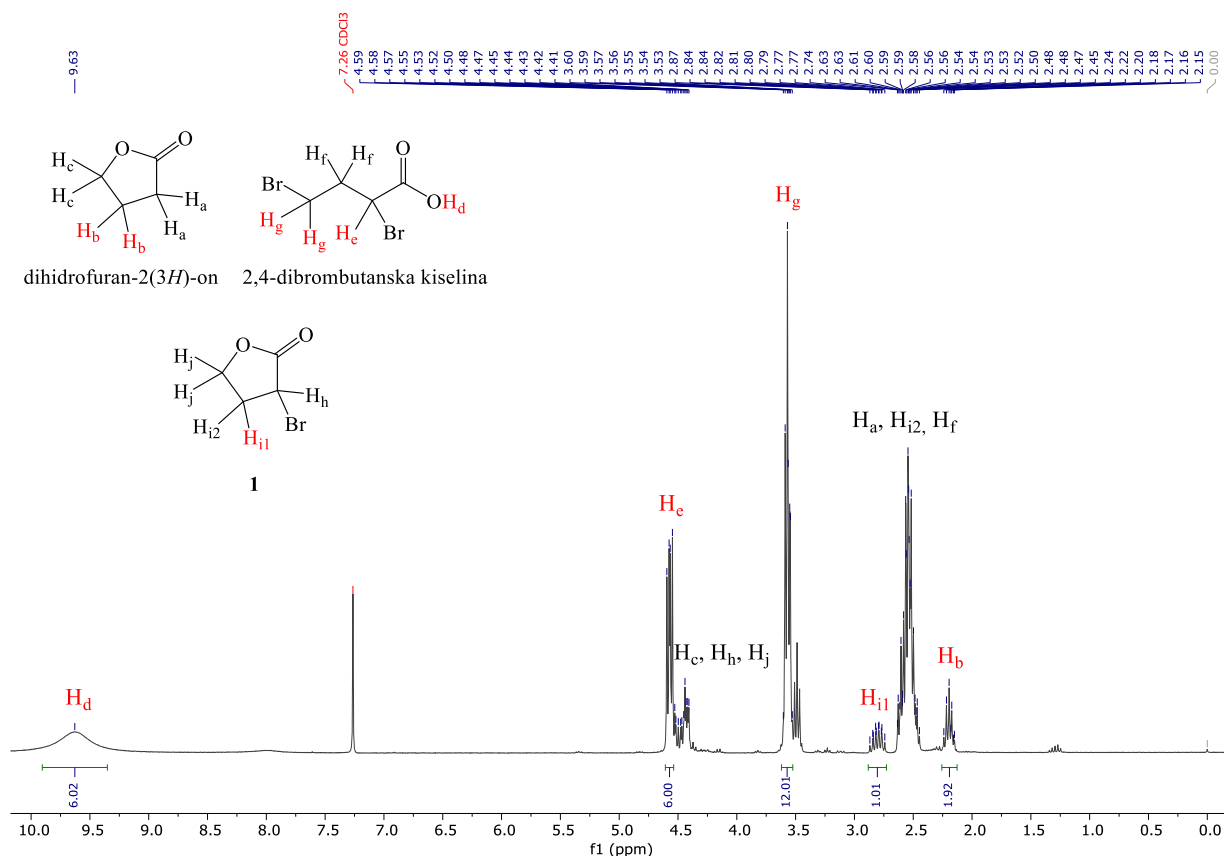
Shema 11. Reakcijski put dobivanja 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (**1**) iz dihidrofuran-2(3H)-ona uz elementarni brom i fosforov tribromid.

Reakcijom dihidrofuran-2(3H)-ona s elementarnim bromom uz katalitičku količinu fosforova tribromida nastaje 2,4-dibrombutanska kiselina kao međuprodukt. Povišenje temperature nakon dodatka jednog ekvivalenta broma potiče ciklizaciju 2,4-dibrombutanske kiseline u spoj **1** uz otpuštanje HBr-a. Međutim, utvrđeno je da samo dio spoja 2,4-dibrombutanske kiseline pri ovim uvjetima prelazi u spoj **1**, a kako bi se potakla ciklizacija međuprodukta potrebno je ravnotežu pomaknuti prema produktu vakuumskom destilacijom pri sniženom tlaku ili dodatkom otopine KOH.

Tijek reakcije pri prvom provođenju reakcije praćen je plinskom kromatografijom. Svi su spojevi hlapljivi i male molekulske mase, pa se pretpostavilo da će ova tehnika biti odgovarajuća. Osim reakcijske smjese analizirani su i uzorci komercijalno dostupnih dihidrofuran-2(3H)-ona i 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (**1**) koji su služili kao standardi. Dobiven kromatogram reakcijske smjese sugerirao je da reakcijska smjesa sadržava 5 % dihidrofuran-2(3H)-ona i 95 % spoja **1**. Reakcijskoj smjesi snimljen je ^1H NMR spektar, pri 300 MHz, a korišteno otapalo bilo je CDCl_3 . Iz snimljenog NMR spektra vidljivo je da reakcijska smjesa zapravo sadržava smjesu početnog spoja, međuprodukata i konačnog spoja. Rezultatima dobivenim ^1H NMR spektroskopijom odgovarala je i slika tankoslojne kromatografije koja je upućivala na smjesu triju spojeva. Navedeni rezultati potvrđuju pretpostavku se da pri unošenju uzorka u kromatografski sustav, tj. pri prelasku u plinovito stanje u injektoru (pri temperaturi od 300 °C), dolazi do *in situ* ciklizacije 2,4-dibrombutanske kiseline u spoj **1**. Zbog toga nije bilo moguće otkriti 2,4-dibrombutansku kiselinu plinskom

kromatografijom i zbog toga je dobivena pogrešna slika – da je reakcija išla gotovo kvantitativno. Kako bi se dokazala prethodno postavljena pretpostavka, bilo je potrebno izolirati 2,4-dibrombutansku kiselinu i analizirati ju plinskom kromatografijom. Koristeći preparativnu TLC kromatografiju izolirana je 2,4-dibrombutanska kiselina te je analizirana plinskom kromatografijom pri čemu se dobio pik čije retencijsko vrijeme odgovara retencijskom vremenu izoliranog spoja **1**. Kromatogrami dihidrofurana-2(3*H*)-ona, reakcijske smjese nakon provedene reakcije bromiranja, 2,4-dibrombutanske kiseline i 3-bromdihidrofurana-2(3*H*)-ona prikazani su u Dodatku D3.1.

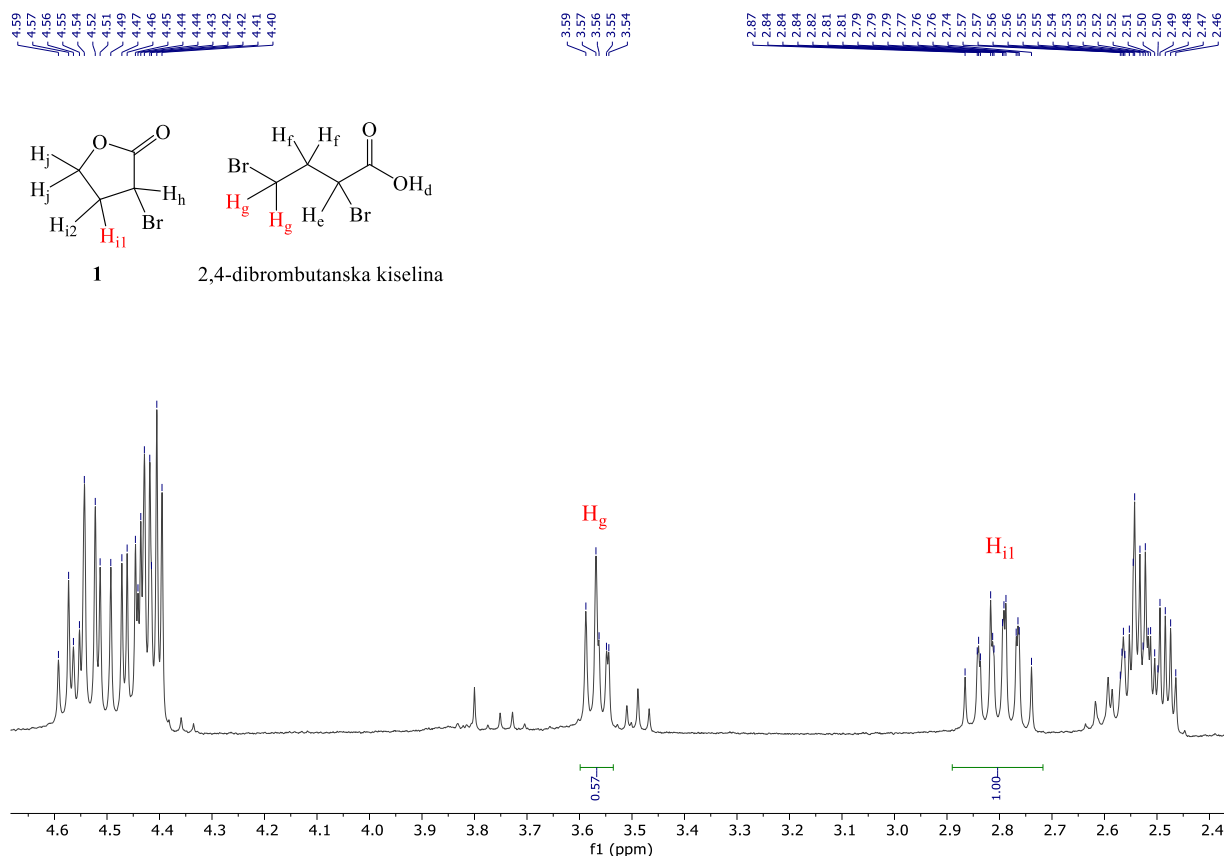
Prema signalima svojstvenim za početni spoj (dihidrofuran-2(3*H*)-on) ($\delta = 2,15 - 2,24$ ppm, m, 2H, H_b), međuprodukt (2,4-diamobutanska kiselina) ($\delta = 3,54 - 3,59$ ppm, m, 2H, H_g, $\delta = 4,53 - 4,59$ ppm, m, 6H, H_e i $\delta = 9,63$ ppm, s, 1H, H_d) i konačni spoj (**1**) ($\delta = 2,74 - 2,87$ ppm, m, 1H, H_{i1}) može se odrediti omjer navedenih spojeva u reakcijskoj smjesi. Iz ¹H NMR spektra koji je prikazan na slici 5., određeno je da reakcijska smjesa sadržava jedan ekvivalent dihidrofurana-2(3*H*)-ona, jedan ekvivalent spoja **1** i šest ekvivalenata 2,4-dibrombutanske kiseline. Iz navedenih podataka vidi se da je količina dobivenog spoja **1** mala i da je riječ o ekvivalentnoj količini zaostalog početnog spoja (dihidrofuran-2(3*H*)-on).



Slika 5. ^1H NMR spektar reakcijske smjese koja sadržava jedan ekvivalent dihidrofuran-2(3*H*)-ona, jedan ekvivalent 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona (**1**) i šest ekvivalenata 2,4-dibrombutanske kiseline.

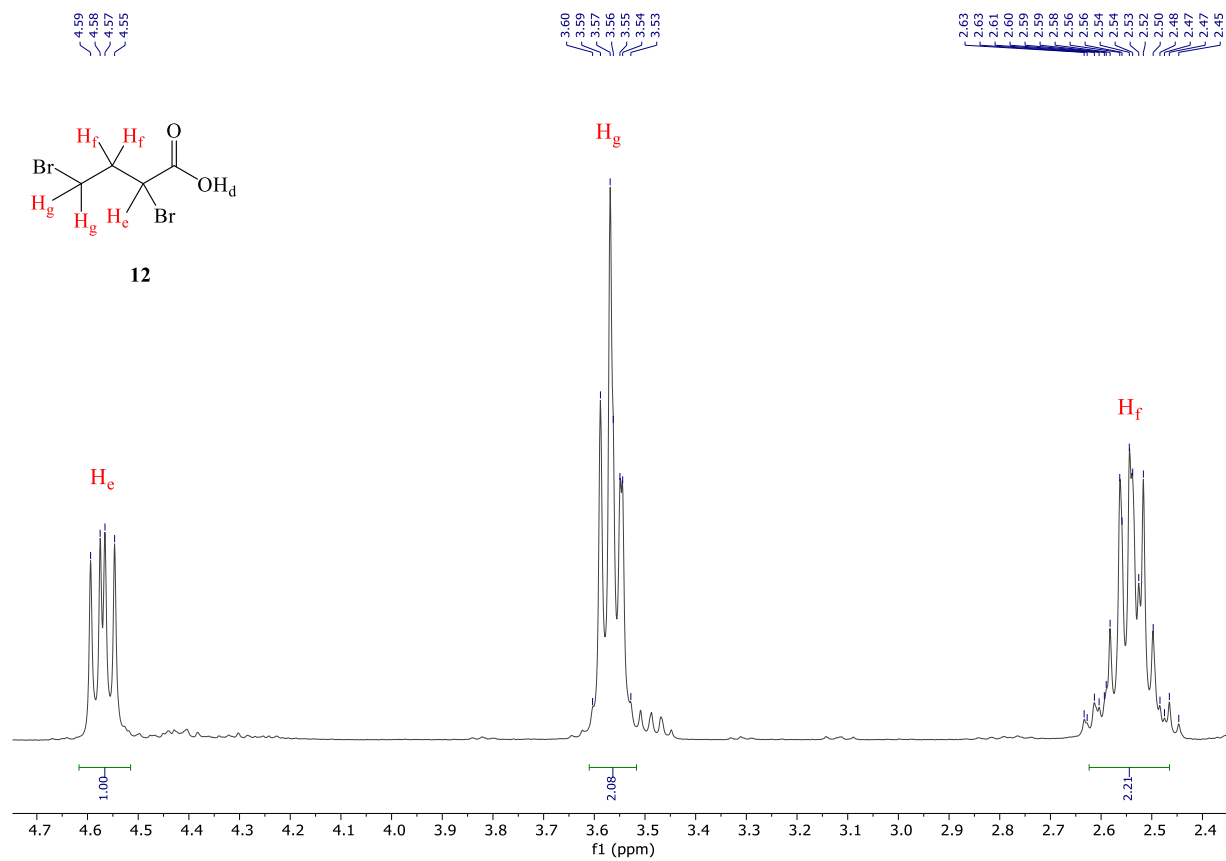
Reakcijska smjesa podvrgnuta je tekućinskoj kromatografiji na stupcu silika-gela u svrhu razdvajanja komponenti reakcijske smjese. Upotrebljavao se obični silika-gel uz sustav otapala A (tablica 3. poglavlje 3.1.) kao mobilna faza. Na TLC pločici otkrivena su tri spoja: 2,4-dibrombutanska kiselina koja se razvlači od početne linije prema gore, 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-on ($R_f = 0,26$) i spoj **1** ($R_f = 0,45$). Ovaj način pročišćavanja komponenti reakcijske smjese pokazao se kao loš izbor zbog toga što je prvih nekoliko frakcija sadržavalo sve komponente, a naknadne su frakcije sadržavale početni spoj (dihidrofuran-2(3*H*)-ona) i spoj **1**.

U svrhu izolacije 2,4-dibrombutanske kiseline korištena je preparativna TLC pločica, na koju je nanesen uzorak reakcijske smjese. Pločica je razvijena u sustavu otapala B, a spojevi su vizualizirani UV svjetiljkom pri 254 nm. Dio silika-gel preparativne pločice koji je sadržavao 2,4-dibrombutansku kiselinu odvojen je od stakla i suspendiran u DCM-u, te je filtriran preko celita. Nakon uparavanja otapala na rotacijskom uparivaču, dobivenoj svijetložutoj tekućini snimio se ^1H NMR spektar pri 300 MHz u CDCl_3 , a dobiveni spektar prikazan je na slici 6.

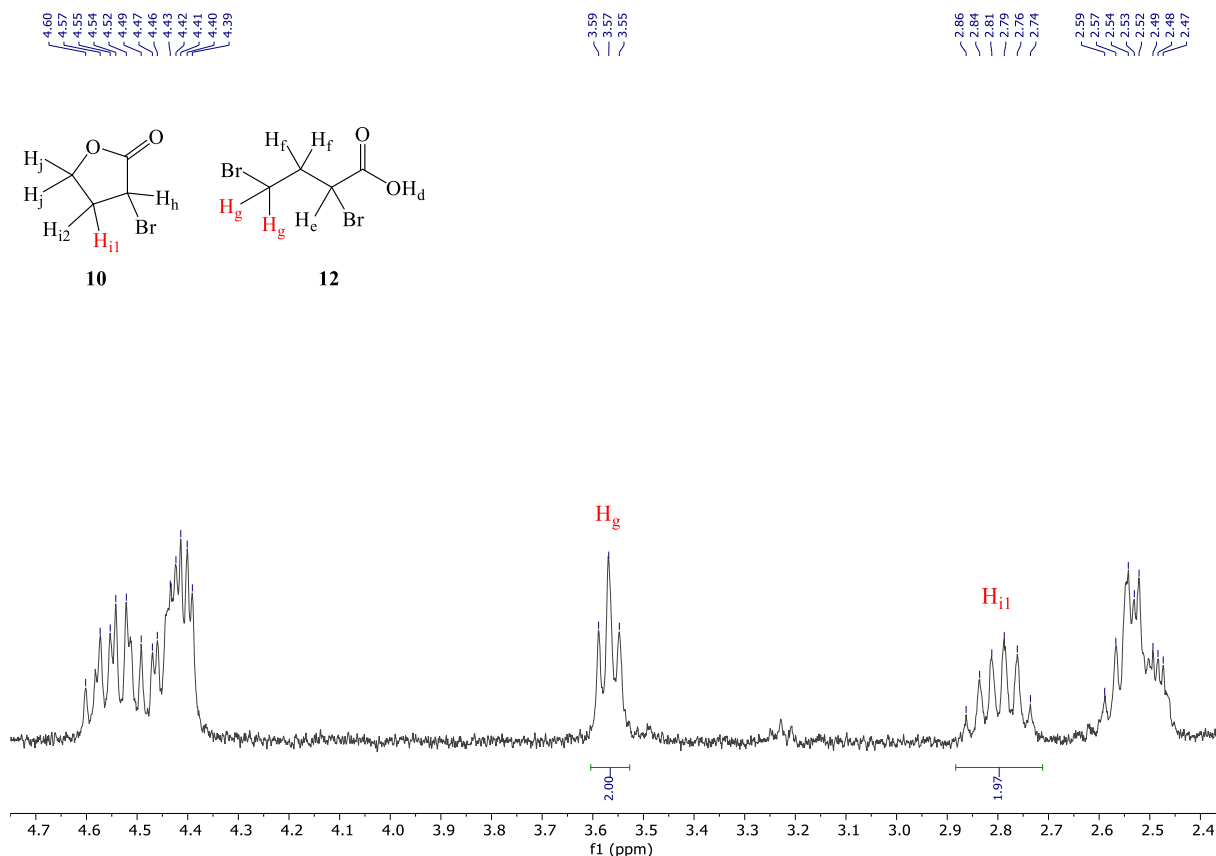


Slika 6. Uvećani dio ^1H NMR spektra spojeva izoliranih s preparativne TLC pločice na koju je nanjena smjesa dihidrofuran-2(3*H*)-ona, 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona (**1**) i 2,4-dibrombutanske kiseline.

Iz prikazanog spektra, a prema već definiranim svojstvenim signalima, vidljivo je da izolirana svijetložuta tekućina sadržava 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-on (**1**) i 2,4-dibrombutansku kiselinu. Osim toga, zanimljivo je opaziti da smjesa sadržava tri i pol puta veću količinu spoja **1** u odnosu na 2,4-dibrombutansku kiselinu. Ovakvi rezultati bili su neočekivani s obzirom na to da je izolirani dio silika-gela s preparativne pločice trebao očekivano sadržavati samo 2,4-dibrombutansku kiselinu. Jedino objašnjenje ovakvih rezultata je to da silika-gel katalizira ciklizaciju 2,4-dibrombutanske kiseline u spoj **1**. Da bi potvrdili ovu pretpostavku, naknadno izoliranoj 2,4-dibrombutanskoj kiselini snimio se ^1H NMR spektar pri 300 MHz i u CDCl_3 -u kao otapalu (slika 7.), te je u isti taj uzorak dodana mala količina silika-gela. Potom se silika-gel filtrirao nakon 16 sati stajanja na sobnoj temperaturi i istom se uzorku ponovno snimio ^1H NMR spektar (slika 8.).



Slika 7. ^1H NMR spektar (300 MHz, CDCl_3) 2,4-dibrombutanske kiseline.



Slika 8. ¹H NMR spektar (300 MHz, CDCl₃) dobivene smjese nakon dodatka silika-gela u otopinu 2,4-dibrombutanske kiseline u CDCl₃.

Dobiveni ¹H NMR spektri dokazuju pretpostavku da silika-gel katalizira nastanak spoja **1** iz 2,4-dibrombutanske kiseline. Analizom spektra (slika 7. i 8.) može se utvrditi da smjesa nakon 16 sati sadržava dva puta više spoja **1** u odnosu na 2,4-dibrombutansku kiselinu. Može se pretpostaviti da bi uz miješanje, duže stajanje i/ili zagrijavanje udio spoja **1** dobivenog iz 2,4-dibrombutanske kiseline bio i veći.

Prema Livaku i sur.⁴⁴ reakcijska smjesa destilira se pri sniženom tlaku pri čemu se 2,4-dibrombutanska kiselina prevodi u spoj **1** uz otpuštanje HBr-a. Pri izradi ovog rada iskušano je nekoliko različitih aparatura za destilaciju pri sniženom tlaku. Prva iskušana metoda destilacije uključivala je klasičnu destilaciju pri sniženom tlaku ($p = 0,5$ mmHg) u aparaturi po Claisenu. Međutim, tim postupkom u glavnoj frakciji dobivena je smjesa 3-dihidrofuran-2(3*H*)-ona (reaktant), 2,4-dibrombutanske kiseline (međuprodukt) i spoja **1** (produkt) zbog njihovih bliskih vrelišta. Također, dio reakcijske smjese u tikvici za destilaciju polimerizirao je zagrijavanjem na visokoj temperaturi ($\theta = 130$ °C). Analizom ¹H NMR spektara dobivenih frakcija utvrđena je smjesa reaktanta, međuprodukta i produkta. Ovakav rezultat nije bio

očekivan na temelju literature u kojoj se navodi da se tijekom destilacije pri sniženom tlaku ($p = 7$ mmHg, ($\theta = 120 - 140$ °C)) 2,4-dibrombutanska kiselina prevodi u spoj **1**. Naime, to se djelomično i događa s obzirom da je uočeno otpuštanje HBr-a, no dokazalo se da klasičnom destilacijom pri sniženom tlaku nije moguće odvojiti spoj **1** i 2,4-dibrombutansku kiselinu. S ciljem njihovog razdvajanja iskušana je vakuumska destilacija primjenom različitih aparatura od kojih je jedna sadržavala iznimno dugačku Vigreuxovu kolonu (kako bi se povećao broj teorijskih tavana i samim time povećala vjerojatnost odvajanja smjese spojeva), a druga aparaturu po Hickmannu. Frakcije dobivene korištenjem ovih dvaju aparatura također su sadržavale smjesu spoja **1** i 2,4-dibrombutanske kiseline, ali je uspješno dobiveno odvajanje početnog spoja, dihidrofurana-2(3H)-ona, što je bio napredak u odnosu na prvu korištenu aparaturu. Sljedeća korištena tehnika destilacije bila je tzv. *spinning band* (rotirajuća vrpca) destilacija kojom je dobiveno potpuno odvajanje spojeva u frakcije koje sadrže dihidrofurana-2(3H)-ona i 3-bromdihidrofurana-2(3H)-ona. Tehnika *spinning band* destilacije jedina je korištena metoda destilacije koja omogućava znatnu konverziju međuprodukta u željeni produkt **1**. Međutim, problem nastaje zbog toga što tijekom destilacije dolazi do otpuštanja HBr-a koji zatim reagira s inertnom željeznom mrežicom koja je središnji dio aparature za *spinning band*, te su sve frakcije onečišćene željezovim ionima. Na prisutnost željezovih iona upućivala je tamnocrvena boja svih frakcija i cijele aparature, a nakon izlaganja aparature zraku frakcije su poprimile narančastosmeđu boju. Spektar ^1H NMR-a potvrdio je postojanje metalnog iona u frakciji koja je sadržavala spoj **1**. Nepoželjna reakcija HBr-a i željezne mrežice izbjegla bi se uporabom *spinning band* aparature koja ima vrpcu napravljenu od teflona. Zadnja korištena tehnika destilacije bila je tzv. *Bulb-to-bulb* destilacija u aparaturi Kugelrohr (Büchi). Pri ovoj destilaciji dobivene su nešto bolje odvojene frakcije u odnosu na prethodne opisane metode (izuzev *spinning band* destilacije). Dobivena je frakcija koja je sadržavala samo neizreagirani početni spoj, potom frakcija koja je sadržavala smjesu početnog spoja i međuprodukta te frakcija koja je sadržavala samo 2,4-dibrombutansku kiselinu. Ovo je stoga metoda koja je uz *spinning band* dala najbolje rezultate, pri čemu bi se možda moglo bolje utjecati na razdvajanje postupnijim povećavanjem temperature i uporabom više kugli. Najveća korist ovog postupka bila je to što je u zadnjoj kugli zaostala samo 2,4-dibrombutanska kiselina koja je bila korisna u drugim analizama.

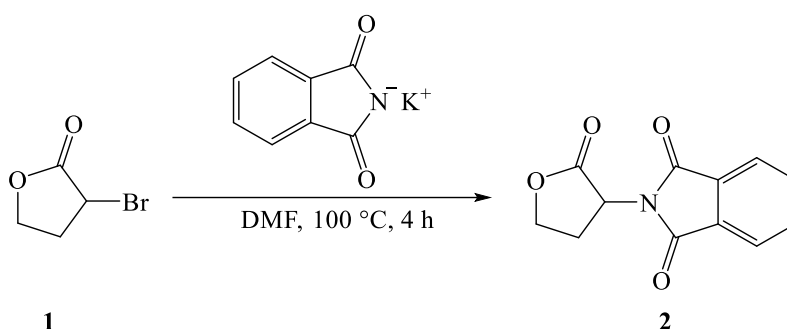
Dobiveni spoj **1** iz smjese spojeva nakon destilacije odijeljen je baznom ekstrakcijom i uparavanjem. Izabrane su frakcije koje su sadržavale samo 3-bromdihidrofurana-2(3H)-on i 2,4-

dibrombutansku kiselinu. Nakon dodatka zasićene otopine Na_2CO_3 primijećeno je razvijanje plina što je upućivalo na neutralizaciju Na_2CO_3 s pomoću prisutne 2,4-diaminobutanske kiseline koja je time prešla u oblik natrijeve soli. Ekstrakcijom DCM-om samo je spoj **1** prešao u organski sloj koji je zatim osušen nad bezvodnim Na_2SO_4 i uparen u vakuumu. Dobivenoj svijetložutoj tekućini snimljen je ^1H NMR spektar koji je potvrdio prisutnost spoja **1** čistoće oko 95 %.

4.1.2. Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**)

Priprava dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**) provodi se u tri reakcijska koraka koji uključuju: nukleofilnu supstituciju broma kalijevim ftalimidom, otvaranje laktonskog prstena drugom molekulom kalijeva ftalimida i hidrolizu.

Reakcijom spoja **1** s kalijevim ftalimidom dolazi do $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcije pri čemu se atom broma zamjenjuje s molekulom ftalimida, a kao produkt nastaje 2-(2-oksotetrahydrofuran-3-il)izoindolin-1,3-dion (**2**) (shema 11.).

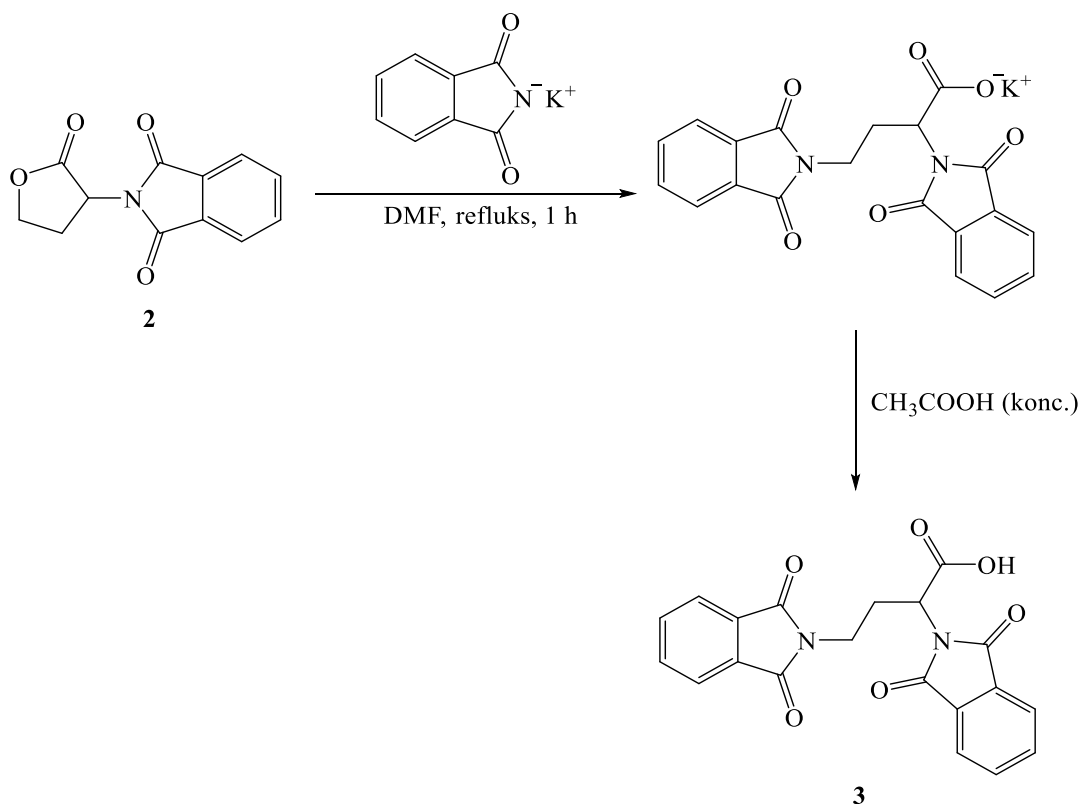


Shema 11. Reakcija dobivanja 2-(2-oksotetrahydrofuran-3-il)izoindolin-1,3-diona (**2**) iz 3-bromdihydrofuran-2(3H)-ona (**1**).

Reakcijom spoja **1** s kalijevim ftalimidom u DMF-u pri 100 °C pripremljen je spoj **2**. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Opaženo je da je nakon dva sata utrošen gotovo sav spoj **1**, a nakon četiri sata potpuno je utrošen spoj **1**. S obzirom na opaženo, promijenjen je postupak koji su opisali Talbot i sur.,⁵ odnosno vrijeme reakcije smanjeno je s dvanaest na četiri sata. Nakon što se reakcija zaustavila i ohladila, u reakcijsku smjesu dodala se hladna destilirana voda kako bi se potaklo taloženje spoja **2** koji je topljiv u DMF-u, ali ne i u vodi. Dodatak vode korisna je metoda izolacije spoja **2** zbog toga što potencijalno neizreagirani kalijev ftalimid ostaje otopljen u vodi, a taloži se samo spoj **2**. Nataloženi spoj **2** filtriran je i trebalo ga je osušiti. Najjednostavnija metoda sušenja bila je u sušioniku na 60 °C

preko noći. Nakon 16 sati dobiven je čisti, suhi spoj **2** svijetlosmeđe boje uz iskorištenje od 87,3 %.

Reakcijom spoja **2** s kalijevim ftalimidom dolazi do otvaranja laktonskog prstena spoja **2** pri čemu nastaje 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanske kiseline (**3**). Na shemi 12. prikazana je reakcija dobivanja spoja **3**.

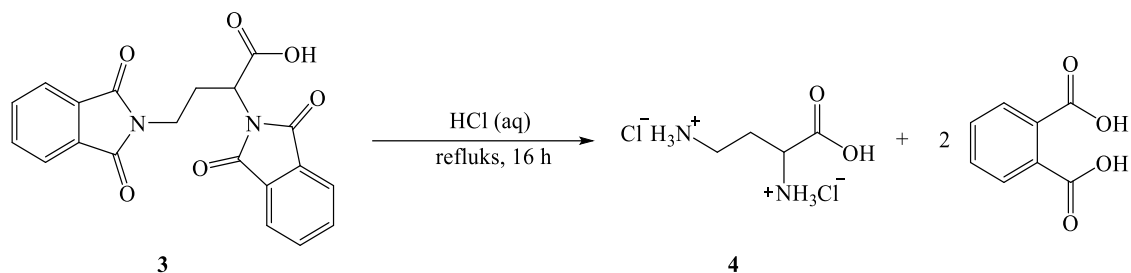


Shema 12. Reakcija dobivanja 2,4-bis(1,3-dioksoizoindolin-2-il)butanske kiseline (**3**) iz 2-(2-oksotetrahidrofuran-3-il)izoindolin-1,3-diona (**2**).

Reakcija spoja **2** i kalijeva ftalimida odvija se u DMF-u uz refluks. Ponovnim praćenjem tijeka reakcije opaženo je da reakcija završava već nakon jednog sata. Zbog toga je ponovno promijenjen postupak pripreve spoja **3** koji su Talbot i sur.⁵ opisali skraćanjem vremena reakcije sa sedam na jedan sat. Reakcija započinje trenutačno prilikom dodavanja kalijeva ftalimida u suspenziju spoja **2** u DMF-u, što je opaženo promjenom boje reakcijske smjese i njenim jakim zagrijavanjem, što pak upućuje na egzotermnost ove reakcije. Nakon što se potrošio sav spoj **2**, u reakcijsku smjesu dodana je ledena octena kiselina kako bi se protonirala karboksilna skupina spoja **3** koja nakon dodatka vode taloži isto kao i spoj **2**. Nakon filtriranja, a prije sušenja spoja **3**, trebalo je nekoliko puta isprati filtrat kako bi se uklonila zaostala octena kiselina. Prisutnost

octene kiseline ispitana je plavim lakmus papirom. Nakon sušenja u sušioniku na 60 °C preko noći dobiven je čisti spoj **3** svijetlosmeđe boje uz iskorištenje od 78,7 %.

Konačna reakcija u postupku dobivanja dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**) jest hidroliza spoja **3** (shema 13.).



Shema 13. Reakcija dobivanja dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**) iz 2,4-bis(1,3-dioaksoizoindolin-2-il)butanske kiseline (**3**).

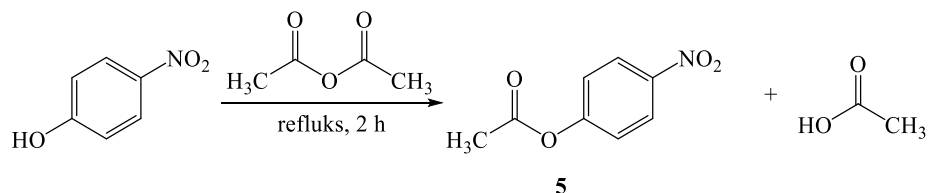
Hidroliza spoja **3** odvija se grijanjem u vodenoj otopini HCl-a ($v : v = 1 : 1$) uz refleks te se reakcijska smjesa ohladi nakon 16 sati. Topljivost ftalne kiseline u vodi pri 14 °C iznosi 0,54 g po 100 mL otopine.⁵⁵ Prema tome, nakon što se reakcijska smjesa ohladila, filtrirala se istaložena ftalna kiselina, a spoj **4** ostao je otopljen u matičnici. Nakon uparavanja vode na rotacijskom uparivaču u vakuumu spoj **4** sadržavao je malu količinu zaostale ftalne kiseline koja je uklonjena trituiranjem apsolutnim hladnim etanolom u kojem je ftalna kiselina dobro topljiva, a spoj **3** slabo topljiv. Zatim se spoj **4** osušio i dobivena je bijela, praškasta krutina uz iskorištenje od 70,9 %.

4.1.3. Priprava 4-nitrofenil-acetata (**5**)

U reakciji u kojoj hidroksilna skupina 4-nitrofenola nukleofilno napada karbonilni ugljik acetanhidrida nastaje 4-nitrofenil-acetat (**5**). Kao međuprodukt nastaje tetraedarski međuprodukt koji se vrlo brzo raspada i daje spoj **5** i octenu kiselinu.

Priprava spoja **5** vrlo je jednostavna i uključuje refleksiranje 4-nitrofenola u anhidridu octene kiseline (shema 14.). Nakon dva sata reakcija se prekinula i ohladila prije obrade reakcijske smjese. U ohlađenu reakcijsku smjesu dodala se vodena otopina Na_2CO_3 ($w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 20\%$) kako bi se neutralizirala octena kiselina i kako bi se hidrolizirao suvišak anhidrida octene kiseline. Nakon što je sav anhidrid octene kiseline hidroliziran i sva octena

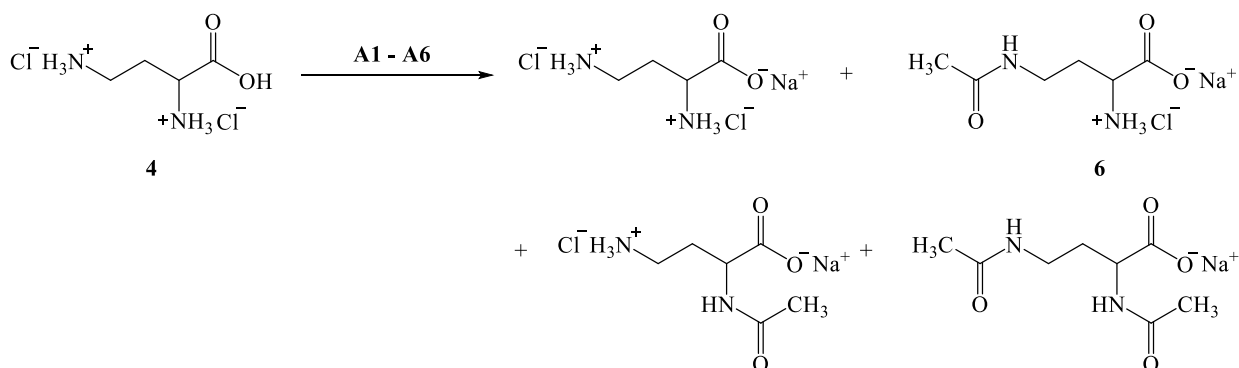
kiselina prevedena u sol, reakcijska smjesa ekstrahirala se DCM-om pri čemu je samo spoj **5** prešao u organski sloj. Nakon uparavanja DCM-a na rotacijskom uparivaču dobivena je svijetložuta, praškasta krutina spoja **5** uz iskorištenje 98,4 %.



Shema 14. Reakcija dobivanja 4-nitrofenil-acetata (**5**) iz 4-nitrofenola.

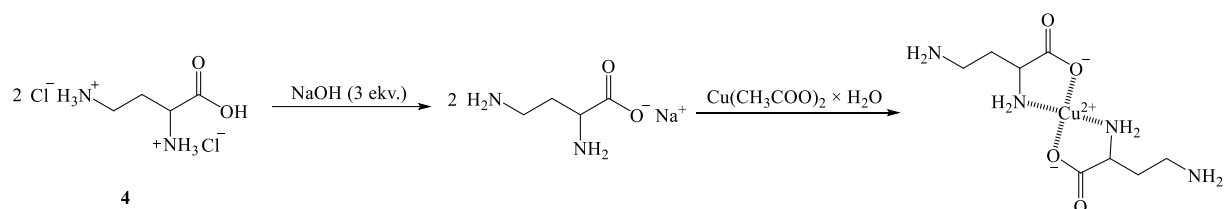
4.1.4. Priprava *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline (**6**)

Provedena je priprava dva strukturna izomera *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline na dva načina opisana u poglavlju 3.2.6. Prvi način priprave bio je reakcija dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**) i 4-nitrofenil-acetata (**5**) u bazičnim uvjetima. Ispitano je ukupno šest modifikacija općenitog postupka koji je opisan u već spomenutom poglavlju. Prema literaturi očekivani su produkti bili 4-acetamido-2-aminobutanska kiselina i 2-acetamido-4-aminobutanska kiselina u različitim omjerima ovisno o količini dodane baze. ¹H NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom eksperimentalno je uočeno da u svakoj od šest modifikacija općenitog postupka priprave *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline dolazi do nastanka različitog omjera 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline i 2-acetamido-4-aminobutanske kiseline, a uz ova dva izomera nastaje i 2,4-diacetamidobutanska kiselina. Također je primijećeno da zaostaje mali dio neizreagiranoj spoja **4** (shema 15.).



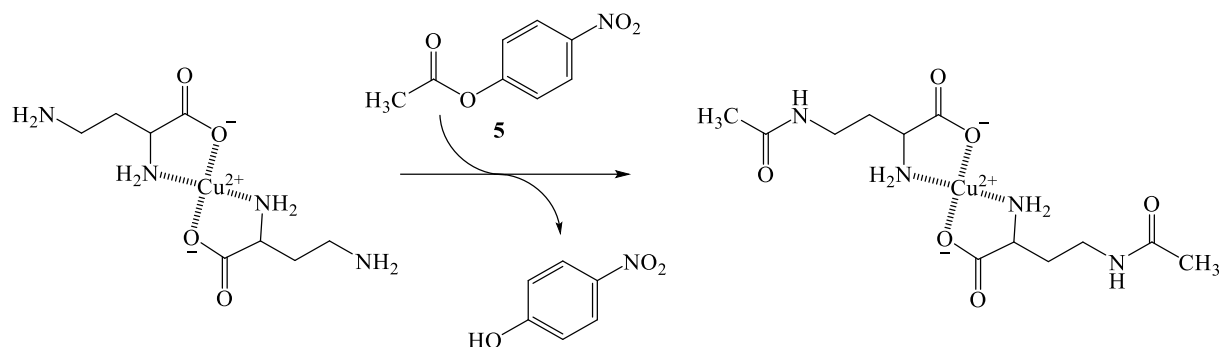
Shema 15. Prikaz produkata nastalih u reakciji *N*-acetiliranja dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**3**) općenitim postupkom opisanim u poglavlju 3.2.6.

Takva smjesa četiriju različitih produkata problematična je zbog otežane izolacije željenih produkata. Za sintezu ektoina potrebna je mono *N*-acetilirana 2,4-diaminobutanska kiselina, pri čemu nije važno je li ona acetilirana na poziciji 2 ili 4 jer ciklizacija obaju izomera daje ektoin kao produkt. Zbog toga je važno iz reakcijske smjese ukloniti neizreagirani reaktant (**4**) i diacetilirani produkt koji je nereaktivan u sljedećem koraku. Izolaciju monoacetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline iz dobivene smjese komplicira kemijska priroda spojeva prisutnih u reakcijskoj smjesi, a prijedlog izolacije korištenje je ionsko-izmjenjivačke kromatografije. Stoga se razmotrio drugi sintetski put za pripravu monoacetiliranog derivata spoja **4** koji uključuje kompleksaciju bakrovim(II) ionima i zatim acetilaciju 4-nitrofenil-acetatom. Bakrovi(II) ioni kompleksiraju se dvjema molekulama 2,4-diaminobutanske kiseline tako što bakrovi(II) ioni koordiniraju hidroksilnu skupinu i α -aminoskupinu iz dviju 2,4-diaminobutanskih kiselina (**4**) (shema 16.).



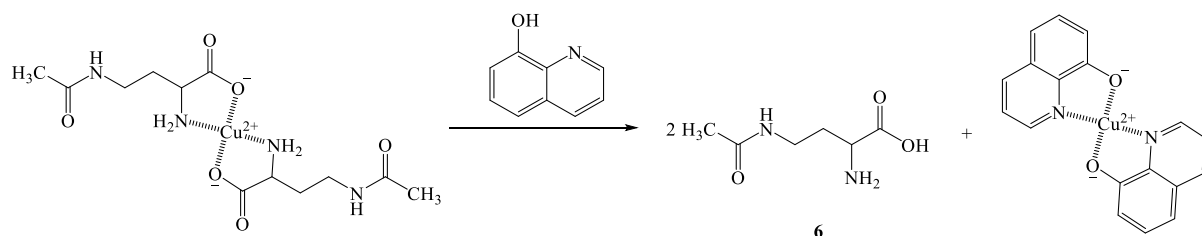
Shema 16. Kompleksiranje dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**) bakrovim(II) ionima.

Na ovaj način se selektivno štiti α -aminoskupina, a do acetilacije može doći samo na terminalnoj, γ -aminoskupini čime se kao produkt dobiva monoacetilirana 2,4-diaminobutanska kiselina (**6**) (shema 17.).



Shema 17. Selektivna monoacetilacija 2,4-diaminobutanske kiseline kompleksirane bakrovim(II) ionima 4-nitrofenil-acetatom (**5**) pri čemu dolazi do otpuštanja 4-nitrofenola i nastanka kompleksa između bakrovog(II) iona i dvije molekule 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline.

Prednost ove metode iznimno je jednostavna priprema i izolacija dobivenog monoacetiliranog produkta (**6**). Postupak započinje otapanjem dihidroklorida 2,4-diaminobutanske kiseline (**4**) i neutralizacijom s pomoću NaOH čime se dobiva natrijev 2,4-diaminobutanoat koji se nakon dodatka s bakrovim(II) acetatom monohidratom kompleksira bakrovim(II) ionima. U otopinu koja sadržava kompleks bakrova(II) iona i 2,4-diaminobutanske kiseline dodaje se otopina 4-nitrofenil-acetata (**5**) u acetonu koji služi kao reagens za acetilaciju terminalne, γ -aminoskupine 2,4-diaminobutanske kiseline. Nastali kompleks bakrova(II) iona i 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline netopljiv je u smjesi vode i acetona te se izolira filtracijom i ispiranjem istom smjesom vode i acetona, pri čemu u vodi ostaje neizreagirani spoj **4**, spoj **5** i natrijev acetat. Dobivanje spoja **6** iz nastalog kompleksa postiže se dodavanjem otopine 8-hidroksikinolina u suspenziju koja sadržava navedeni kompleks pri čemu se 8-hidroksikinolina snažnije kompleksira bakrovim(II) ionima i time se oslobađa spoj **6** (shema 18.).

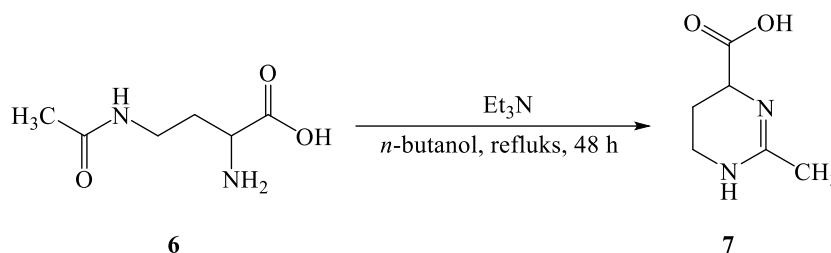


Shema 18. Kompleksiranje bakrovih(II) iona dvama ekvivalentima 8-hidroksikinolina čija je svrha oslobađanje dvaju ekvivalenata 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline (**6**).

Oslobodeni spoj **6** topljiv je u vodi, dok je kompleks bakrova(II) iona i 8-hidroksikinolina netopljiv što olakšava izolaciju. Novonastali kompleks, kao i 8-hidroksikinolin, filtriraju se, a matičnica koja sadržava spoj **6** upari se u vakuumu. U slučaju zaostatka 8-hidroksikinolina u matičnici potrebno ju je ekstrahirati etil-acetatom što u većini slučajeva nije potrebno ako je dodana dovoljna količina vode. Opisanom se metodom ciljano dobiva produkt koji je potreban za zadnju reakciju u sintetskom putu pripreve ektoina (**7**) bez komplicirane izolacije i uz visoko iskorištenje ($\eta = 82,4\%$).

4.1.5. Priprava (\pm)-ektoina (**7**)

Priprava racemične smjese ektoina zasniva se na termičkoj ciklizaciji *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline, odnosno 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline (spoj **6**) (shema 19.).



Shema 19. Termička ciklizacija 4-acetamido-2-aminobutanske (**6**) kiseline u ektoin (**7**).

Spoj **6** suspendira se u *n*-butanolu pa se nakon dodavanja trietilamina zagrijava uz refluks 48 sati. Nakon 48 sati opaža se bistra žućkasta otopina koja u reakciji s ninhidrinom ne daje pozitivan test što ukazuje na nepostojanje slobodne aminoskupine, odnosno završetak ciklizacije. Hlađenjem spoj **7** taloži, a budući da reakcija ide kvantitativno, cijela reakcijska smjesa upari se na rotacijskom uparivaču do suhoga. U svrhu pročišćavanja nastalog sirovog ektoina (**7**) primjenjuje se trituranje hladnim apsolutnim etanolom kako bi se iz žute sirove reakcijske smjese neugodnog mirisa dobio blijedo žućkasti prah bez mirisa. Iskorištenje reakcije iznosi 62,7 %, a bolji prinos reakcije mogao bi se postići promjenom metode pročišćavanja. U prethodnom postupku, kada je sintetizirana količina ektoina (**7**) bila znatno manja, za pročišćavanje se upotrebljavala ionsko-izmjenjivačka kromatografija. Kromatografska kolona napunila se jakim kationskim izmjenjivačem (*Amberlite IR120 H⁺*) koji se prvo isprao s nekoliko volumena razrijeđene otopine HCl-a, a zatim i s nekoliko volumena vode i etanola. Na ionsko-izmjenjivačku kolonu nanesen je sirovi produkt reakcije termičke

ciklizacije spoja **6** koji je prethodno otopljen u vodi i zakiseljen do $\text{pH} = 2$ s HCl-om kako bi se spoj **7** u potpunosti protonirao. Zatim se spoj nanio na kolonu i kolona je isprana s nekoliko volumena vode i apsolutnog etanola. Kada su se sve nečistoće isprale s kromatografske kolone, ektoin (**7**) je potom ispran pomoću 3 mol/dm^{-3} vodene otopine NH_3 . Nakon što se sav ektoin (**7**) isprao s kolone, spojene su frakcije i uparene na rotacijskom uparivaču. Korištena kolona regenerira se propuštanjem vodene otopine HCl-a. Iskorištenje nakon pročišćavanja na ionsko-izmjenjivačkoj koloni iznosilo je 82,3 %. Dakle, iskorištenje same reakcije ovisi o preferiranom načinu izolacije i pročišćavanja pri čemu treba izabrati između brže i jednostavnije metode, odnosno trituriranja ili nešto dugotrajnije, ali općenito bolje metode ionsko-izmjenjivačke kromatografije.

Znatno bolje iskorištenje dobiveno tijekom ovog rada, u odnosu na iskorištenje koje su objavili Bazureau i sur., a koje je iznosilo 50 % nakon izolacije i pročišćavanja, prepisuje se neadekvatnoj metodi pripreme *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline. Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, metodom kojom su autori pripremali dva strukturna izomera *N*-acetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline ne mogu se pripremiti isključivo ti strukturni izomeri nego dolazi do nastanka i diacetilirane 2,4-diaminobutanske kiseline koja je nereaktivna tijekom termičke ciklizacije. 2,4-Diacetamidobutanska kiselina ne sadrži slobodnu aminoskupinu zbog čega ne može doći do nukleofilnog napada na karbonilni ugljik acetilne skupine. Drugim riječima, autori su vjerojatno dobili znatno niže iskorištenje reakcije termičke ciklizacije, koja je u ovom radu išla uz iskorištenje od 82,3 %, zbog korištenja smjese koja je sadržavala i nereaktivni produkt prethodne reakcije, a koji se u radu kojeg su napisali Bazureau i sur. ne spominje.

4.2. Odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina

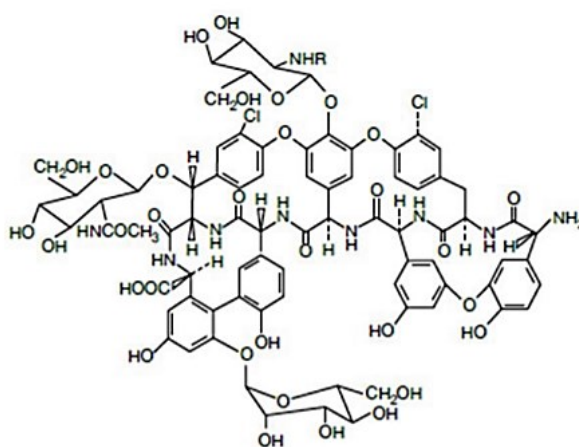
Odvajanje enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti moguće je postići izravnim ili neizravnim metodama. Neizravne metode uključuju derivatizaciju enantiomera kiralnim reagensom prije analize. Takvi se derivatizirani spojevi zatim odjeljuju na akiralnim stacionarnim fazama. S druge strane, izravne metode uključuju separaciju enantiomera u izvornom obliku. Jedna izravna metoda uključuje dodatak kiralnih aditiva u mobilnu fazu i odvajanje na akiralnim stacionarnim fazama, a druga izravna metoda uključuje uporabu kiralnih stacionarnih faza. Uporaba kiralnih stacionarnih faza danas je najčešće korištena metoda odvajanja enantiomera, pa se prema tome upotrebljavala i u ovom radu. Do sad se u literaturi ne nalazi ni jedan primjer odjeljivanja enantiomera (+)-ektoina.

Postoji više podskupina kiralnih stacionarnih faza, a u svrhu odvajanja (\pm)-ektoina ispitano je nekoliko različitih podskupina kiralnih stacionarnih faza, uključujući one koje sadržavaju derivatizirane polisaharide (celulozu i amilozu), „čtkolike“ stacionarne faze i na kraju stacionarna faza koja sadržava makrociklički selektor, odnosno makrociklički glikopeptid (*teicoplanin*).

Tijekom razvoja metode odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina postojali su neki ograničavajući čimbenici. To se u prvom redu odnosi na topljivost (\pm)-ektoina. Zbog svog ionskog karaktera (\pm)-ektoin jako je topljiv u vodi, dobro topljiv u MeOH, slabo topljiv u EtOH i ACN-u te izrazito netopljiv u nepolarnim organskim otapalima. To je ograničavalo izbor otapala za pripremu mobilnih faza na navedena četiri polarna otapala, stoga se upotrebljavala kromatografija obrnutih faza. Nadalje, ektoin je po svojoj strukturi mala, organska molekula koja se nalazi u obliku *zwitter*-iona bez znatnih kromofora. Ektoin također ne sadržava π - π sustav, što onemogućava π - π interakcije s odabranim kiralnim selektorima. Interakcije koje ektoin može tvoriti uključuju vodikove veze, elektrostatske i dipol-dipol interakcije te interakcije prijenosa naboja. Kako bi se enantiomeri odijelili, moraju stvarati neku vrstu interakcija sa stacionarnom fazom. Interakcije mogu biti privlačne i odbojne, a između molekule i stacionarne faze može doći do jednostruke interakcija ili ih se može tvoriti više. Međutim, da bi došlo do odjeljivanja enantiomera, barem jedna od njih mora biti stereokemijski ovisna.

Odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina ni na polisaharidnim stacionarnim fazama i na „čtkolikoj“ stacionarnoj fazi nije dalo rezultata (metode **1 – 15**, tablica 7.). Zbog same kemijske prirode ektoina nije dolazilo do dovoljno interakcija sa stacionarnom fazom, pa se

zbog toga ektoin bez zadržavanja eluirao s kiralne stacionarne faze. Promjenom mobilne faze nije postignuto veće zadržavanje ektoina na stacionarnoj fazi, a samim time nije dolazilo ni do odvajanja enantiomera. S druge strane, gotovo sve ispitane metode na kiralnoj stacionarnoj fazi koja sadržava makrociklički glikopeptid *teicoplanin* (metode **16** – **35**, tablica 7.) završile su odvajanjem enantiomera. Uspješnost odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina na kiralnoj stacionarnoj fazi koja sadrži makrociklički glikopeptid *teicoplanin* (slika 9.) posljedica je mogućnosti stvaranja različitih molekularnih interakcija (\pm)-ektoina i stacionarne faze, a koje ponajviše uključuju ionske interakcije, vodikove veze i dipol-dipol interakcije.



Slika 9. Prikaz strukture makrocikličkog glikopeptida *teicoplanina*.

Odvajanje enantiomera obilježeno je retencijskim vremenima enantiomera (t_{R1} i t_{R2}), faktorima zadržavanja enantiomera (k_1 i k_2), separacijskim faktorom (α) i razlučivanjem (R_s). Vrijednosti navedenih kromatografskih veličina za odabrane metode prikazane su u tablici 9. Retencijska vremena dobivena su iz kromatograma, dok se ostale veličine mogu izračunati prema jednadžbama (1) – (5).

Faktor zadržavanja:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Separacijski faktor:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (2) \text{ ili } \alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (3)$$

Razlučivanje:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (4) \text{ ili } R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} - w_{b2}} \quad (5)$$

Tablica 9. Kromatografske veličine kojima se obilježava odvajanje enantiomera za odabrane metode odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina iz tablice 7.

| Metoda | Retencijsko vrijeme, t_{R1} (min) | Retencijsko vrijeme, t_{R2} (min) | Faktor zadržavanja, k_1 | Faktor zadržavanja, k_2 | Separacijski faktor, α | Razlučivanje, R_s |
|--------|--|--|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 16 | 11,703 | 42,230 | 5,937 | 24,033 | 4,048 | 5,629 |
| 20 | 7,560 | 21,757 | 3,428 | 11,744 | 3,426 | 6,907 |
| 21 | 7,180 | 19,627 | 3,215 | 10,522 | 3,273 | 7,269 |
| 22 | 6,723 | 17,377 | 2,953 | 9,215 | 3,121 | 7,726 |
| 23 | 7,750 | 21,770 | 2,653 | 9,262 | 3,491 | 8,824 |
| 24 | 7,380 | 19,340 | 2,391 | 7,887 | 3,299 | 8,787 |
| 25 | 3,567 | 8,770 | 2,181 | 6,821 | 3,127 | 7,755 |
| 26 | 2,927 | 7,007 | 2,104 | 6,432 | 3,057 | 7,797 |
| 27 | 5,803 | 10,073 | 1,902 | 4,037 | 2,123 | 6,123 |
| 28 | 3,827 | 6,487 | 1,353 | 2,988 | 2,208 | 5,515 |

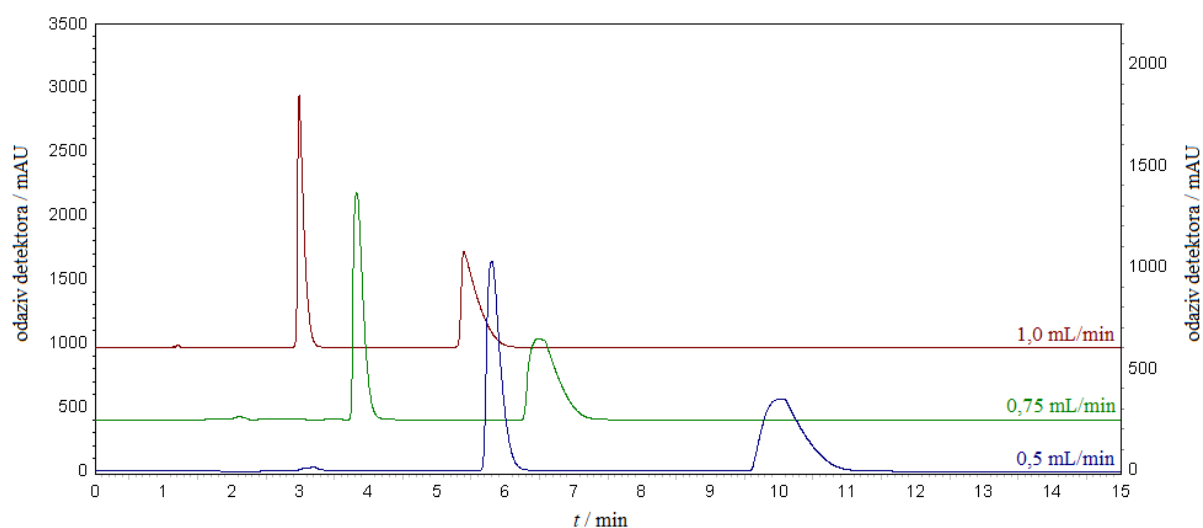
| | | | | | | |
|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 29 | 2,987 | 5,397 | 1,471 | 3,465 | 2,356 | 7,742 |
| 30 | 3,057 | 5,350 | 1,712 | 3,375 | 1,971 | 8,487 |
| 31 | 2,800 | 4,647 | 1,410 | 3,000 | 2,128 | 7,526 |
| 32 | 2,720 | 4,300 | 1,365 | 2,738 | 2,006 | 7,242 |
| 33 | 3,047 | 6,053 | 0,792 | 2,561 | 3,234 | 7,104 |
| 34 | 2,320 | 3,683 | 0,444 | 1,293 | 2,912 | 5,475 |
| 35 | 7,597 | 13,207 | 3,905 | 7,528 | 1,928 | 7,431 |

Tijekom razvoja optimalne metode za odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina na ChiralT koloni mijenjani su sljedeći parametri: mobilna faza, temperatura i protok. U najvećem su se broju metoda kao mobilna faza upotrebljavali metanol i voda u različitim volumnim udjelima. Ispitan je utjecaj dodavanja mravlje kiseline (0,1 % i 0,01 %) i trietilamina (0,01 %) te pufera amonijeva formijata (0,025 mol/dm³, pH = 3,0). Na kraju se ispitao i utjecaj temperature (30 – 40 °C) i protoka (0,5 – 1,2 mL/min) za odabrane metode.

Dodavanjem mravlje kiseline u MeOH (metode **17** i **18**) došlo je do znatnog smanjenja retencijskih vremena pikova. Osim toga, pikovi obaju enantiomera bili su nepravilni, tj. uočava se velik *fronting* i širine su pikova jako velike, što dovodi do jako niske razlučivosti. S druge strane, dodavanjem trietilamina (metoda **19**) došlo je do nastajanja ionskog para između ektoina i trietilamina, što je dovelo do jako dugog razvlačenja po kromatografskoj koloni.

Uporabom pufera amonijeva formijata (metode **33** i **34**) dobiveni su dobri rezultati, ali nešto bolji rezultati dobiveni su uporabom samo vode i MeOH kao mobilne faze. Zbog toga što se razmatrao i *scale-up* u svrhu preparativne izolacije (+)- i (-)-ektoina, pufer se nije uzeo u obzir kao dio mobilne faze zbog potrebe za naknadnim uklanjanjem amonijeva formijata koji je sastavni dio korištenog pufera.

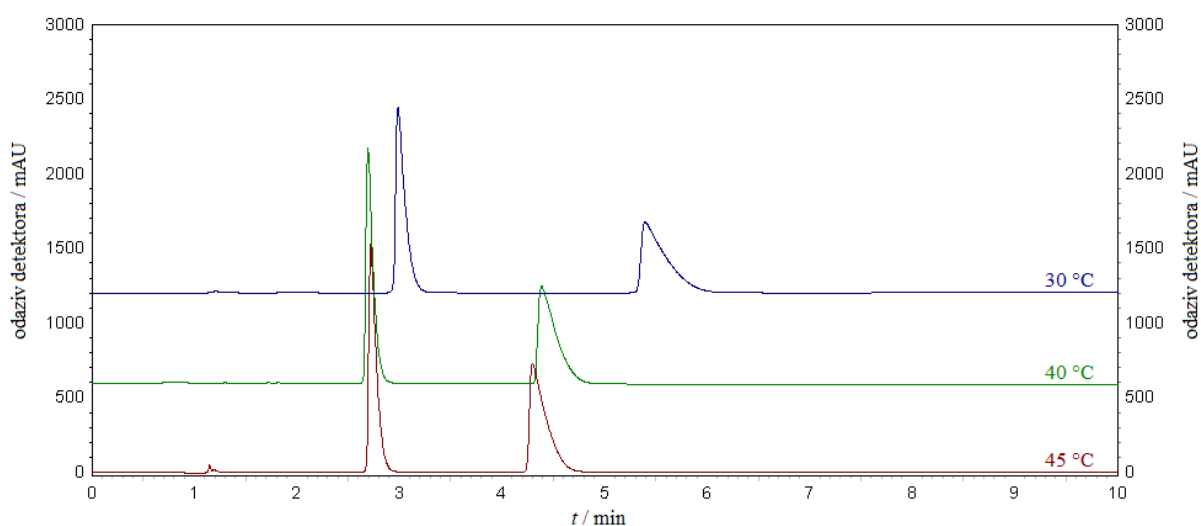
Utjecaj protoka na odjeljivanje enantiomera ispitalo se nakon što je optimalan volumni udio vode i metanola određen kao 1 : 1. Na slici 10. prikazani su kromatogrami metoda **27**, **28** i **29**.



Slika 10. Kromatogrami odjeljivanja enantiomera (\pm)-ektoina na temelju metoda **27** (plavo), **28** (zeleno) i **29** (crveno) koji prikazuju ovisnost kromatografskih parametara o protoku.

Iz prikazanih kromatograma vidljivo je da povećanje protoka uzrokuje niža retencijska vremena obaju enantiomera, odnosno skraćuje se vrijeme analize. Nadalje, povećanjem protoka dobivaju se i pikovi pravilnijeg, simetričnijeg izgleda. Oba navedena razloga upućuju na to da je metoda **29** superiorna u odnosu na druge dvije, a to potvrđuju i brojčane vrijednosti kromatografskih parametara navedenih u tablici 9. Metodom **29** dobiva se bolji separacijski faktor i bolje razlučivanje u odnosu na druge dvije metode. Povećanje protoka ne mora nužno značiti da će se dobiti bolje odjeljivanje enantiomera, no u ovom primjeru je to upravo slučaj.

Nadalje, ispitana je i ovisnost odjeljivanja enantiomera (\pm)-ektoina o temperaturi, pa su tako na slici 11. prikazani kromatogrami dobiveni metodama **29**, **31** i **32**.

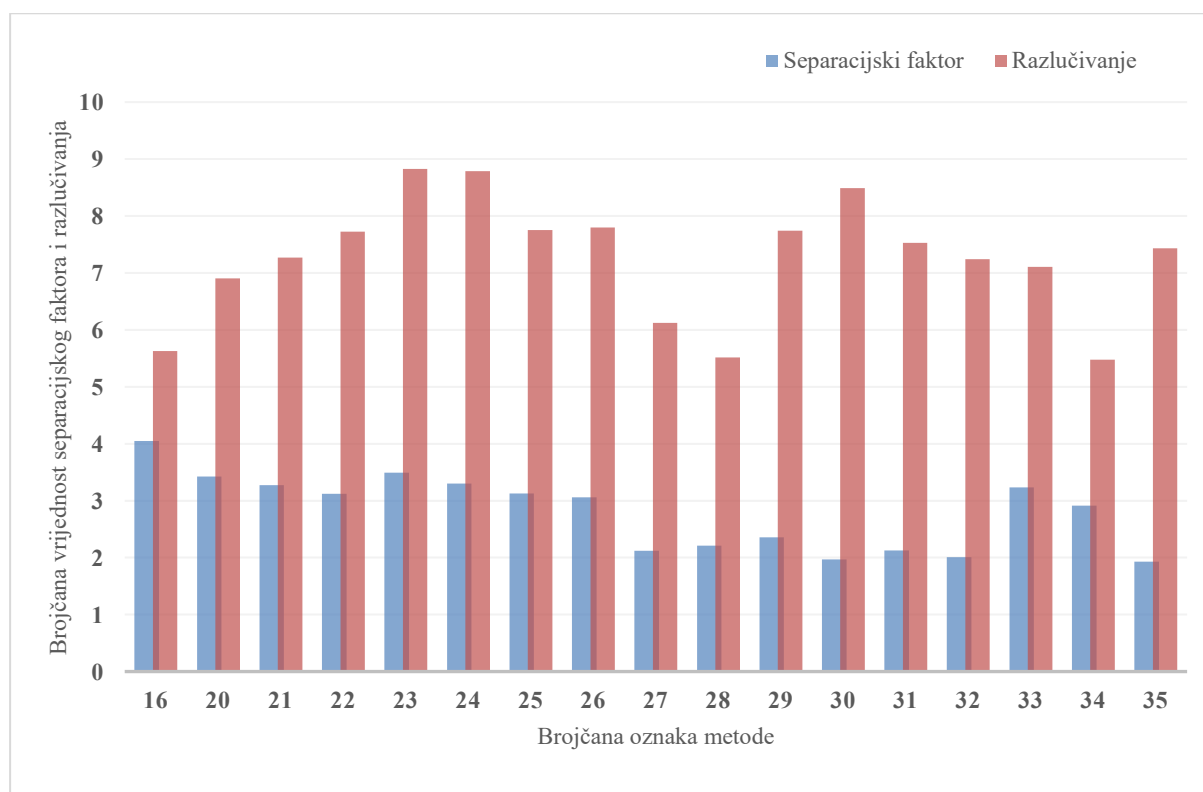


Slika 11. Kromatogrami odjeljivanja enantiomera (\pm)-ektoina na temelju metoda **29** (plavo), **31** (zeleno) i **32** (crveno) koji prikazuju ovisnost kromatografskih parametara o temperaturi.

Iz prikazanih kromatograma vidi se da povećanje temperature, slično kao i povećanje protoka, uzrokuje manja retencijska vremena obaju enantiomera, odnosno kraće vrijeme analize. Također, višom temperaturom, isto kao i većim protokom, dobivaju se pikovi pravilnijeg, simetričnijeg izgleda, odnosno dolazi do smanjenja *tailinga*. Vidimo da je u ovom slučaju metoda **29**, metoda s „najlošijim“ kromatogramom, a u prethodnom je odlomku imala „najbolji“ kromatogram. Dakle, može se zaključiti da i nakon odabira mobilne faze ima mjesta za poboljšanje odjeljivanja enantiomera varijacijom temperature i protoka.

Kako bi se lakše uočila metoda s optimalnim razlučivanjem (+)- i (-)-ektoina, odabrani podaci iz tablice 9. prikazani su i grafički. Graf u kojem su prikazane vrijednost separacijskih

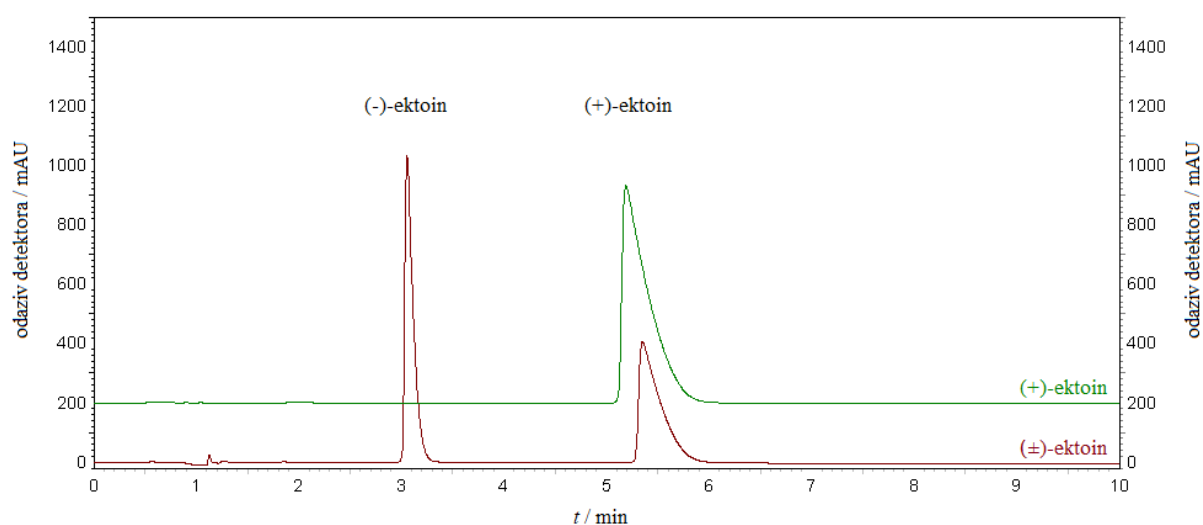
faktora i razlučivanja za odabrane metode koje su se pokazale kao pogodne za odvajanje enantiomera prikazan je na slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz vrijednosti separacijskog faktora (plavo) i razlučivanja (crveno) za analitičke metode odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina koje su pokazale zadovoljavajuće rezultate.

Općenito, ako je vrijednost R_s jednaka ili veća od 1,5 postiže se odvajanje pikova istih površina od 99,7 %. Iz grafa koji se nalazi na slici 12. moguće je vidjeti da se metodama **23**, **24** i **30** dobije najbolje razlučivanje pikova. Iz tablice 9. može se iščitati da razlučivanje kod navedenih metoda iznosi 8,824, 8,787 i 8,487. Dok se kod svih metoda prikazanih na slici 12. dobiva dobro razlučivanje pikova čije vrijednosti iznose između 5,475 i 7,797.

Kao optimalna metoda za odjeljivanja enantiomera (\pm)-ektoina odabrana je metoda u kojoj je mobilna faza MeOH : H₂O = 1 : 1, temperatura 35 °C, a protok 1,0 mL/min (metoda **30**). U svrhu određivanja (+)- i (-)-enantiomera istom je metodom analiziran i uzorak (+)-ektoina koji je komercijalno dostupan i dobiveni su kromatogrami prikazani na slici 13.



Slika 13. Kromatogrami (+)-ektoina (zeleno) i (±)-ektoina (crveno) (metoda **30**) iz kojih se može odrediti (+)- i (-)-enantiomer.

Iz slike 13. može se vidjeti da (-)-enantiomer ektoina izlazi prvi, odnosno ima manje retencijsko vrijeme, dok (+)-enantiomer ektoina izlazi drugi, odnosno ima veće retencijsko vrijeme.

Metoda **30** izabrana je kao optimalna iako metode **23** i **24** imaju nešto bolje kromatografske parametre. Razlozi odabira metode **30** kao optimalne su: mobilna faza s manjim udjelom MeOH, veći protok i pravilniji oblik pikova. Tijekom odvajanja enantiomera (±)-ektoina korištena su otapala koja pogoduju zelenoj kemiji, stoga se korištenje metodom sa što manjim udjelom MeOH smatralo pozitivnim. Međutim, nedostatak uporabe većeg udjela vode tijekom analiza jest visok tlak unutar kromatografskog sustava, što je ograničavalo dopušteni udio vode na 50 % kako ne bi došlo do oštećenja kromatografskog sustava i ChiralT kolone. Većim protokom u metodi **30** u odnosu na metode **23** i **24** postignuto je kraće vrijeme analize s jednako dobrim razlučivanjem. Većim protokom, većim udjelom vode i višom temperaturom dobiveni su pikovi pravilnijeg oblika, odnosno *tailing* svih pikova proporcionalno se smanjivao povećavanjem svih triju parametara. Pretpostavlja se da bi se većim udjelom vode, višom temperaturom i većim protokom odvajanje enantiomera moglo još poboljšati, no to nije bilo moguće izvesti zbog ograničenja kromatografskog sustava i ChiralT kolone. Zbog svega navedenog ova je metoda prihvaćena kao najbolja metoda za odjeljivanje enantiomera (±)-ektoina. Navedena metoda pogodna je za *scale-up* jer se upotrebljavaju jeftina i lako dostupna otapala. Osim toga, u mobilnu fazu nije potrebno dodavati ni kiselinu ni bazu jer je pokazano

da se dodavanjem mravlje kiseline i trietilamina dobiva lošije razlučivanje pikova. Nadalje, dodavanjem pufera nisu dobiveni mnogo bolji rezultati, pa se dodatak pufera isto tako može izbjeći. Najveće ograničenje kod *scale-upa* isto je kao i kod odjeljivanja enantiomera na analitičkoj ljestvici, a uključuje nužnost uporabe stacionarne faze koja sadržava kiralne selektore koji su pogodni za odjeljivanje enantiomera nederivatiziranih (a)cikličkih aminokiselina koje se nalaze u obliku *zwitter*-iona.

4.3. Ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina u hranjivom mediju

Prethodno pripremljeni uzorci hranjivih medija u kojima su rasli različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.* izolirani iz sedimenta Jadranskog mora analizirani su u svrhu provjere prisutnosti prirodnog spoja (+)-ektoina. Neki su sojevi uzgajani u hranjivim medijima s gradijentom masenog udjela NaCl, a neki su sojevi uzgajani samo u hranjivom mediju koji je sadržavao 9 % NaCl. Svi sojevi, kao i udio NaCl te prisutnost (+)-ektoina u hranjivom mediju prikazani su u tablici 10.

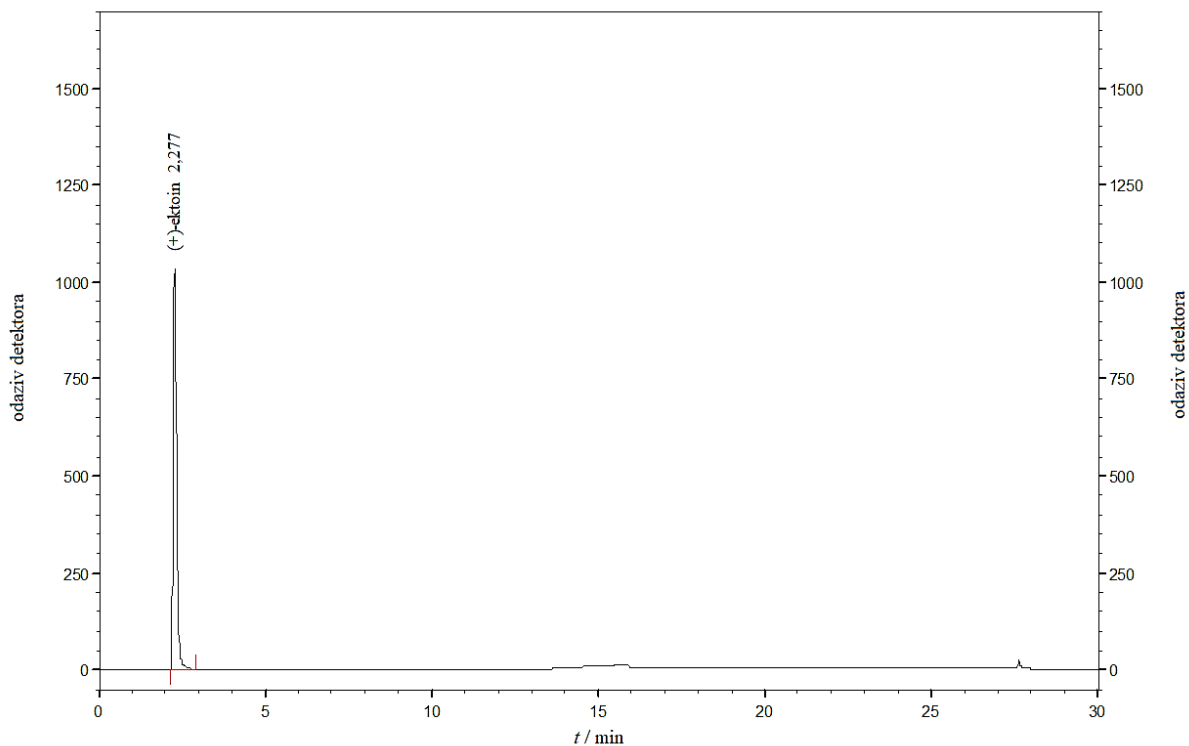
Tablica 10. Uzorci hranjivih medija u kojima su rasli različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.* prethodno izoliranih iz sedimenta Jadranskog mora koji su analizirani HPLC-om metodom koja je opisana u poglavlju 3.4. Prikazani su maseni udjeli NaCl u hranjivom mediju tijekom rasta bakterija za svaki soj kao i prisutnost ektoina.

| Uzorak | Šifra soja | w(NaCl) (%) | Prisutnost ektoina | Uzorak | Šifra soja | w(NaCl) (%) | Prisutnost ektoina |
|--------|------------|-------------|--------------------|--------|------------|-------------|--------------------|
| 1 | Sc | 0 | - | 13 | 114 | 9 | + |
| 2 | Sc | 3 | + | 14 | 115 | 9 | + |
| 3 | Sc | 6 | + | 15 | 121 | 9 | + |
| 4 | 81 | 0 | - | 16 | 123 | 9 | + |
| 5 | 81 | 3 | + | 17 | 124 | 9 | + |
| 6 | 81 | 6 | + | 18 | 126 | 9 | + |
| 7 | 81 | 9 | - | 19 | 131 | 9 | + |
| 8 | 92 | 0 | + | 20 | 156 | 9 | + |
| 9 | 92 | 3 | + | 21 | 160 – 1 | 9 | + |
| 10 | 92 | 6 | + | 22 | 160 – 2 | 9 | + |
| 11 | 104 | 9 | + | 23 | 163 | 9 | + |
| 12 | 106 | 9 | + | 24 | 167 | 9 | + |

Za sojeve koji su uzgajani u analiziranim hranjivim medijima prethodno je utvrđeno da sadržavaju gene koji kodiraju za enzime koji su odgovorni za biosintezu (+)-ektoina u uvjetima

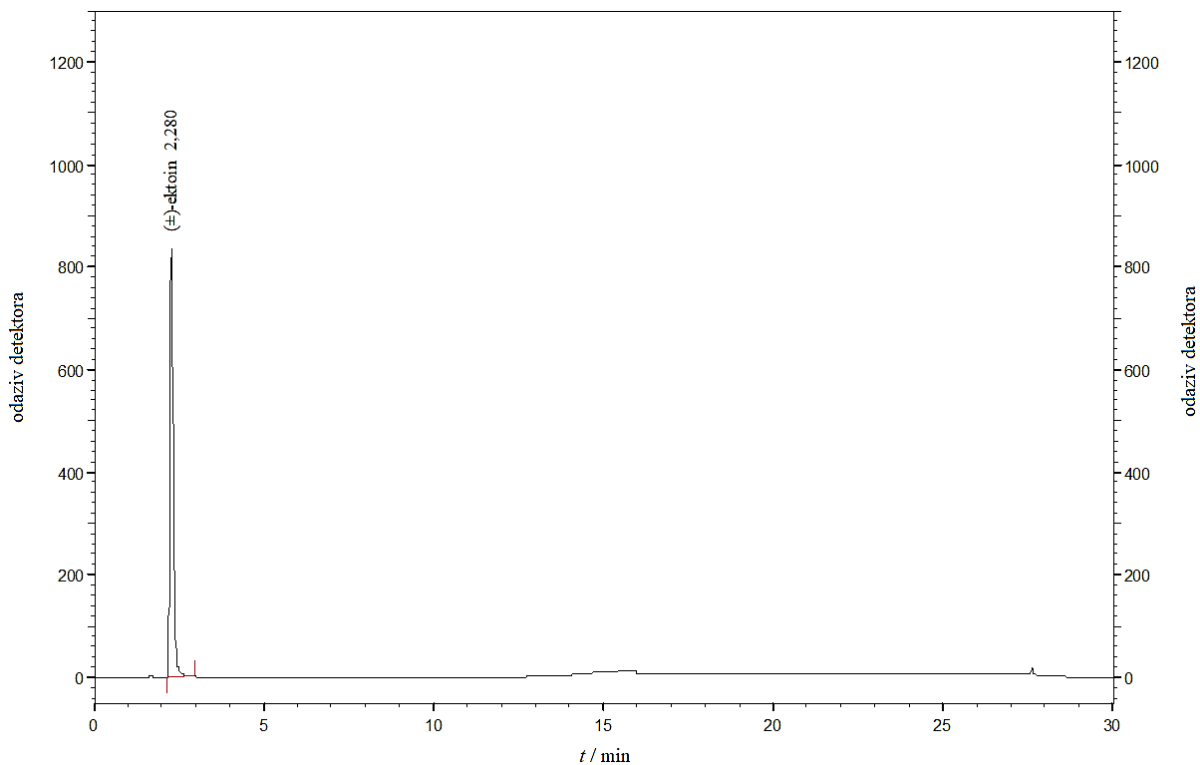
osmotskog stresa. Priprema uzoraka, kao i uvjeti analize i uređaji koji su se upotrebljavali pri analizi navedenih uzoraka opisani su u poglavlju 3.4.

Kako bi se odredilo retencijsko vrijeme (+)-ektoina, prvo je analiziran komercijalno dostupan (+)-ektoin, a njegov kromatogram prikazan je na slici 14.



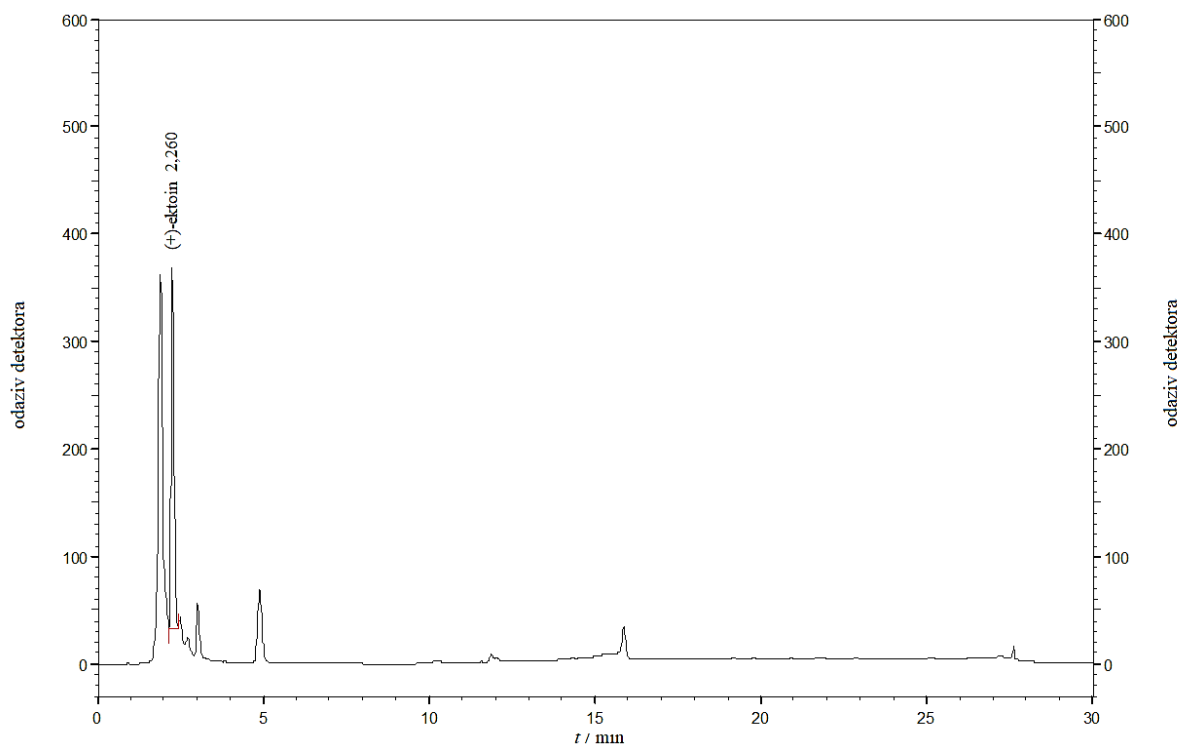
Slika 14. Kromatogram komercijalno dostupnog (+)-ektoina pri $\lambda = 220$ nm. Korištena kromatografska kolona bila je Synergi Polar – RP, a metoda korištena tijekom HPLC analize opisana je u tablici 8, poglavlje 3.4.

Retencijsko vrijeme (+)-ektoina iznosilo je 2,277 minute. Nakon (+)-ektoina ispitan je i pripremljen (\pm)-ektoin čiji je kromatogram prikazan na slici 15., a kako bi se oba mogla usporediti s kromatogramima dobivenim analizom uzoraka **1 – 24** (tablica 10.).



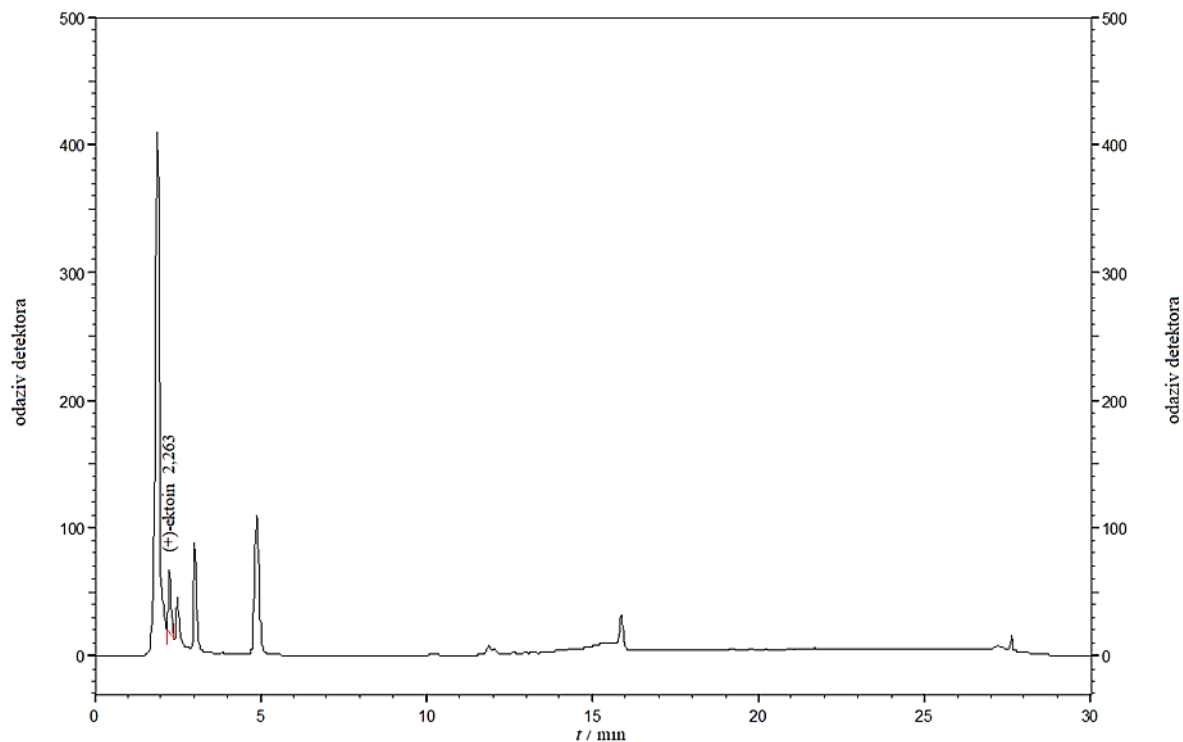
Slika 15. Kromatogram (\pm)-ektoina pripremljenog prema postupcima opisanim u poglavlju 3.2. pri $\lambda = 220$ nm. Korištena kromatografska kolona bila je Synergi Polar – RP, a metoda korištena tijekom HPLC analize opisana je u tablici 8, poglavlje 3.4.

Iz kromatograma (\pm)-ektoina vidi se da je retencijsko vrijeme racemične smjese 2,280 minute, dakle isto kao i (+)-ektoin. Nakon navedenih analiza, analizirani su svi uzorci **1 – 24** prema metodi i uz korištenje instrumenata opisanih u poglavlju 3.4. Kod većine uzoraka hranjivog medija u kojima su uzgajani različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.* bez dodatka NaCl-a, očekivano nema pika koji odgovara (+)-ektoinu. Kod uzorka **8** uočava se odstupanje od očekivanog, odnosno pojavljuje se pik koji odgovara (+)-ektoinu. S druge strane, kod većine uzoraka hranjivog medija u kojima je maseni udio NaCl bio od 3 do 9 % uočava se pik s retencijskim vremenom od 2,217 do 2,283 minute što odgovara retencijskom vremenu (+)-ektoina. Ponovno, kod jednog uzorka uviđa se odstupanje od očekivanog, pa se tako u uzorku **7**, gdje je maseni udio NaCl bio 9 %, ne nalazi pik (+)-ektoina. Odstupanje od očekivanih rezultata može se objasniti eksperimentalnom pogreškom, odnosno postoji vjerojatnost da su navedeni uzorci **7** i **8** zamijenjeni, te je zbog toga došlo do odstupanja od očekivanja. Nadalje, kod jednog uzorka uočena je veća količina (+)-ektoina u odnosu na ostale, pa je njegov kromatogram prikazan na slici 16., dok su ostali kromatogrami prikazani u dodatku D3.3.3.



Slika 16. Kromatogram uzorka **24** (šifra soja 167, $w(\text{NaCl}) = 9\%$) pri $\lambda = 220\text{ nm}$. Korištena kromatografska kolona bila je Synergi Polar – RP, a metoda korištena tijekom HPLC analize opisana je u tablici 8, poglavlje 3.4.

Za usporedbu, na slici 17. prikazan je kromatogram uzorka **21** kod kojeg su bakterije roda *Streptomyces sp.* također uzgajane u hranjivom mediju koji je sadržavao 9 % NaCl.



Slika 17. Kromatogram uzorka **21** (šifra soja 160 – 1, $w(\text{NaCl}) = 9\%$) pri $\lambda = 220\text{ nm}$. Korištena kromatografska kolona bila je Synergi Polar – RP, a metoda korištena tijekom HPLC analize opisana je u tablici 8, poglavlje 3.4.

Iz priloženih kromatograma (slika 16. i slika 17.) vidi se da uzorak **24** sadržava znatno veću koncentraciju (+)-ektoina u odnosu na uzorak **21**. Prema tome, navedeni soj bakterija treba se dalje ispitati zbog moguće primjene u biotehnološkoj proizvodnji (+)-ektoina zbog mnogo većeg izlučivanja (+)-ektoina u medij u odnosu na ostale analizirane sojeve bakterija *Streptomyces sp.* Ako se pogledaju kromatogrami ostalih uzoraka prikazani u dodatku D3.3.3., vidi se da uzorak **24** sadržava znatno veću koncentraciju (+)-ektoina od svih ostalih ispitanih uzoraka.

§ 5. ZAKLJUČAK

U prvom dijelu ovog rada opisana je poboljšana i optimirana priprava (\pm)-ektoina koja je započela pripravom 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona iz komercijalno dostupnog dihidrofuran-2(3*H*)-ona. Tijekom ove reakcije primijećeno je da silika-gel katalizira nastajanje 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona iz 2,4-dibrombutanske kiseline. Osim toga, kao najbolji način destilacije pri sniženom tlaku pokazala se primjenom *spinning band* kolone uz potrebu korištenja teflonske vrpce. Ostatak sintetskog puta priprave (\pm)-ektoina optimiran je i modificiran kako bi se jednostavnije i brže dobio željeni produkt u što većem prinosu. Iskorištenje zadnje reakcije u sintetskom putu, ciklizacije 4-acetamido-2-aminobutanske kiseline u (\pm)-ektoin iznosi 82,3 % ukoliko se kao metoda pročišćavanja koristi ionsko-izmjenjivačka kromatografija. Posljedično, ukupno iskorištenje sintetskog puta priprave (\pm)-ektoina polazeći od 3-bromdihidrofuran-2(3*H*)-ona iznosi 33,0 %.

U drugom dijelu ovog rada opisano je odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina različitim metodama na kiralnoj stacionarnoj fazi ChiralT koja sadržava makrociklički glikopeptid *teicoplanin*. Odjeljivanje enantiomera na polisaharidnim i četkolikim stacionarnim fazama nije dobiveno.

U trećem, i zadnjem, dijelu ovog rada ispitana je prisutnost (+)-ektoina u 24 uzorka hranjivog medija u kojem su rasli različiti sojevi bakterija *Streptomyces sp.* izoliranih iz sedimenta Jadranskog mora s pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. U 21 od 24 uzoraka utvrđena je prisutnost (+)-ektoina. Tri uzorka pripremljena su kao kontrole, odnosno određeni sojevi bakterija *Streptomyces sp.* rasli su bez dodatka NaCl zbog čega nije došlo do biosinteze (+)-ektoina i posljedično do njegova otkrivanja u navedenim hranjivim medijima.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN – acetonitril

AGP – α 1-kiseli glikoprotein

ATP – adenzin trifosfat

BSA – albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CDCl₃ – deuterirani kloroform

CD₃OD₃ – deuterirani metanol

D₂O – deuterirana voda

DABA – 2,4-diaminobutanska kiselina

DCM – diklormetan

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO-*d*₆ – deuterirani dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Ektoin – 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilna kiselina

Et₂O – dietil-eter

Et₃N – trietilenamin

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

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

HSA – albumin iz humanog seruma (engl. *Human Serum Albumin*)

i-PrOH – izopropanol

MeOH – metanol

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

*R*_f – faktor zadržavanja

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

§ 7. LITERATURNI IZVORI

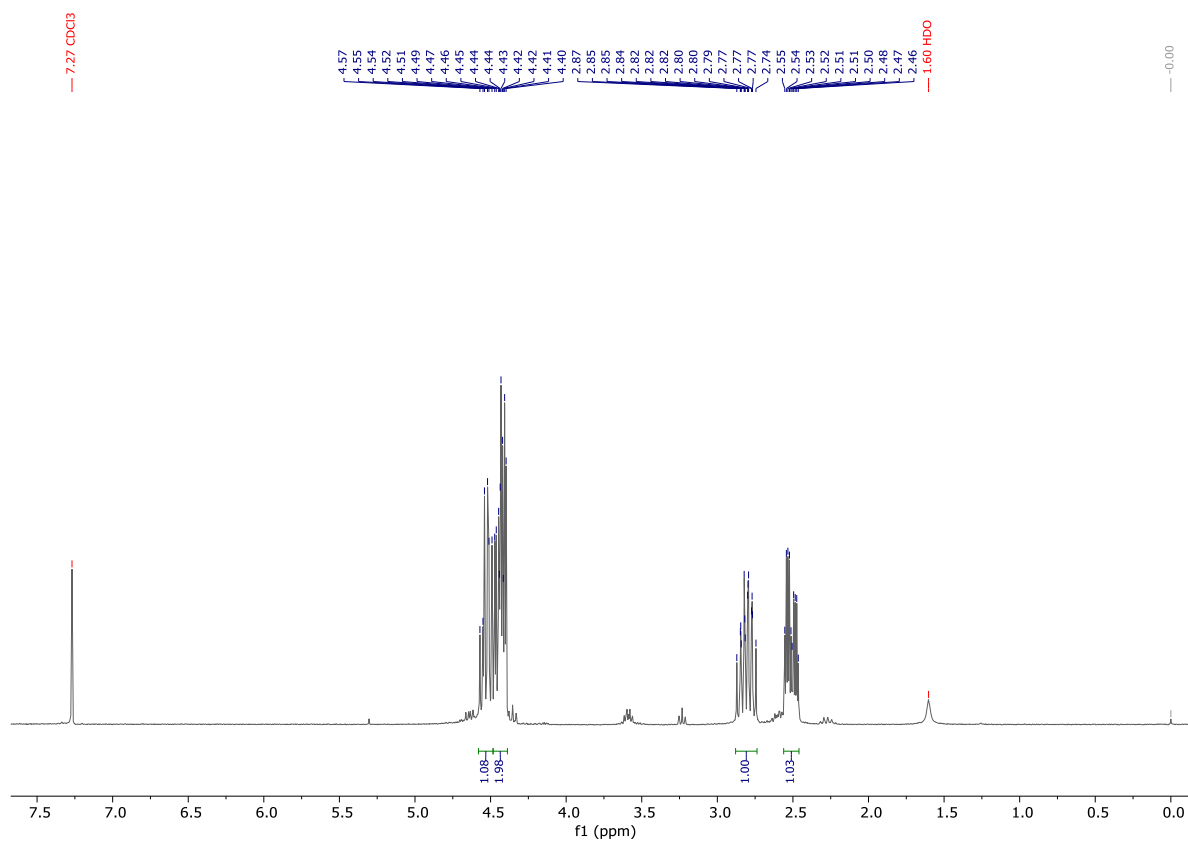
1. J. M. Pastor, M. Salvador, M. Argandoña, V. Bernal, M. Reina-Bueno, L. N. Csonka, J. L. Iborra, C. Vargas, J. J. Nieto, M. Cánovas, *Biotechnol. Adv.* **28** (2010) 782–801.
2. H. Kunte, G. Lentzen, E. Galinski, *Curr. Biotechnol.* **3** (2014) 10–25.
3. T. Sauer, E. A. Galinski, *Biotechnol. Bioeng.* **57** (1998) 306–313.
4. J. H. S. Himdi-Kabbab, K. Lavrador, J. P. Bazureau, *Synth. Commun.* **25** (1995) 2223–2227.
5. L. B. G. Talbot, R. Gaudry, *Can. J. Chem.* **36** (1966) 6–9.
6. E. A. Galinski, H. P. Pfeiffer, H. G. Trüper, *Eur. J. Biochem.* **149** (1985) 135–139.
7. N. Widderich, A. Höppner, M. Pittelkow, J. Heider, S. H. J. Smits, E. Bremer, *PLoS One* **9** (2014) e93809.
8. A. S. Reshetnikov, V. N. Khmelenina, I. I. Mustakhimov, M. Kalyuzhnaya, M. Lidstrom, Y. A. Trotsenko, *Extremophiles* **15** (2011) 653–663.
9. N. Widderich, L. Czech, F. J. Elling, M. Könneke, N. Stöveken, M. Pittelkow, R. Riclea, J. S. Dickschat, J. Heider, E. Bremer, *Environ. Microbiol.* **18** (2016) 1227–1248.
10. L. Weinisch, S. Kühner, R. Roth, M. Grimm, T. Roth, D. J. A. Netz, A. J. Pierik, S. Filker, *PLoS Biol.* **16** (2018) e2003892.
11. D. Moreira, P. López-García, *Curr. Biol.* **27** (2017) R223–R225.
12. T. Harding, A. J. Roger, A. G. B. Simpson, *Front. Microbiol.* **8** (2017) 944.
13. S. Fenizia, K. Thume, M. Wirgenings, G. Pohnert, *Mar. Drugs* **18** (2020) 42.
14. K. Schwibbert, A. Marin-Sanguino, I. Bagyan, G. Heidrich, G. Lentzen, H. Seitz, M. Rampp, S. C. Schuster, H. P. Klenk, F. Pfeiffer, D. Oesterhelt, H. J. Kunte, *Environ. Microbiol.* **13** (2011) 1973–1994.
15. A. A. Richter, S. Kobus, L. Czech, A. Hoepfner, J. Zarzycki, T. J. Erb, L. Lauterbach, J. S. Dickschat, E. Bremer, S. H. J. Smits, *J. Biol. Chem.* **295** (2020) 2822–2838.
16. L. Czech, L. Hermann, N. Stöveken, A. A. Richter, A. Höppner, S. H. J. Smits, J. Heider, E. Bremer, *Genes (Basel)*. **9** (2018) 1–58.
17. R. Waditee-Sirisattha, H. Kageyama, T. Takabe, *AIMS Microbiol.* **2** (2016) 42–54.
18. G. Lentzen, T. Schwarz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72** (2006) 623–634.

19. V. Vermeulen, H. J. Kunte, *Extremophiles* **8** (2004) 175–184.
20. A. Richter, I. Wernersbach, L. Czech, E. Bremer, G. Bange, *J. Biol. Chem.* **295** (2020) 9087–9104
21. K. Lippert, E. A. Galinski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** (1992) 61–65.
22. K. Göller, E. A. Galinski, *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **7** (1999) 37–45.
23. A. Arora, C. Ha, C. B. Park, *FEBS Lett.* **564** (2004) 121–125.
24. K. Furusho, T. Yoshizawa, S. Shoji, *Neurobiol. Dis.* **20** (2005) 170–178.
25. M. Kanapathipillai, G. Lentzen, M. Sierks, C. B. Park, *FEBS Lett.* **579** (2005) 4775–4780.
26. P. Louis, H. G. Trüper, E. A. Galinski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41** (1994) 684–688.
27. A. Baliarda, H. Robert, M. Jebbar, C. Blanco, A. Deschamps, C. Le Marrec, *Int. J. Food Microbiol.* **84** (2003) 13–20.
28. H. Nakayama, K. Yoshida, H. Ono, Y. Murooka, A. Shinmyo, *Plant Physiol.* **122** (2000) 1239–1247.
29. S. Grether-Beck, A. Timmer, I. Felsner, H. Brenden, D. Brammertz, J. Krutmann, *J. Invest. Dermatol.* **125** (2005) 545–553.
30. J. Buenger, H. Driller, *Skin Pharmacol. Physiol.* **17** (2004) 232–237.
31. P. Peters, E. A. Galinski, H. G. Trüper, *FEMS Microbiol. Lett.* **71** (1990) 157–162.
32. H. Ono, K. Sawada, N. Khunajakr, T. Tao, M. Yamamoto, M. Hiramoto, A. Shinmyo, M. Takano, Y. Murooka, *J. Bacteriol.* **181** (1999) 91–99.
33. J. M. Dunwell, A. Purvis, S. Khuri, *Phytochemistry* **65** (2004) 7–17.
34. N. Widderich, S. Kobus, A. Höppner, R. Riclea, A. Seubert, J. S. Dickschat, J. Heider, S. H. J. Smits, E. Bremer, *PLoS One* **11** (2016) e0151285.
35. L. Czech, A. Hoepfner, S. H. Smits, E. Bremer, *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.* (2020) 1–14.
36. D. T. Welsh, *FEMS Microbiol. Rev.* **24** (2000) 263–290.
37. K. Grammann, A. Volke, H. J. Kunte, *J. Bacteriol.* **184** (2002) 3078–3085.
38. E. Crowley, *V* (2017) 1–7.
39. I. Yu, Y. Jindo, M. Nagaoka, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) 10231–10238.
40. R. Graf, S. Anzali, J. Buenger, F. Pfluecker, H. Driller, *Clin. Dermatol.* **26** (2008) 326–333.

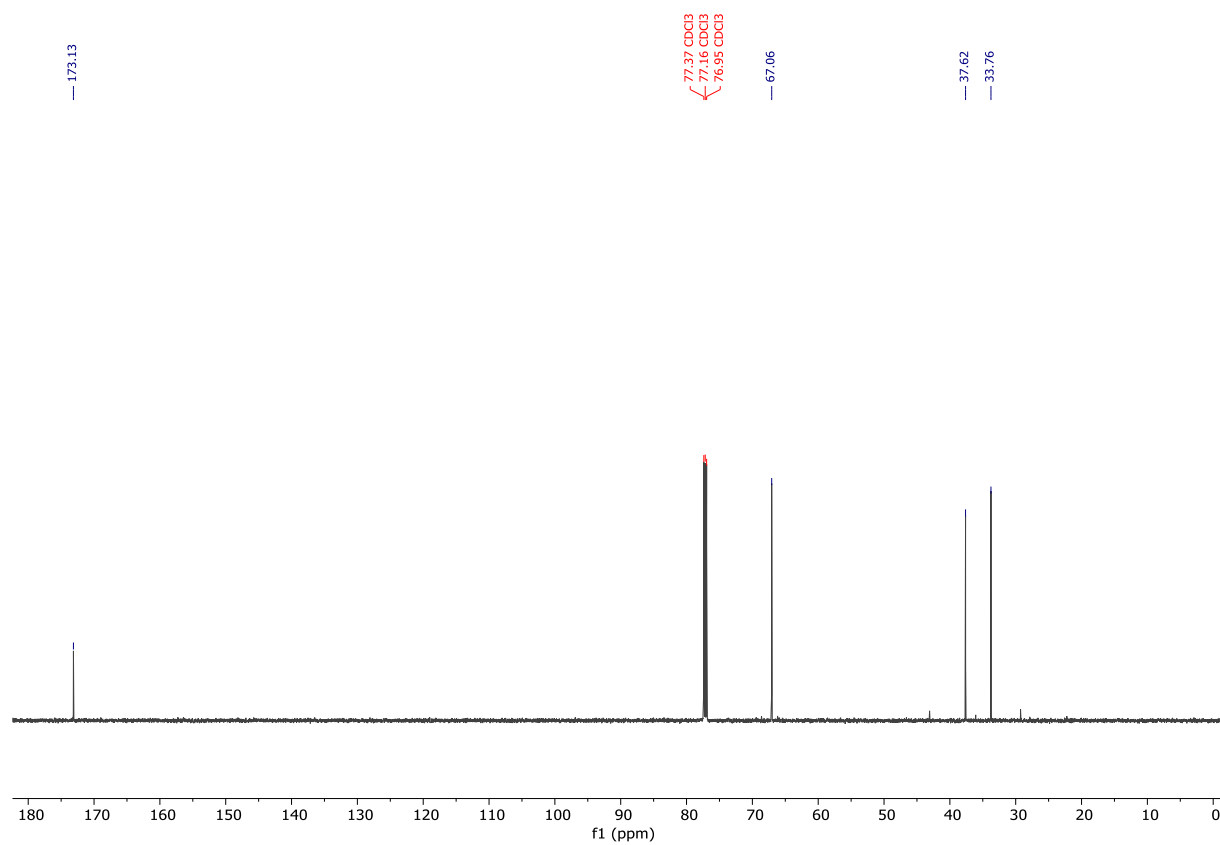
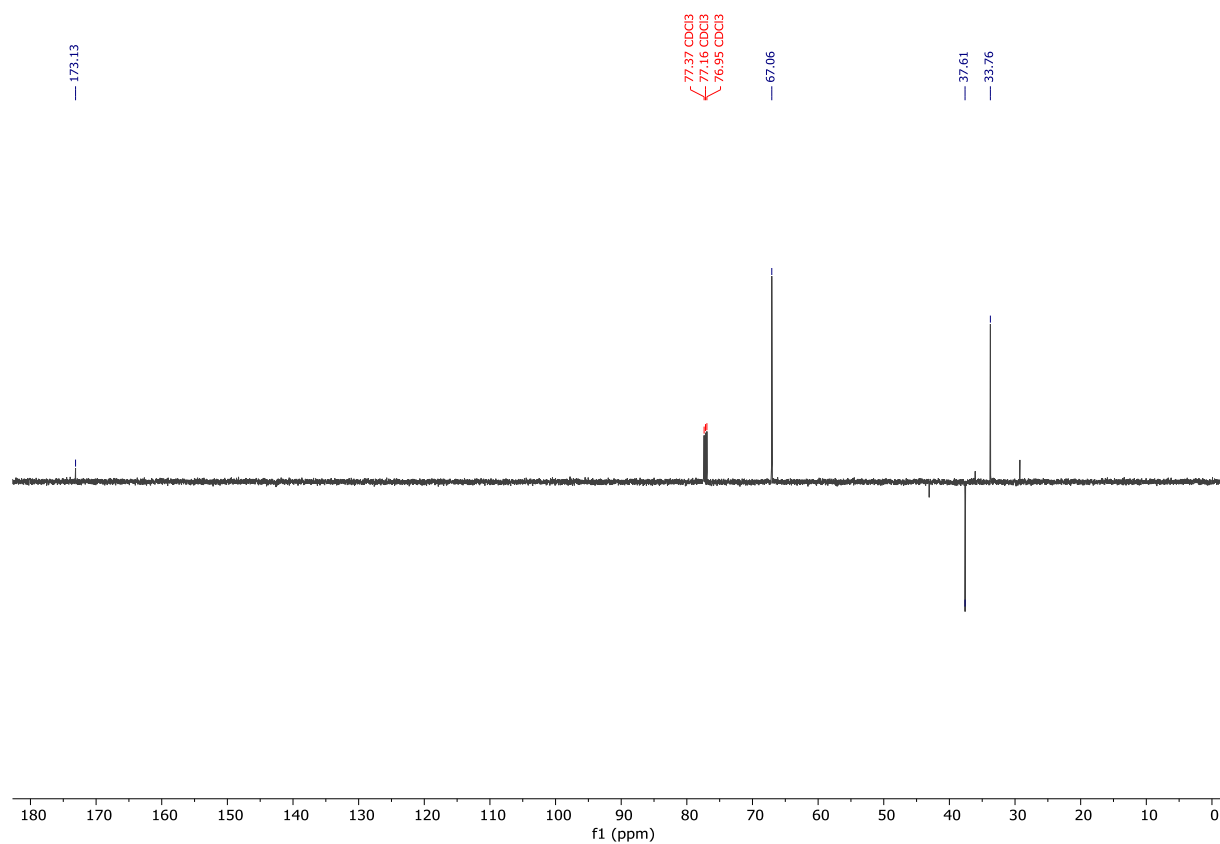
41. E. Buommino, C. Schiraldi, A. Baroni, I. Paoletti, M. Lamberti, M. De Rosa, M. A. Tufano, *Cell Stress Chaperones* **10** (2005) 197–203.
42. N. Werkhäuser, A. Bilstein, U. Sonnemann, *J. Allergy* **2014** (2014) 1–13.
43. M. Zaoral, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **24** (1959) 1314–1319.
44. M. F. Livak, E. J., Britton E. C., VanderWeele, J. C., Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **67** (1945) 2218–2220.
45. J. Leclerc, L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **46** (1968) 1047–1051.
46. S. Wiejak, E. Masiukiewicz, B. Rzeszotarska, *Chem. Pharm. Bull.* **49** (2001) 1189–1191.
47. A. C. Kurtz, *J. Biol. Chem.* **180** (1949) 1253–1267.
48. J. Pícha, M. Buděšínský, K. Macháčková, M. Collinsová, J. Jiráček, *J. Pept. Sci.* **23** (2017) 202–214.
49. Y. Okamoto, T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 2593–2608.
50. E. Francotte, *Isolation and Production of Optically Pure Drugs by Enantioselective Chromatography*, 2006
51. <http://chiraltech.com/wp-content/uploads/2017/06/chiraltech-CROWNPAK-CR-I-5-um-Reversed-Phase.pdf>, datum pristupa: 10. srpnja 2020.
52. <https://www.registech.com/wp-content/uploads/2020/07/ChiroSil-Care-and-Use-Guide.pdf>, datum pristupa: 10. srpnja 2021.
53. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/204/100/t408131.pdf>, datum pristupa: 10. srpnja 2021.
54. G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **29** (2010) 2176–2179.
55. E. McMaster, L. Bender, E. Weil, *J. Am. Chem. Soc.* **43** (1921) 1205–1207.

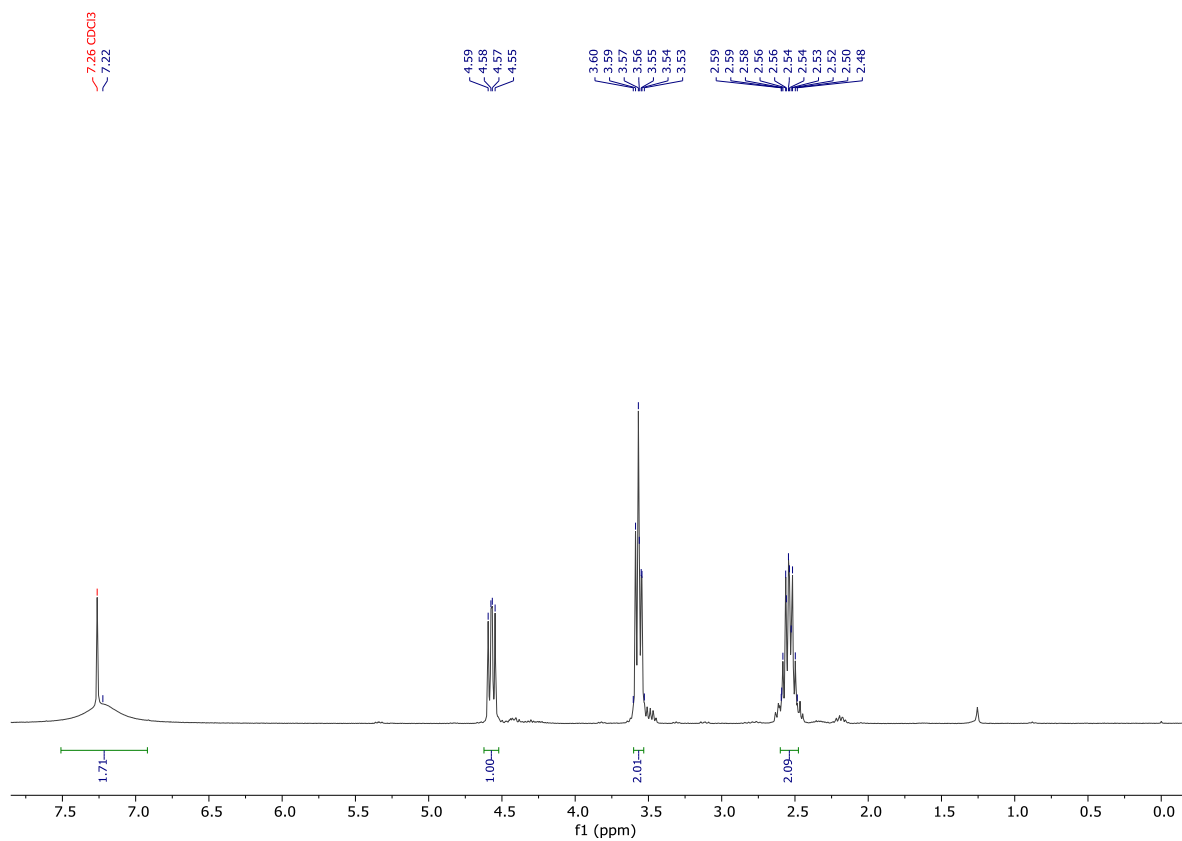
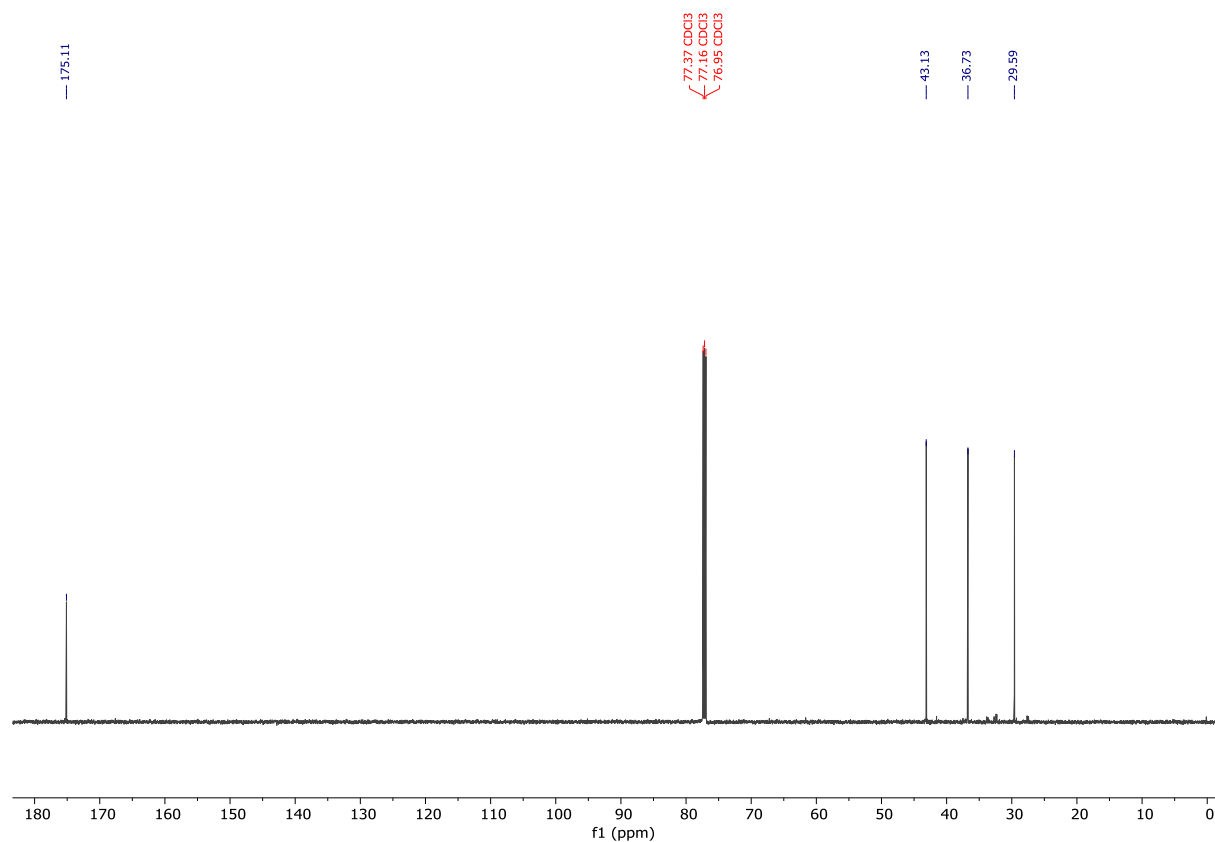
§ 8. DODATAK

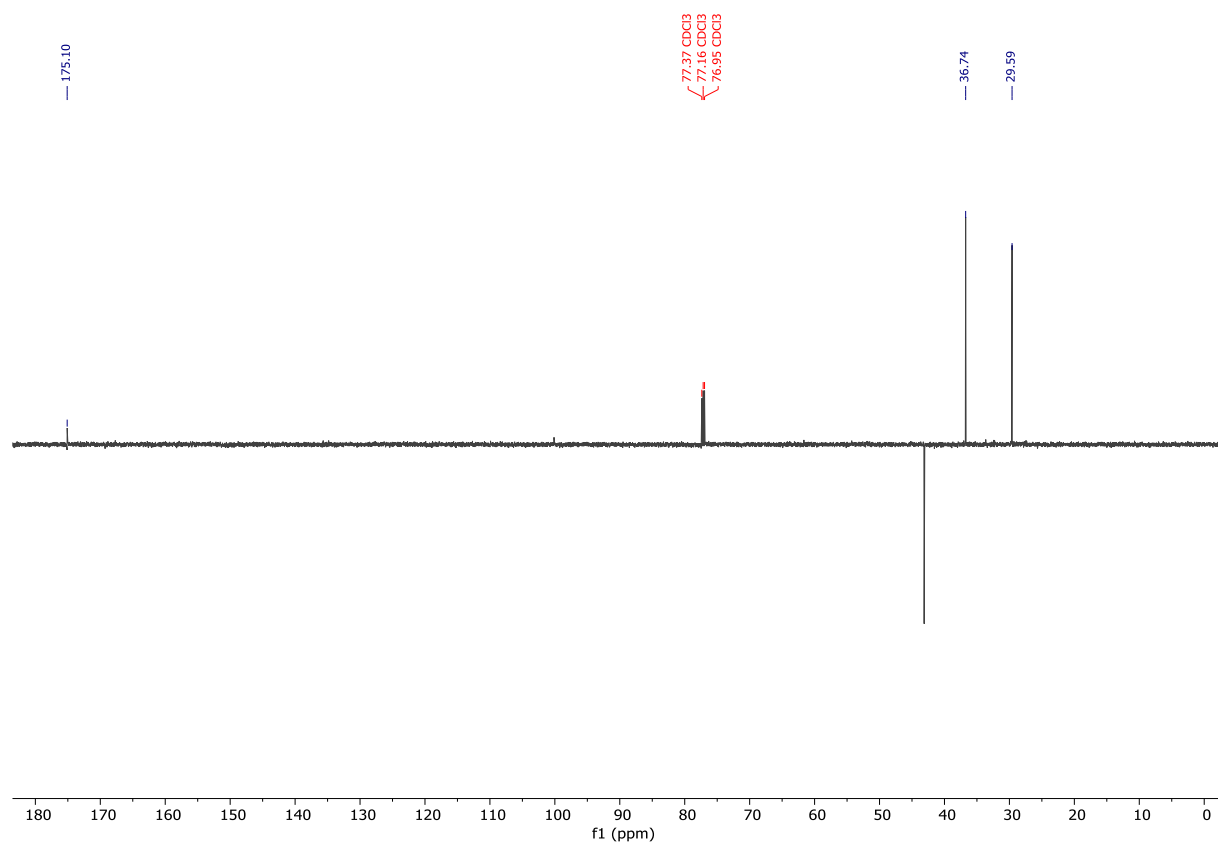
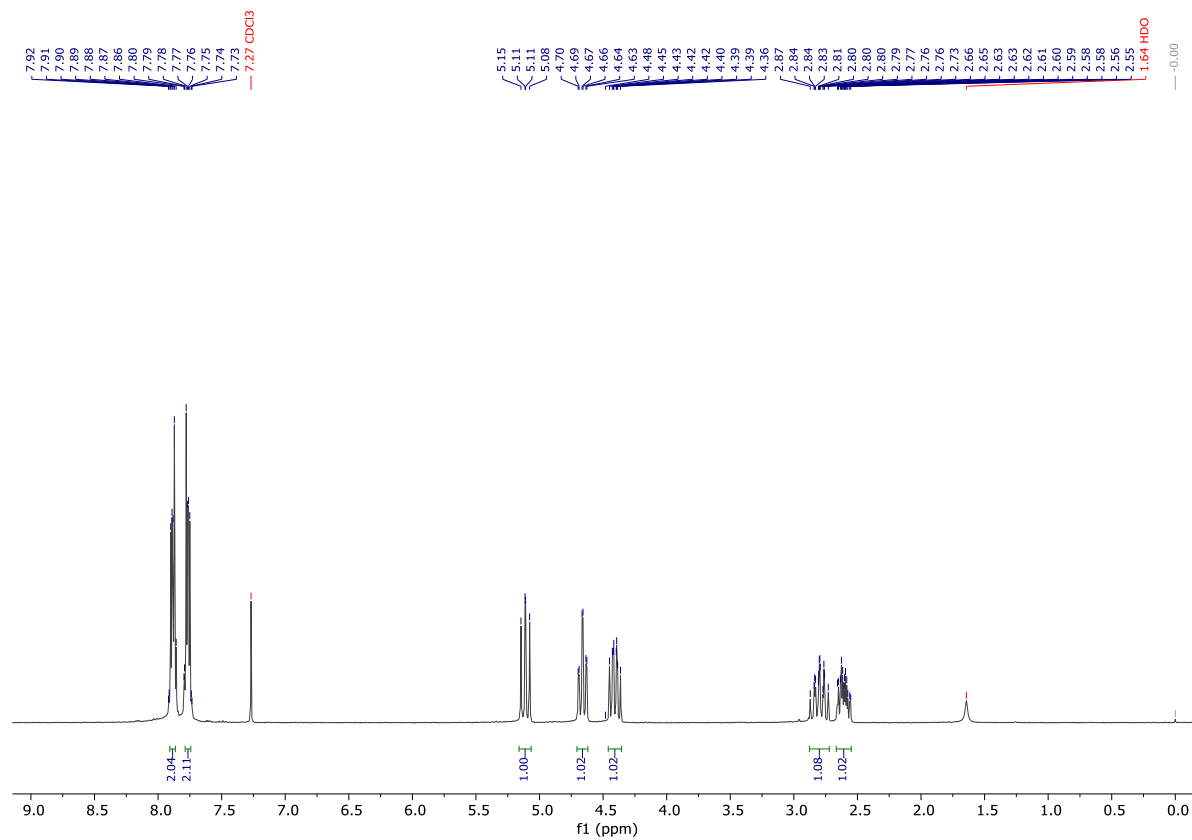
8.1. Spektri nuklearne magnetske rezonancije

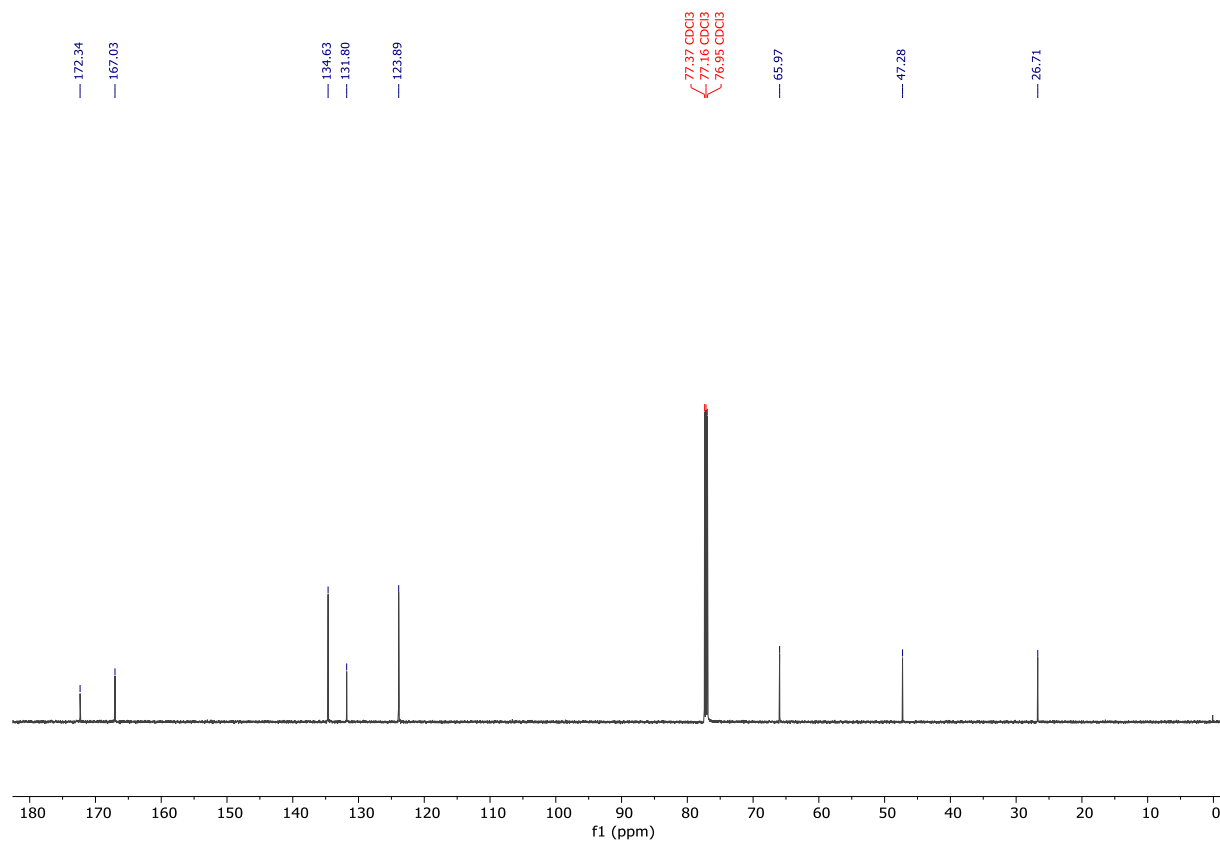
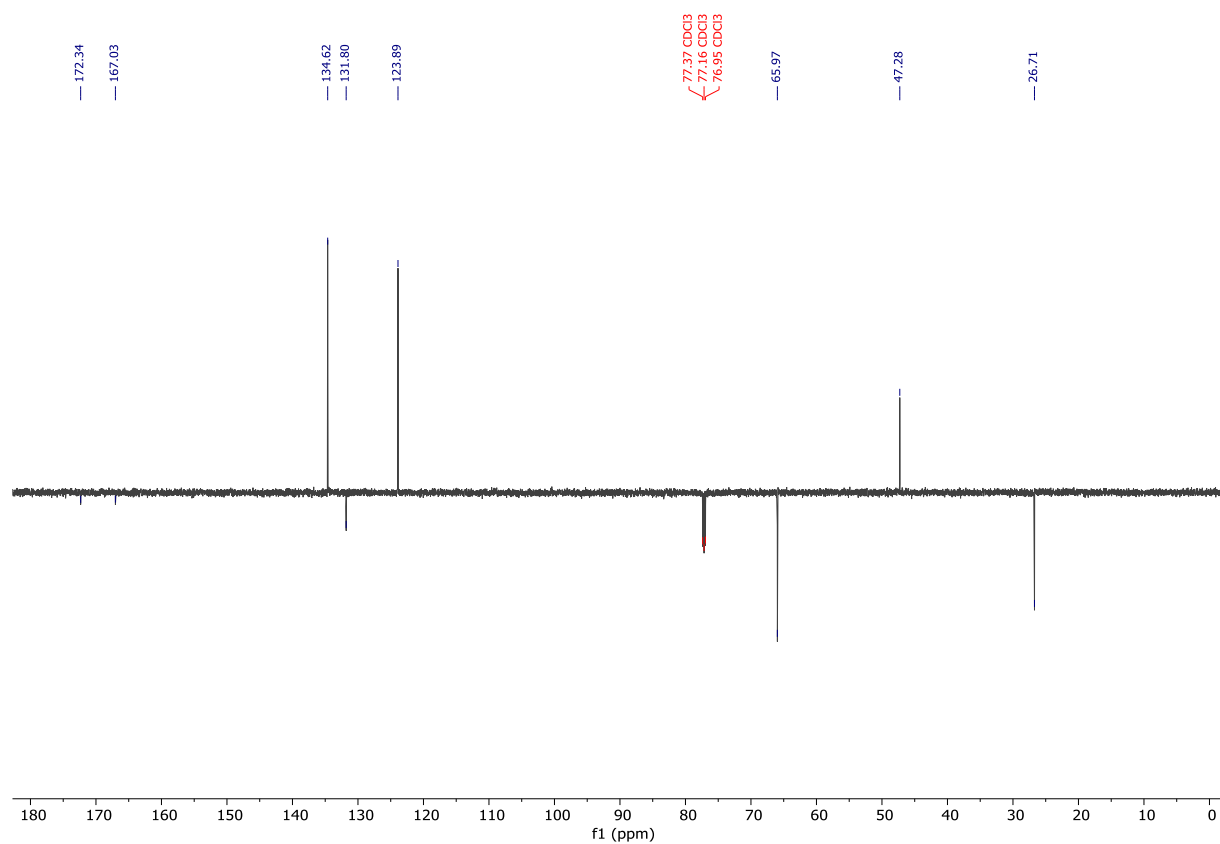


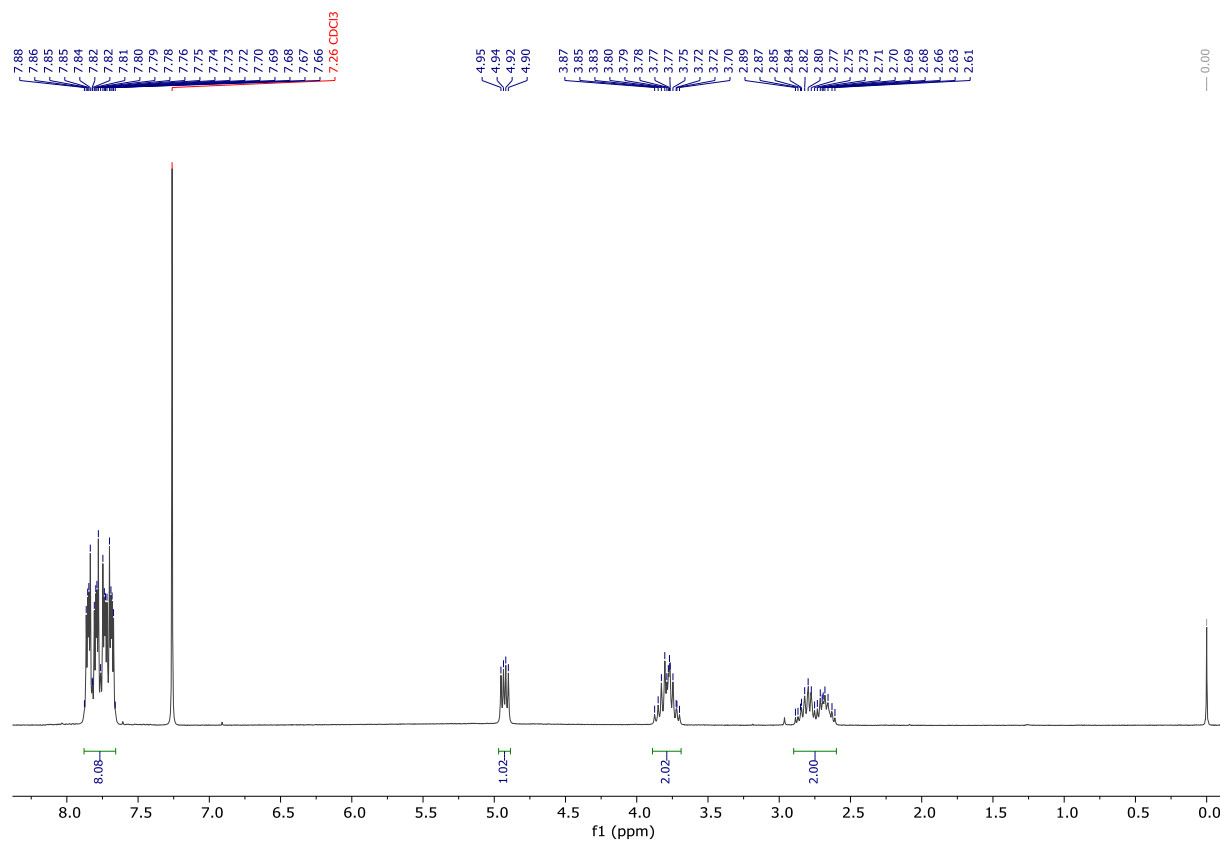
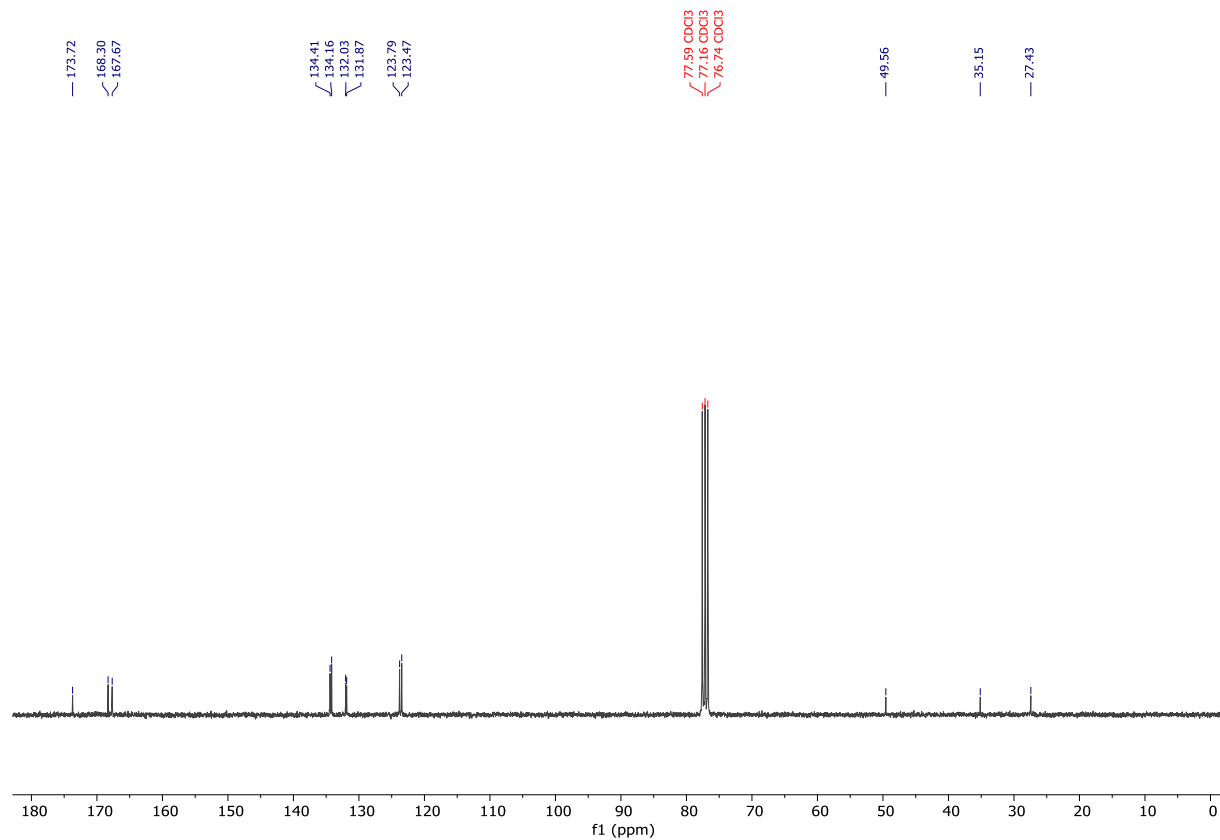
Slika D1.1. ¹H NMR spektar spoja 1.

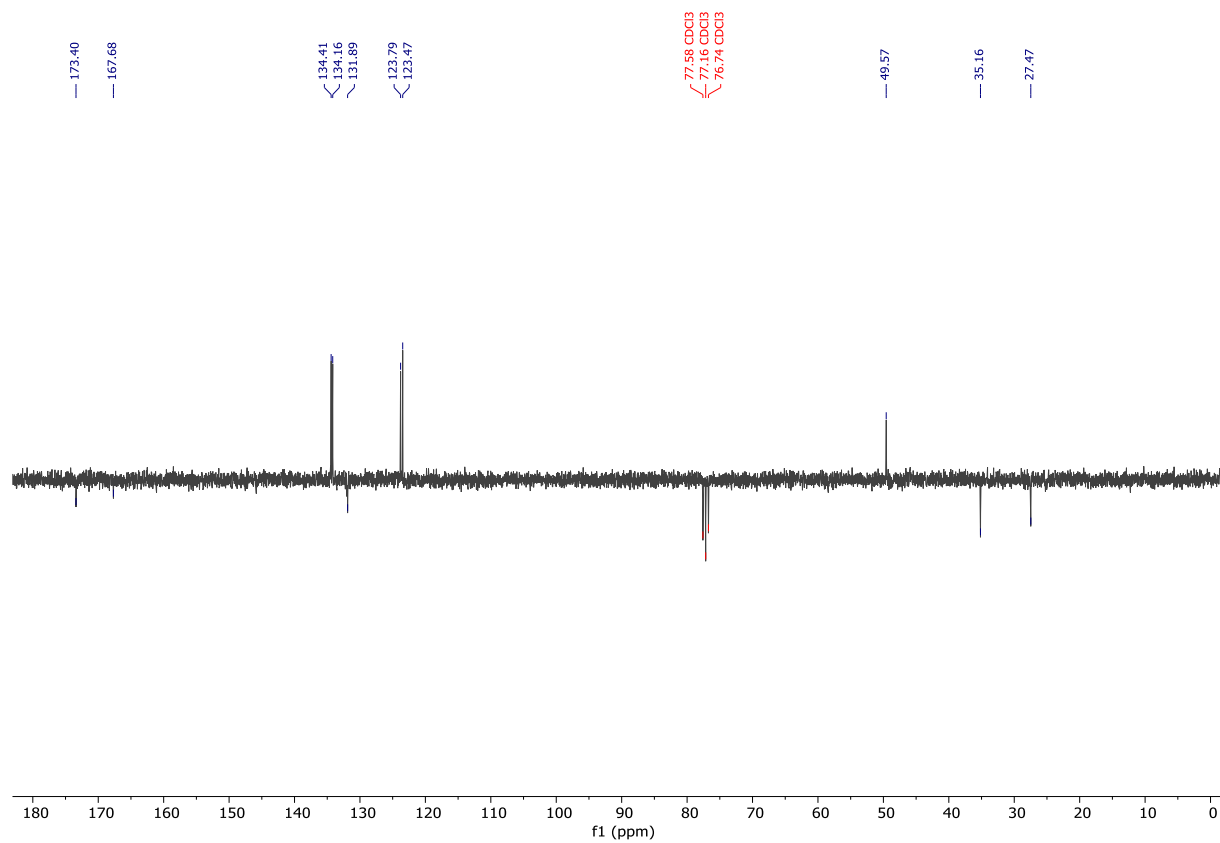
Slika D1.2. ^{13}C NMR spektar spoja 1.Slika D1.3. ^{13}C APT NMR spektar spoja 1.

Slika D1.4. ¹H NMR spektar 2,4-dibrombutanske kiseline.Slika D1.5. ¹³C NMR spektar 2,4-dibrombutanske kiseline.

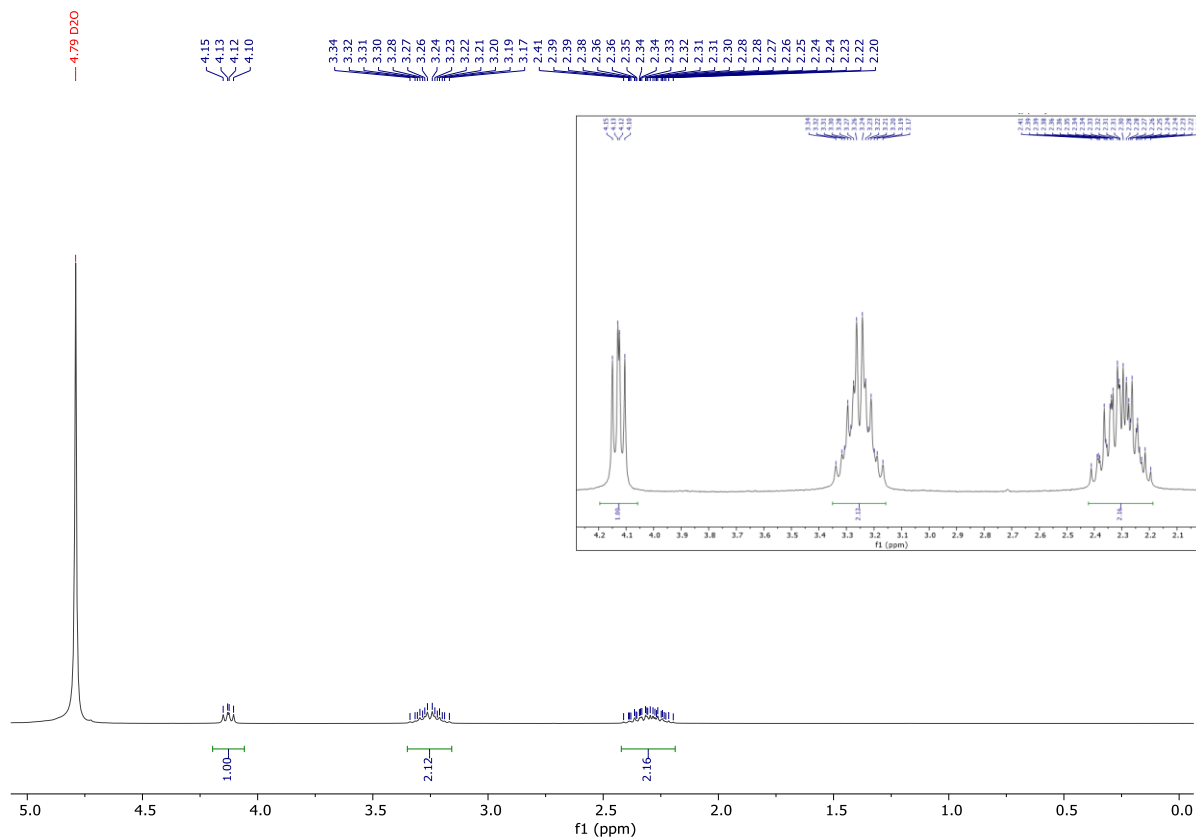
Slika D1.6. ¹³C APT NMR spektar 2,4-dibrombutanske kiseline.Slika D1.7. ¹H NMR spektar spoja 2.

Slika D1.8. ^{13}C NMR spektar spoja 2.Slika D1.9. ^{13}C APT NMR spektar spoja 2.

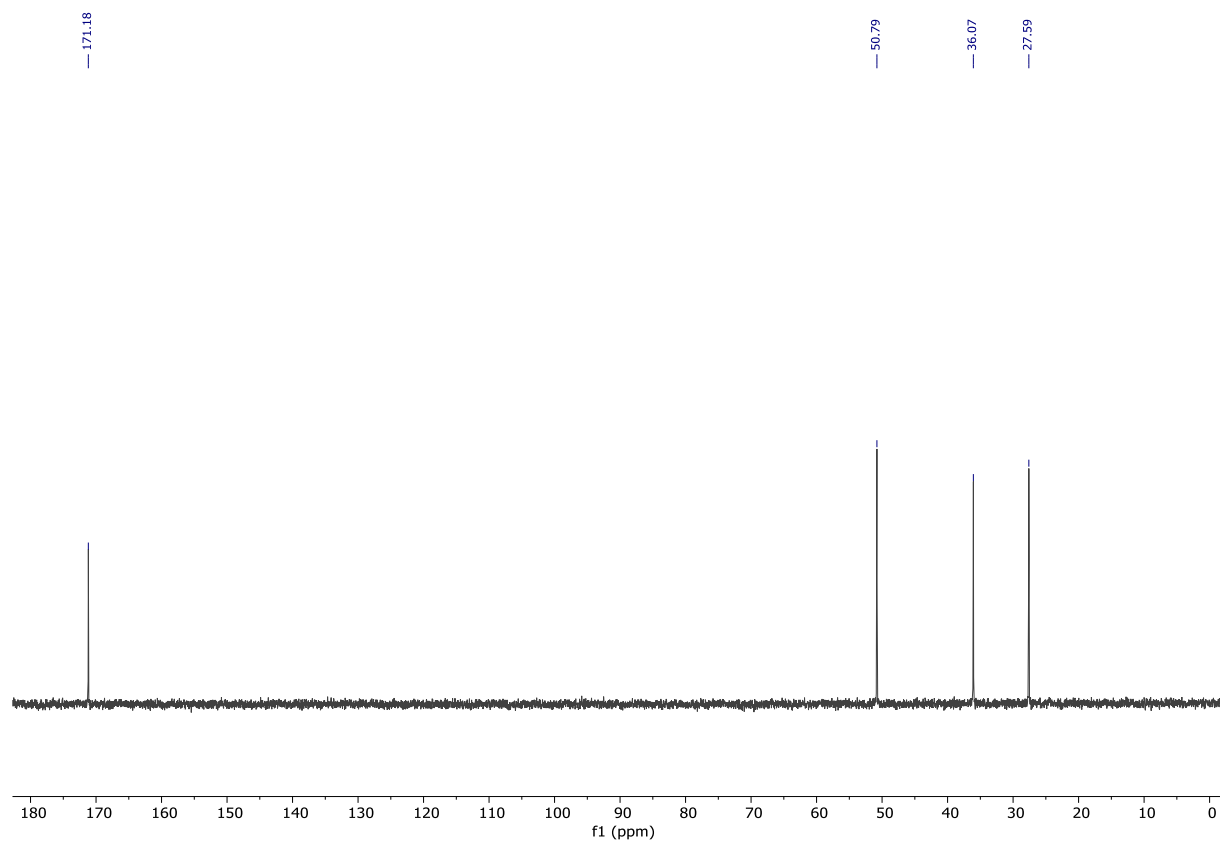
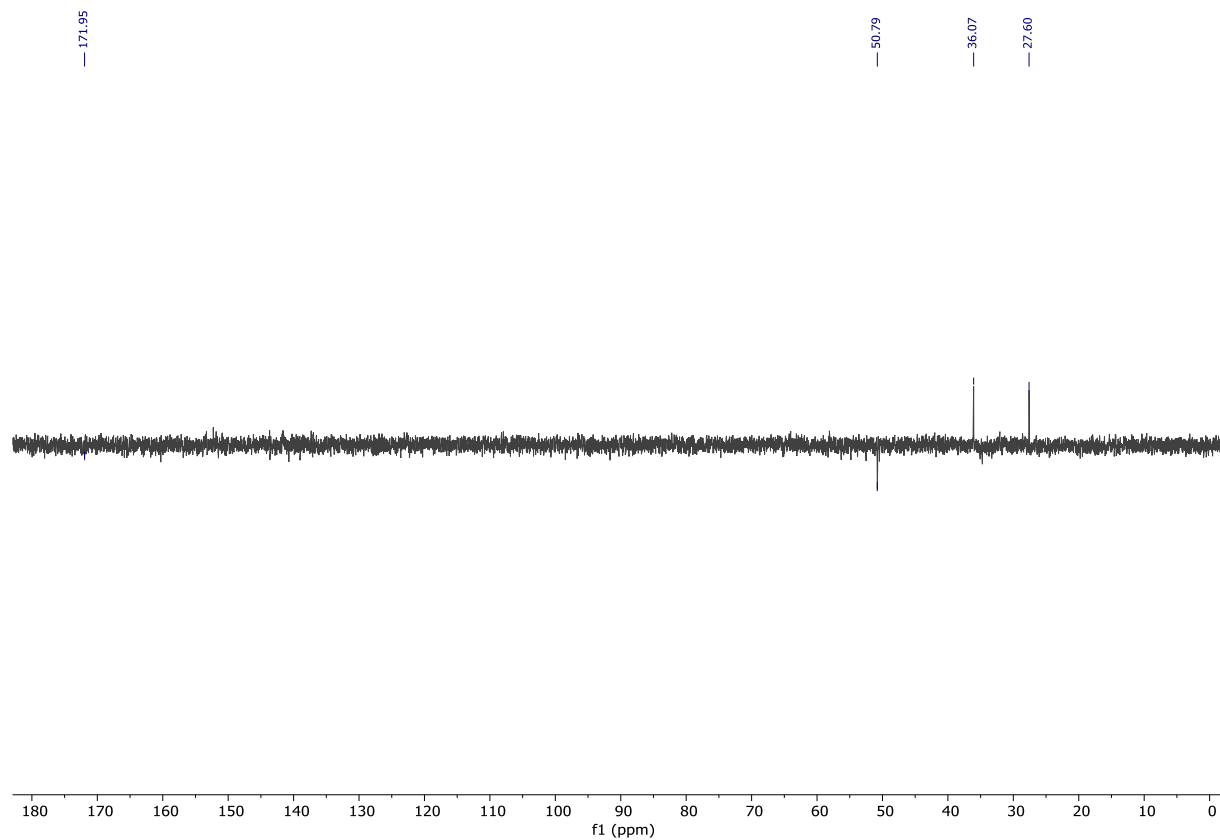
Slika D1.10. ¹H NMR spektar spoja 3.Slika D1.11. ¹³C NMR spektar spoja 3.

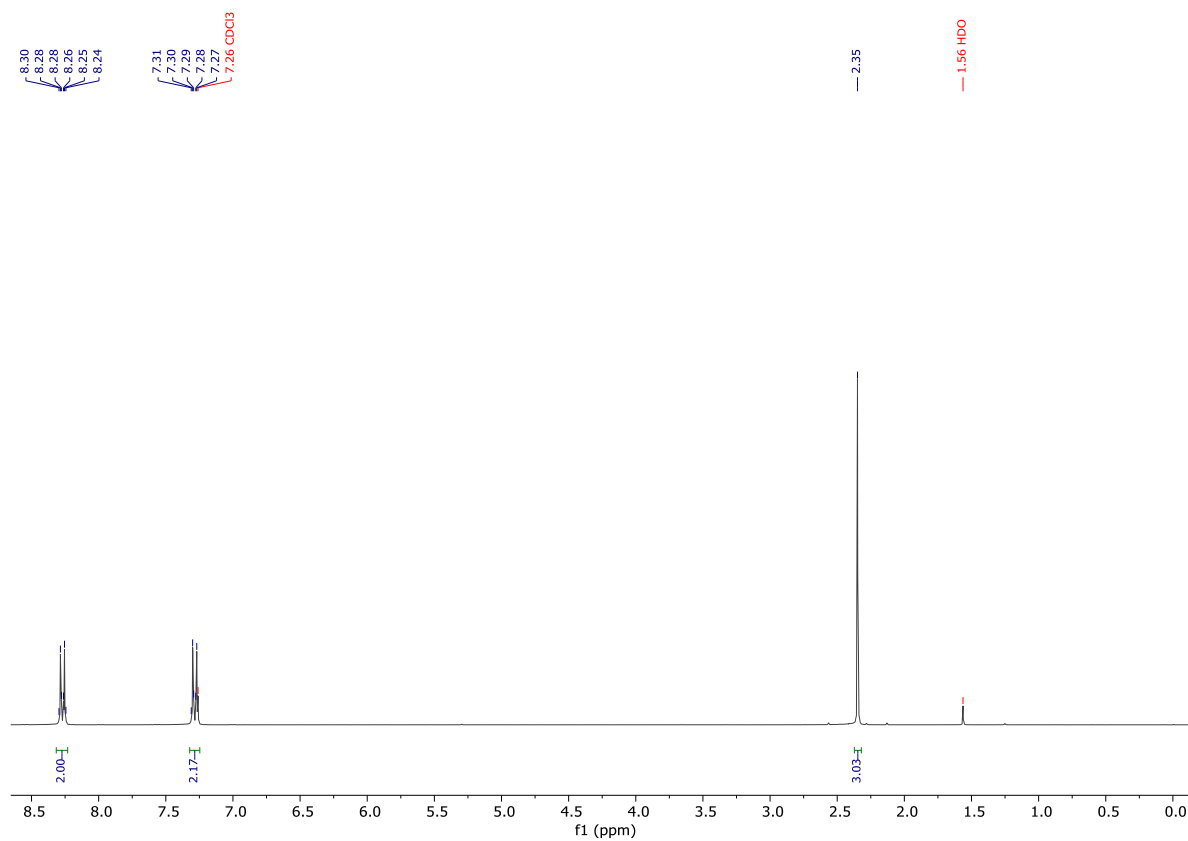
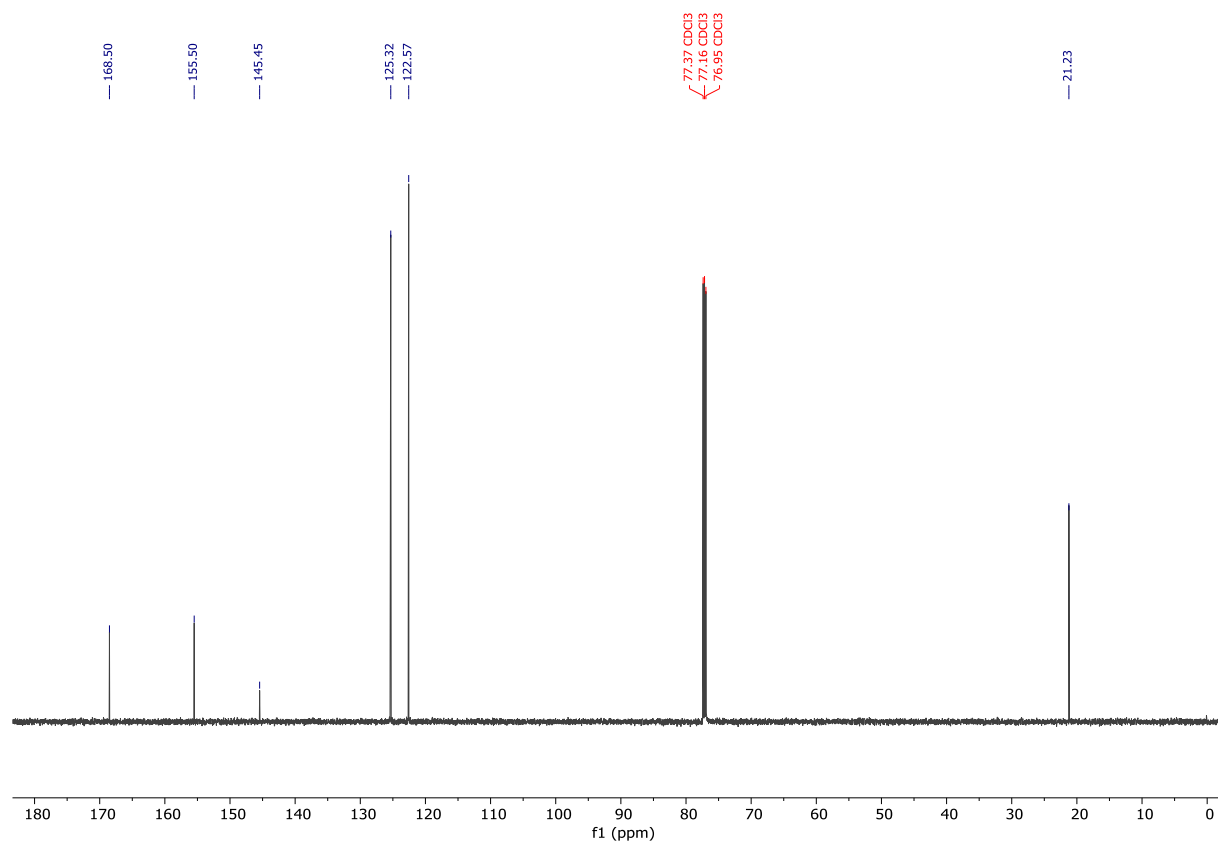


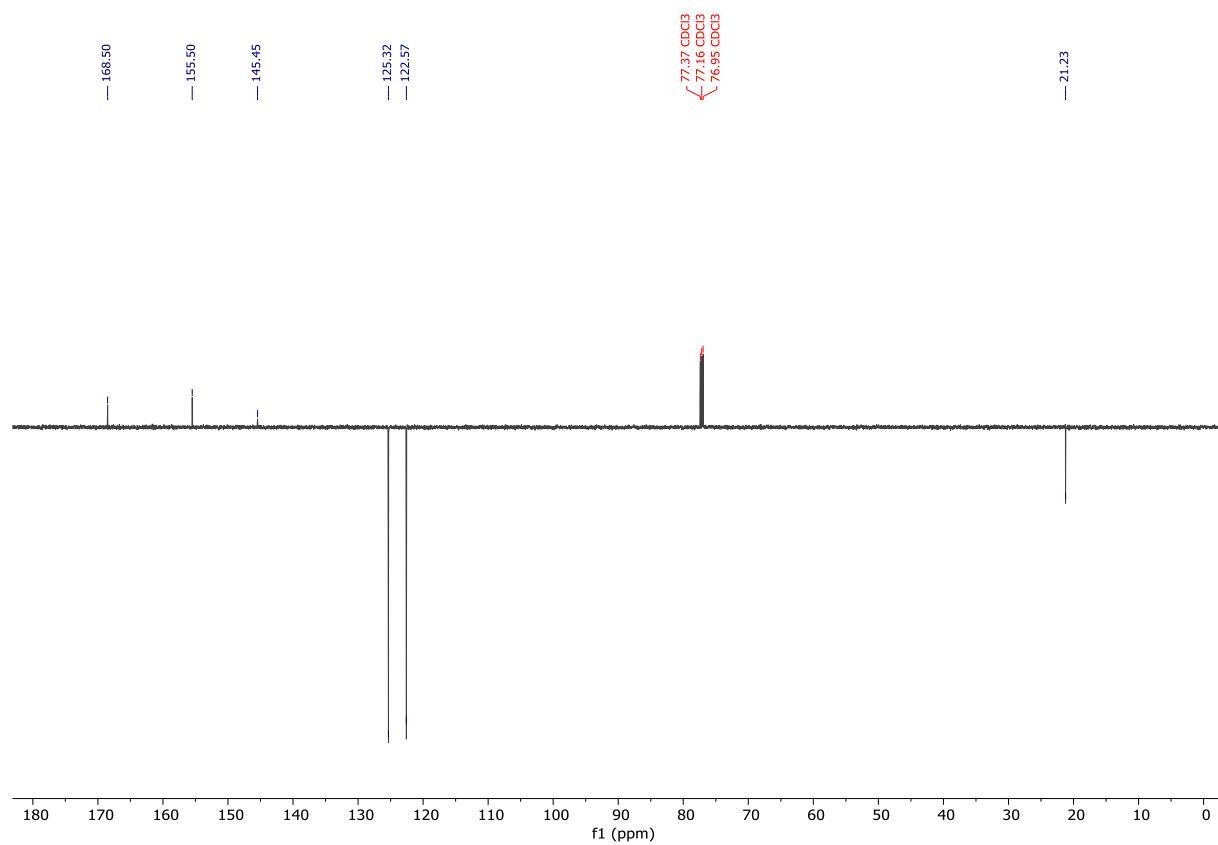
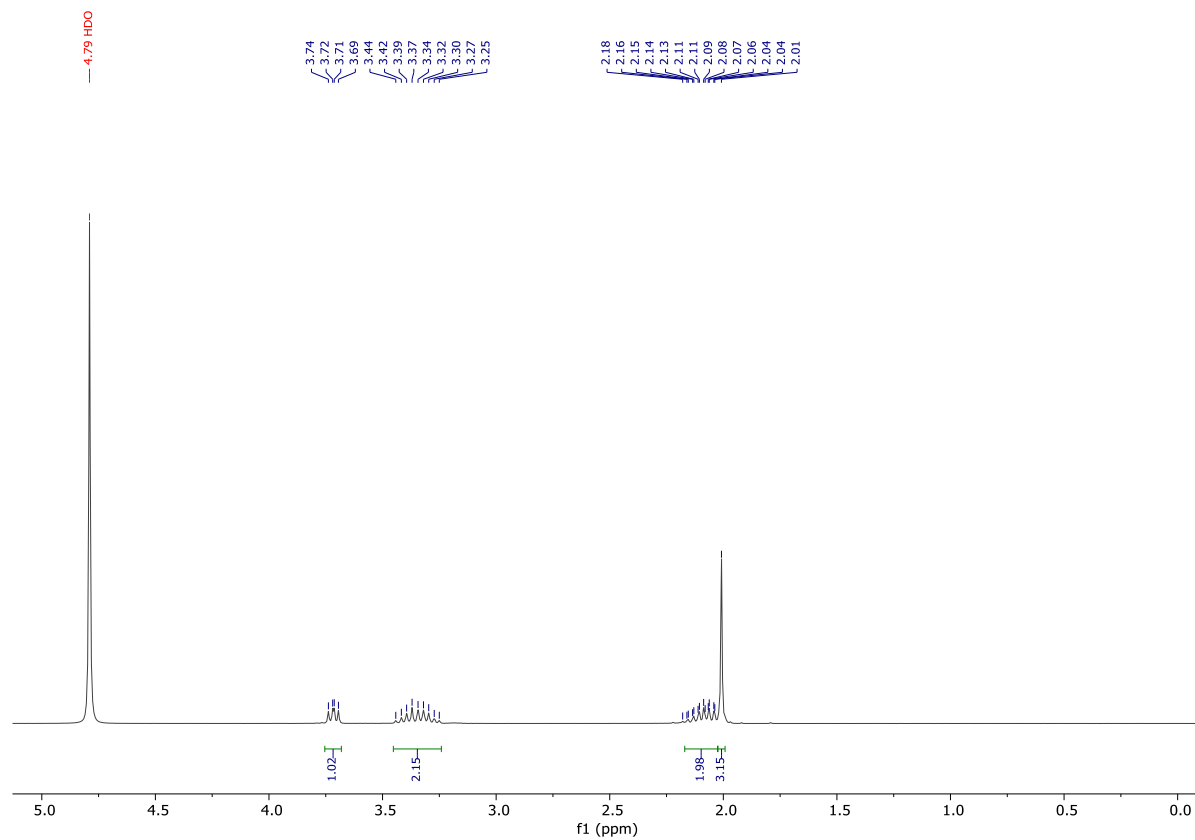
Slika D1.12. ^{13}C APT NMR spektar spoja 3.

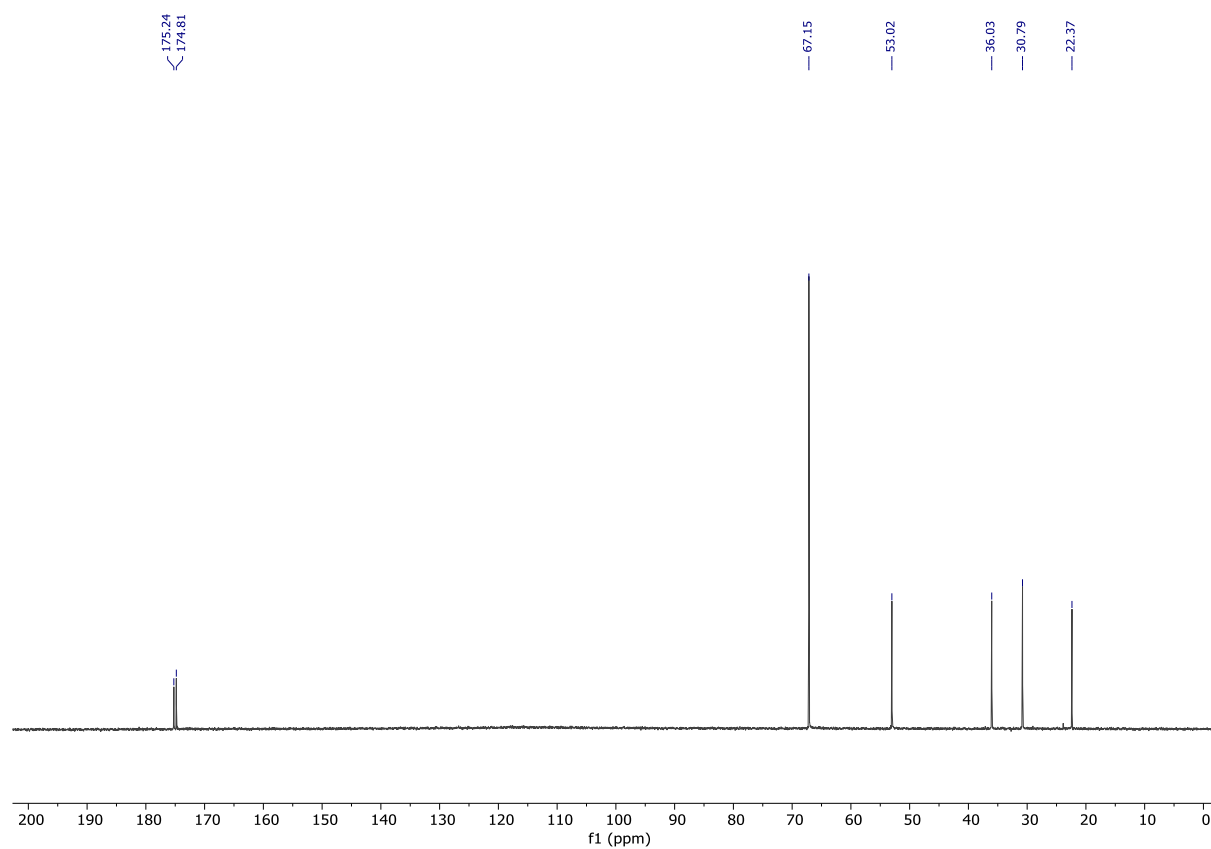
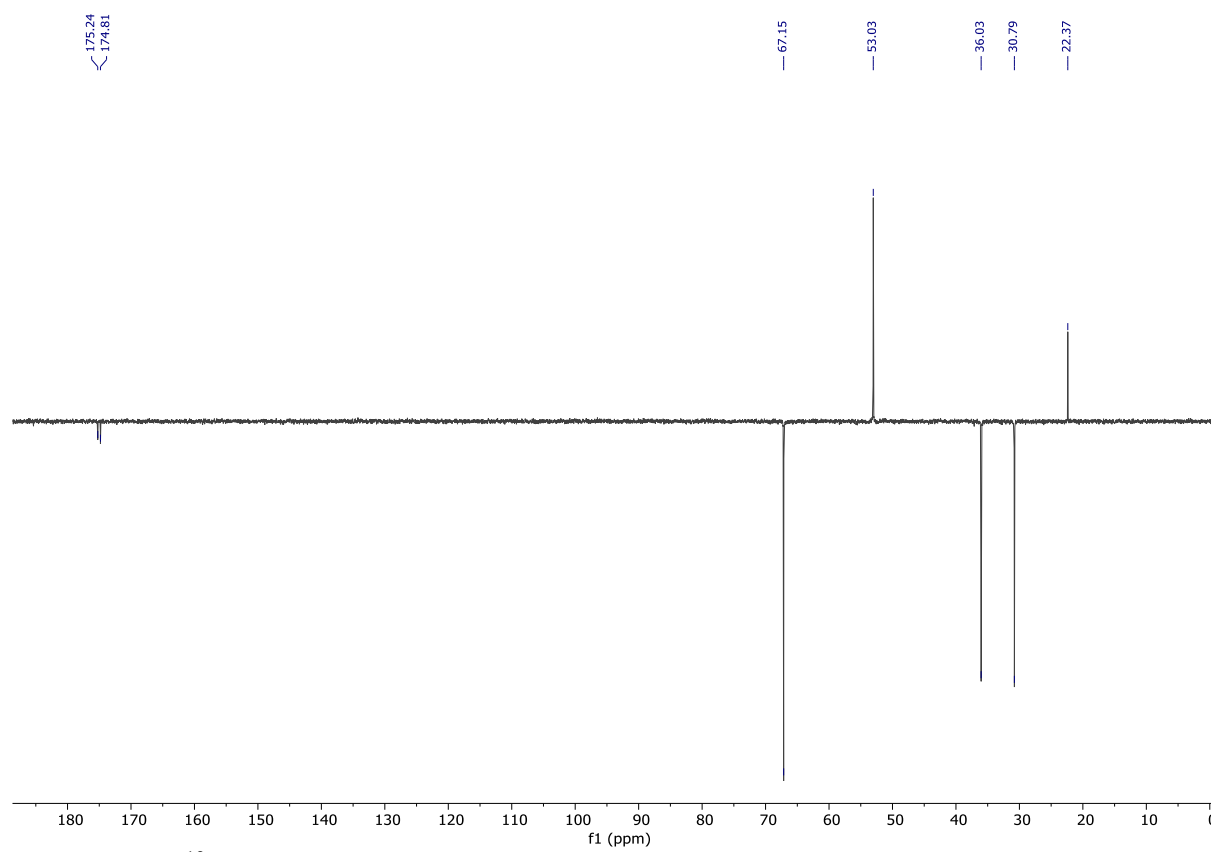


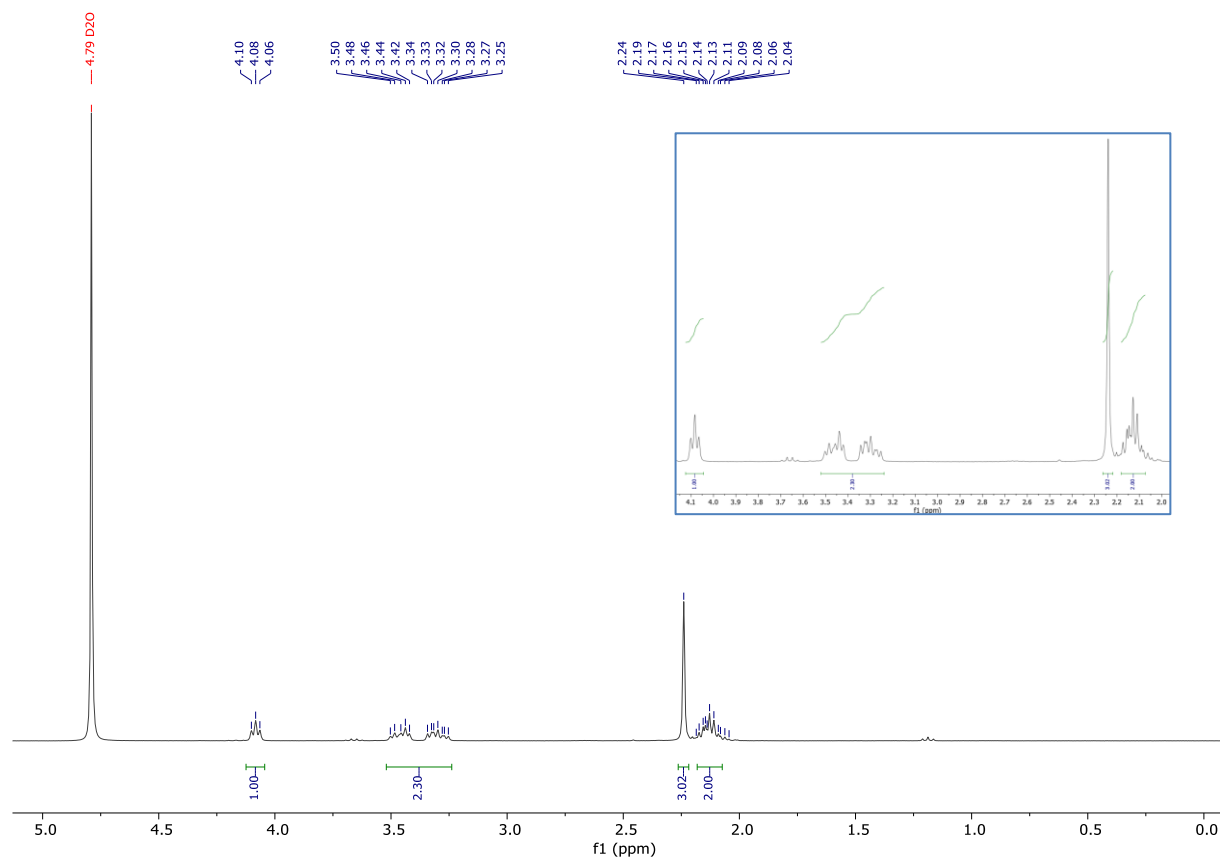
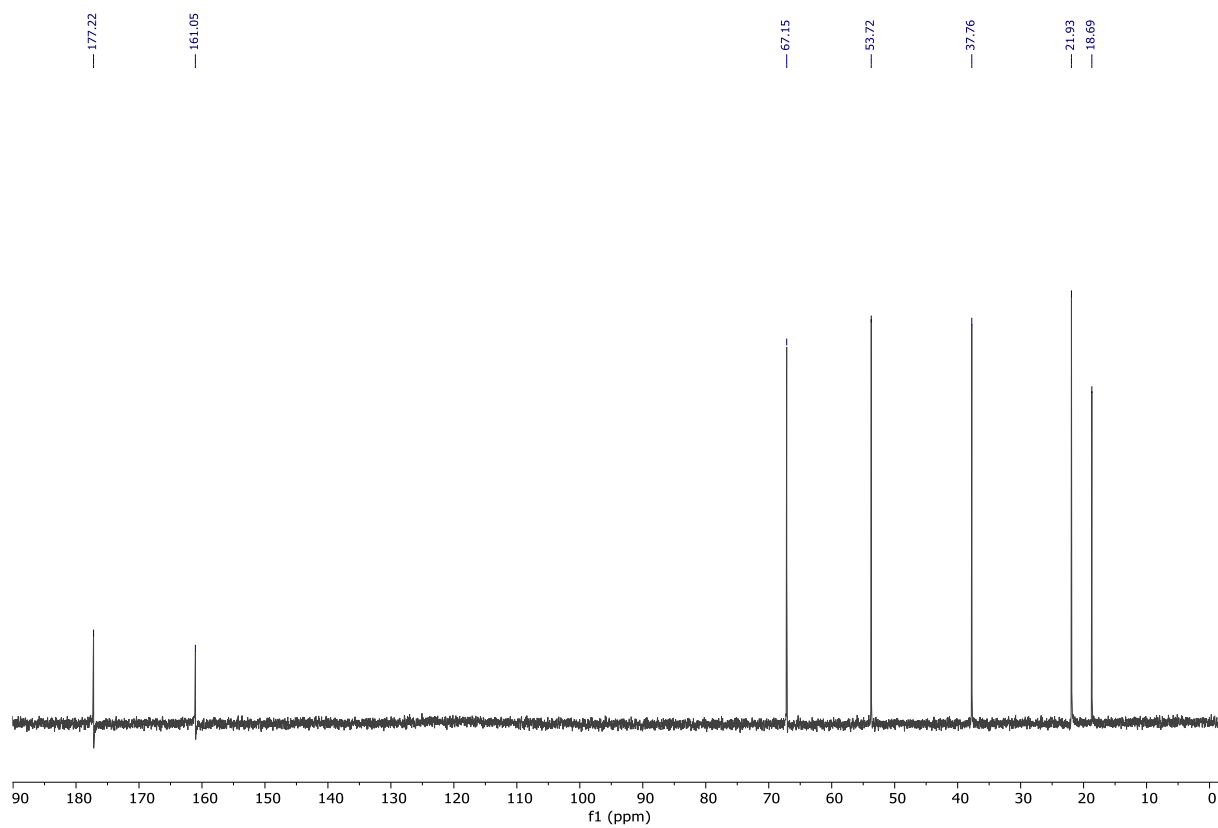
Slika D1.13. ^1H NMR spektar spoja 4.

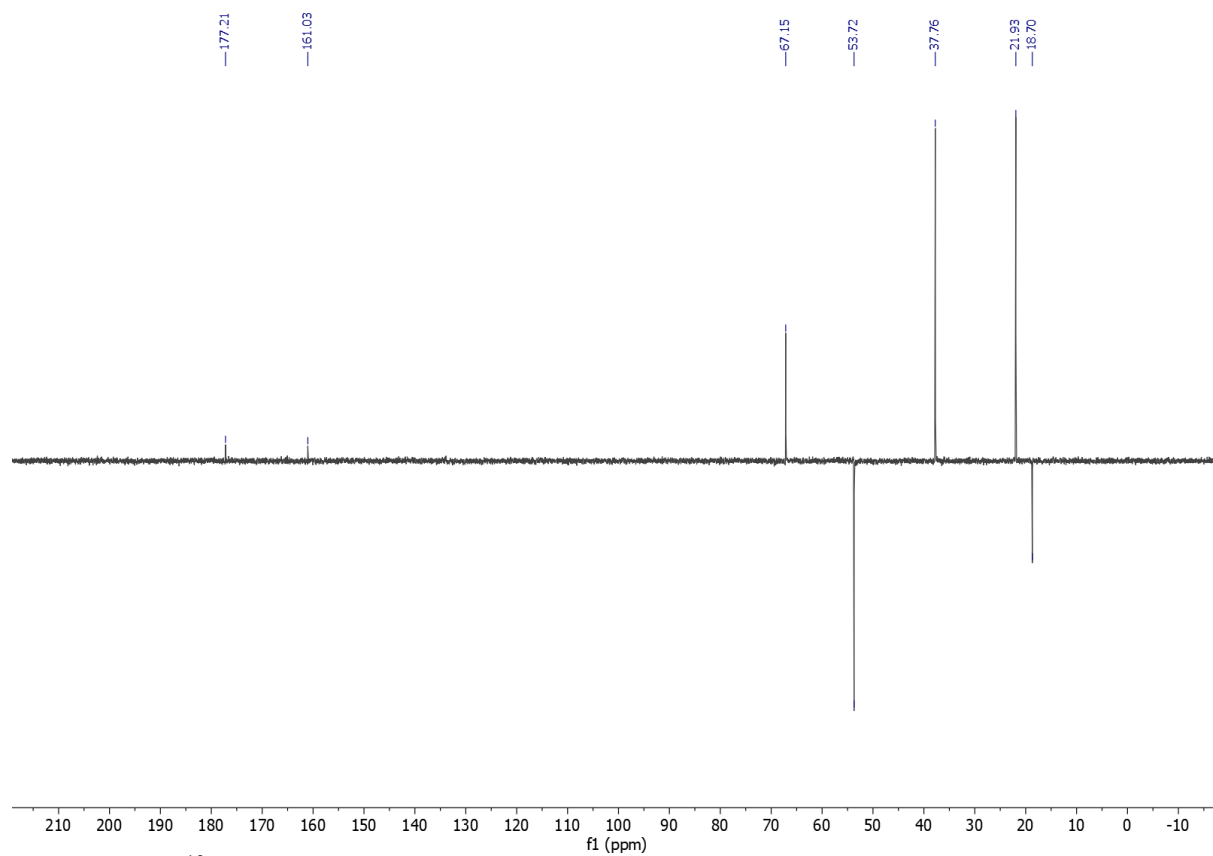
Slika D1.14. ^{13}C NMR spektar spoja 4.Slika D1.15. ^{13}C APT NMR spektar spoja 4.

Slika D1.16. ¹H NMR spektar spoja 5.Slika D1.17. ¹³C NMR spektar spoja 5.

Slika D1.18. ^{13}C APT NMR spektar spoja 5.Slika D1.19. ^1H NMR spektar spoja 6.

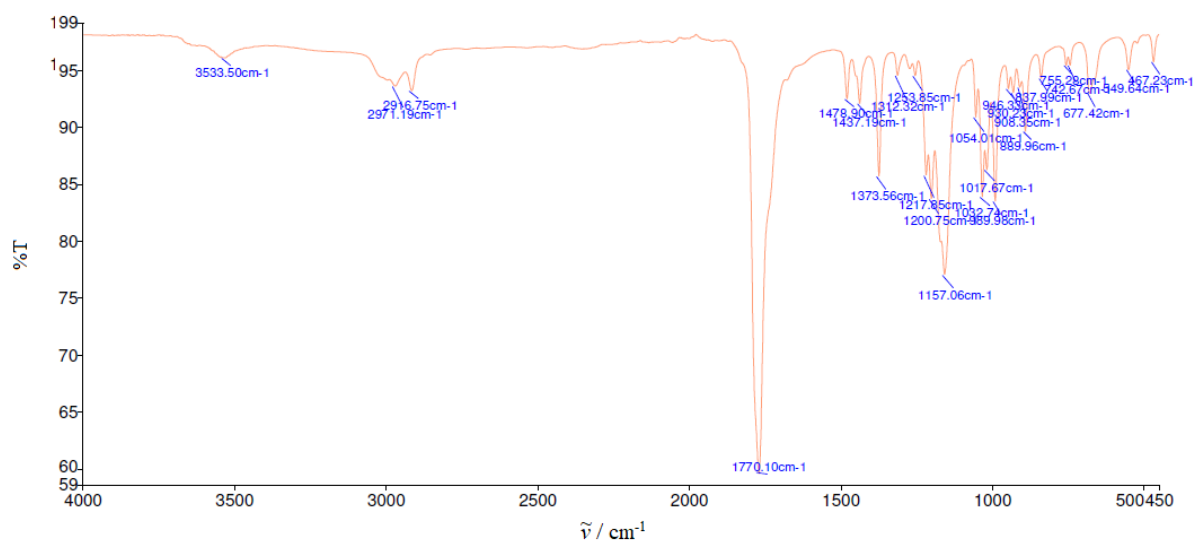
Slika D1.20. ^{13}C NMR spektar spoja 6.Slika D1.21. ^{13}C APT NMR spektar spoja 6.

Slika D1.22. ¹H NMR spektar spoja 7.Slika D1.23. ¹³C NMR spektar spoja 7.

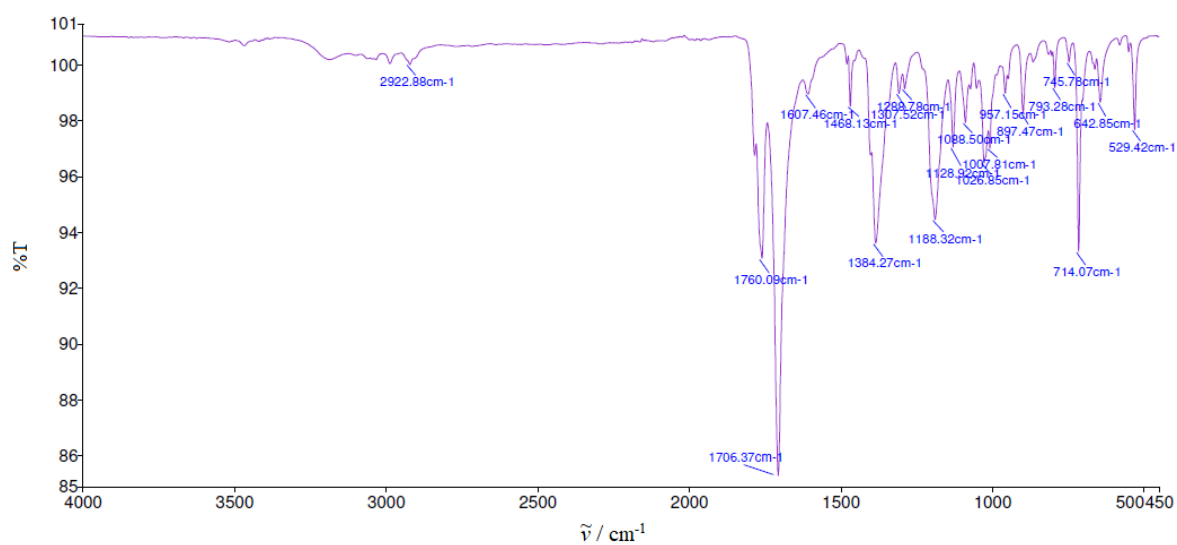


Slika D1.24. ^{13}C APT NMR spektar spoja 7.

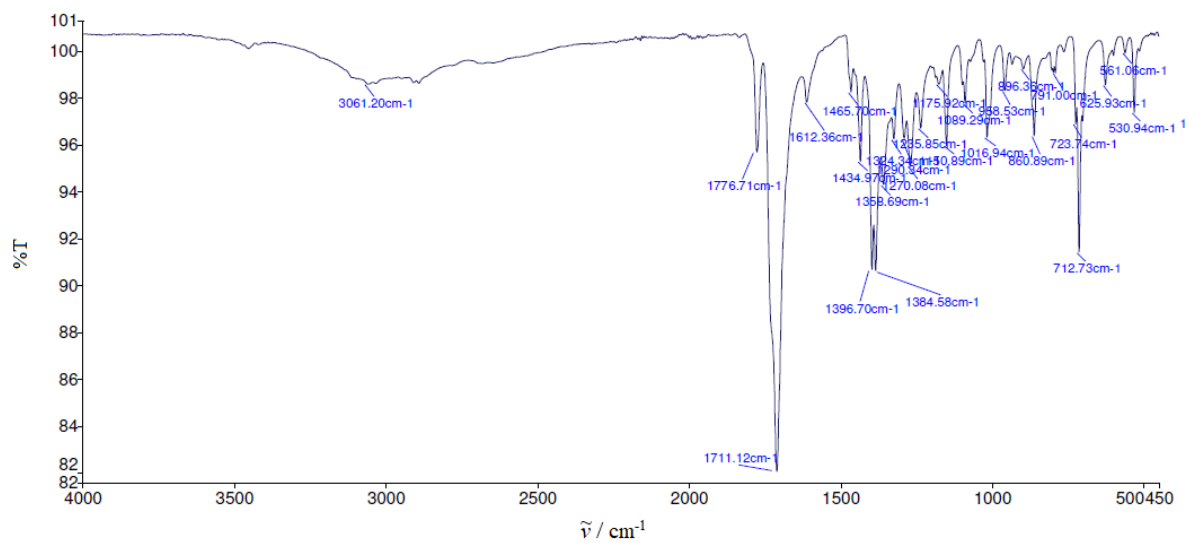
8.2. IR spektri



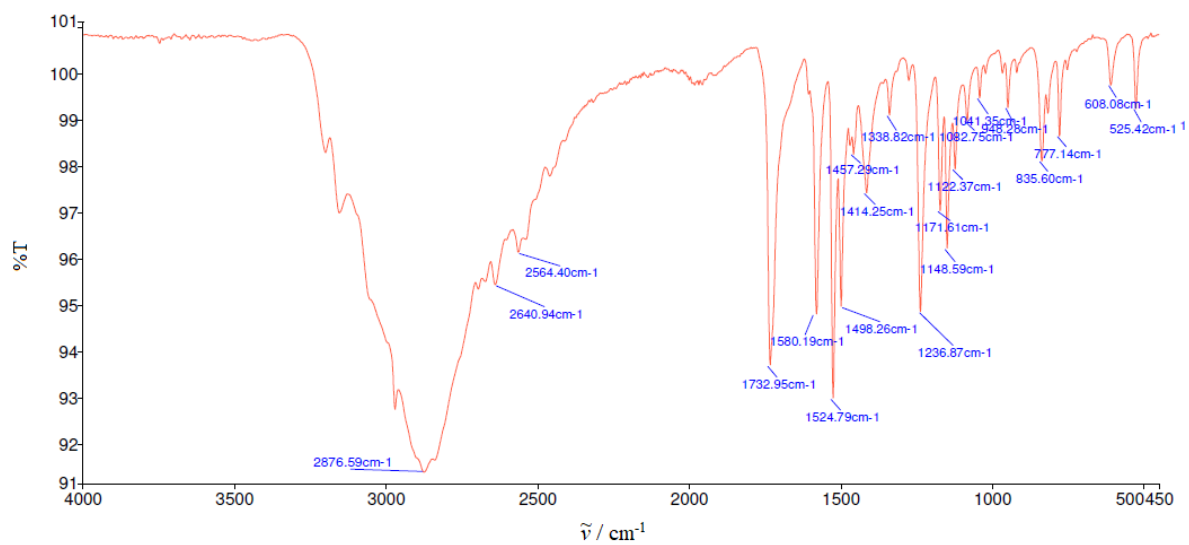
Slika D2.1. IR spektar spoja 1.



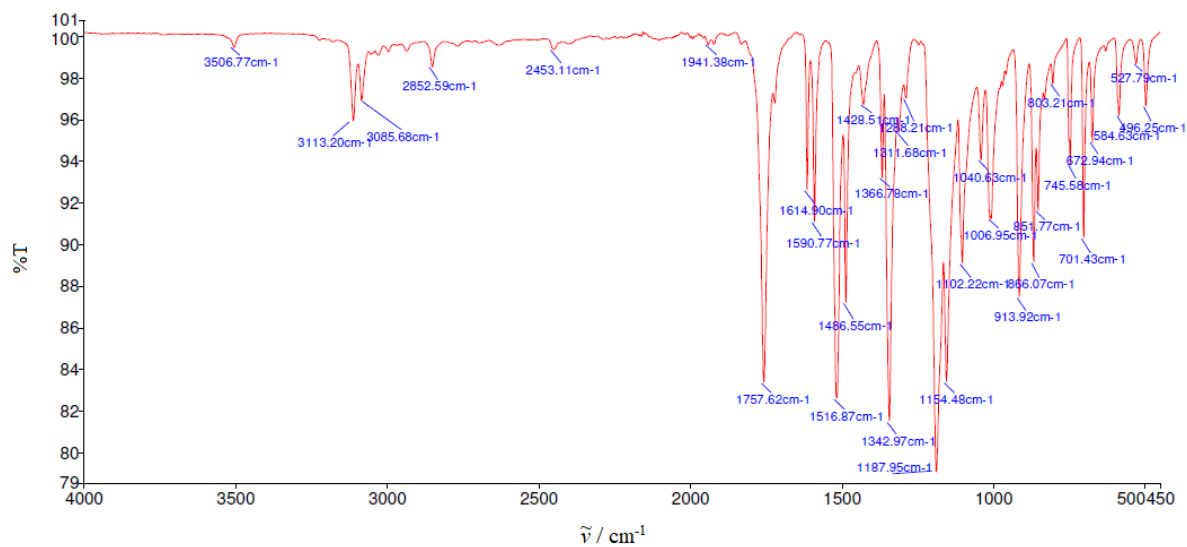
Slika D2.2. IR spektar spoja 2.



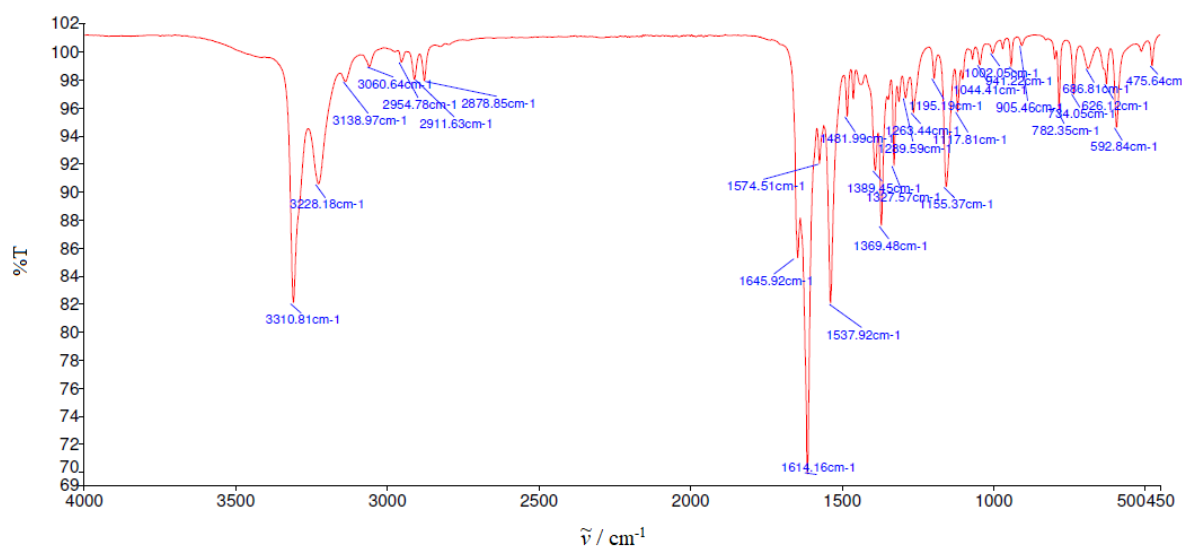
Slika D2.3. IR spektar spoja 3.



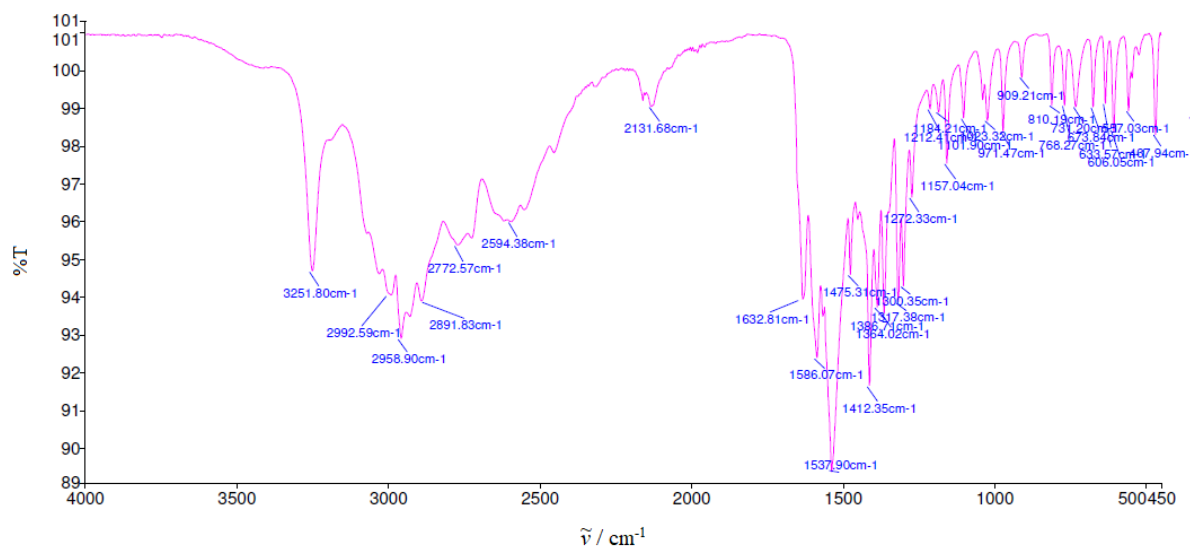
Slika D2.4. IR spektar spoja 4.



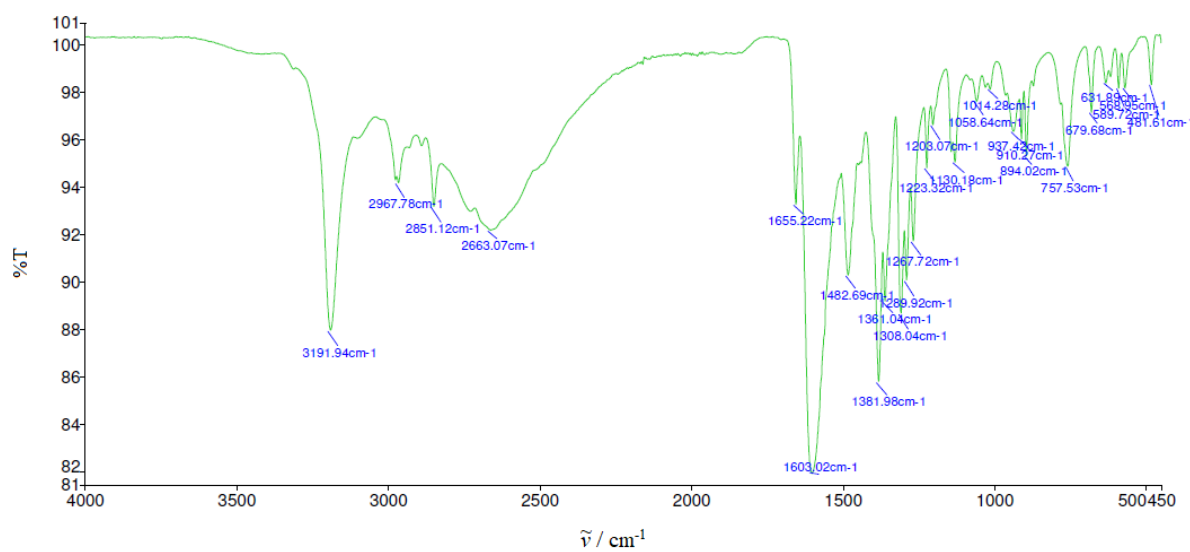
Slika D2.5. IR spektar spoja 5.



Slika D2.6. IR spektar kompleksa Cu(II) iona i spoja 6.



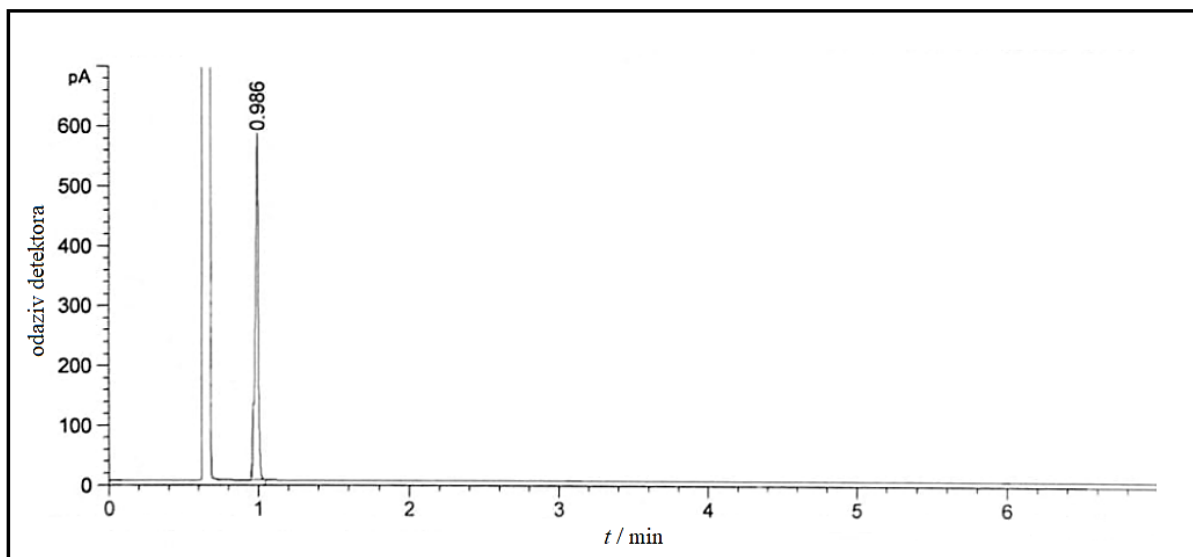
Slika D2.7. IR spektar spoja 6.



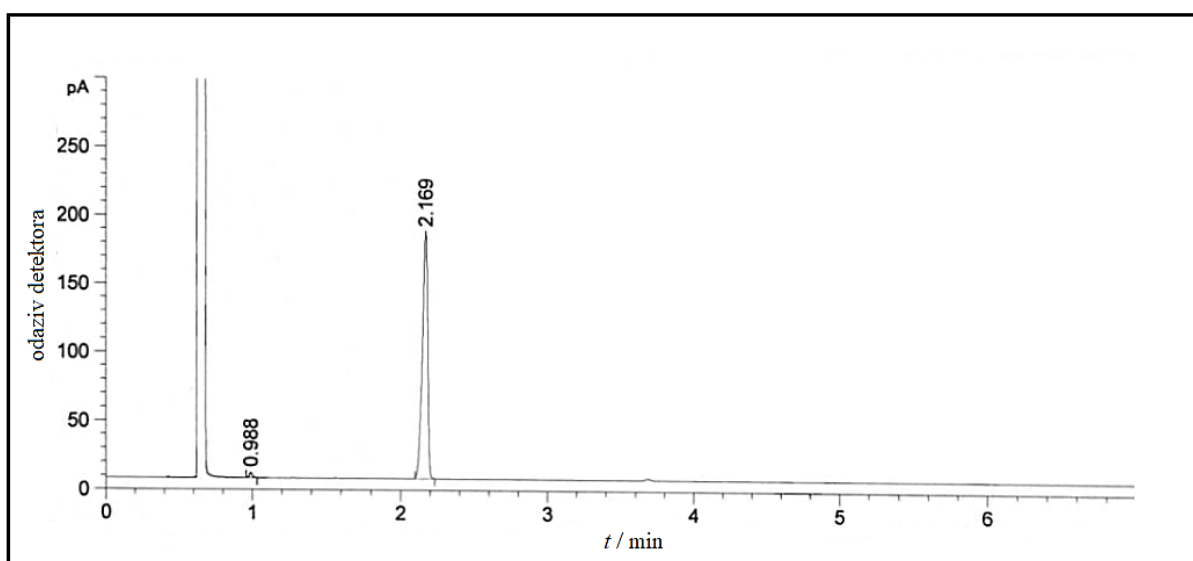
Slika D2.8. IR spektar spoja 7.

8.3. Kromatogrami

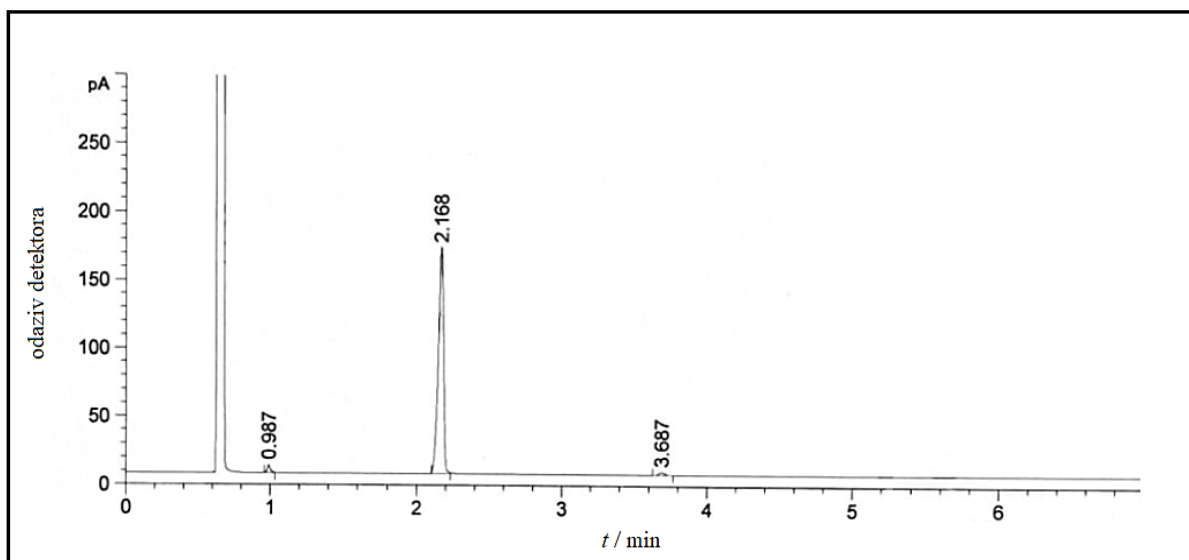
8.3.1. Analiza reakcijske smjese i produkata sinteze spoja **1** plinskom kromatografijom



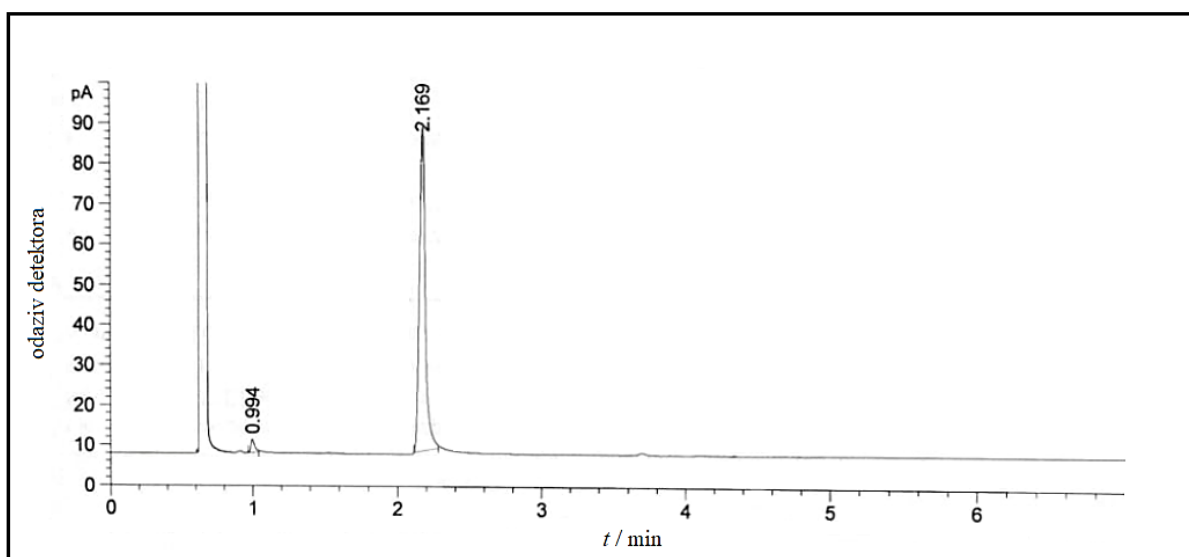
Slika D3.1.1. Kromatogram dihidrofuran-2(3H)-ona (standard).



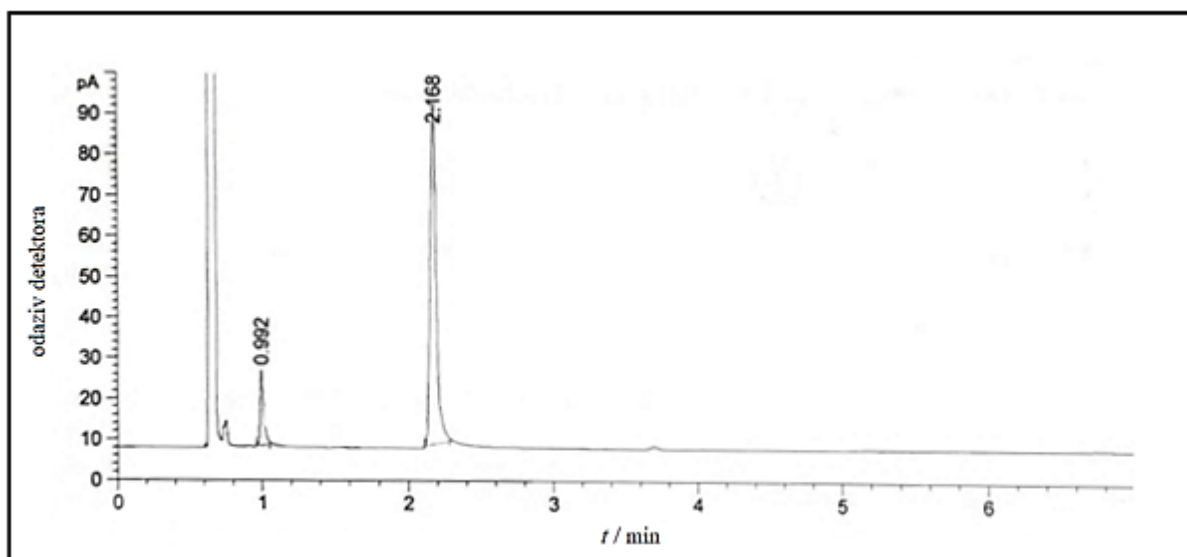
Slika D3.1.2. Kromatogram 3-bromodihidrofuran-2(3H)-ona (**1**) (standard).



Slika D3.1.3. Kromatogram 3-bromdihidrofuran-2(3H)-ona (1).

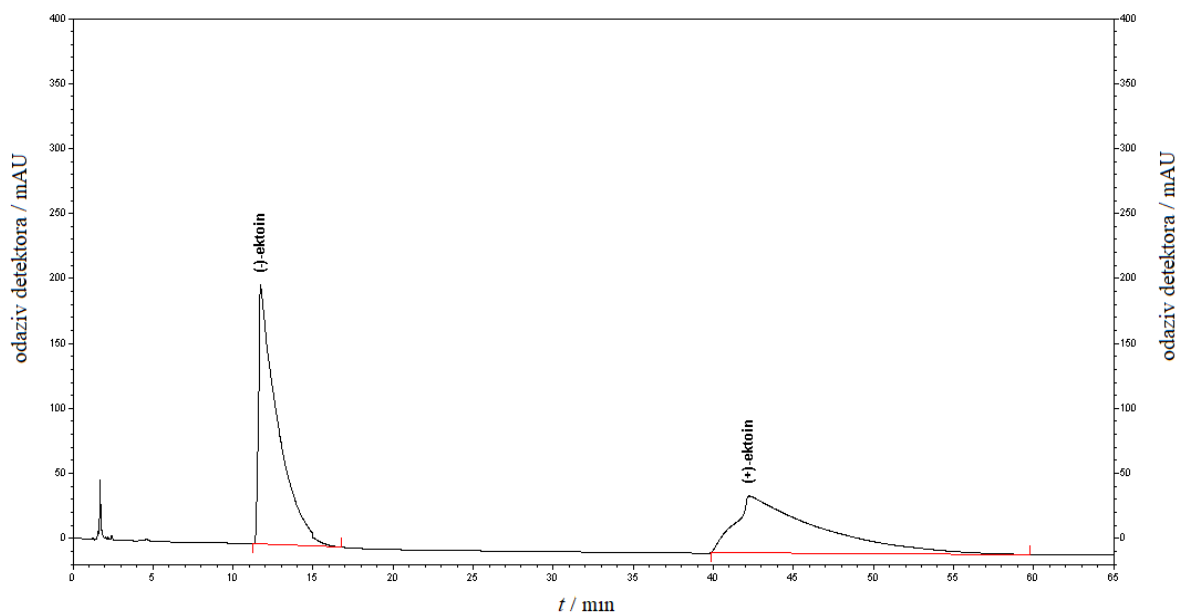


Slika D3.1.4. Kromatogram 2,4-dibrombutanske kiseline.

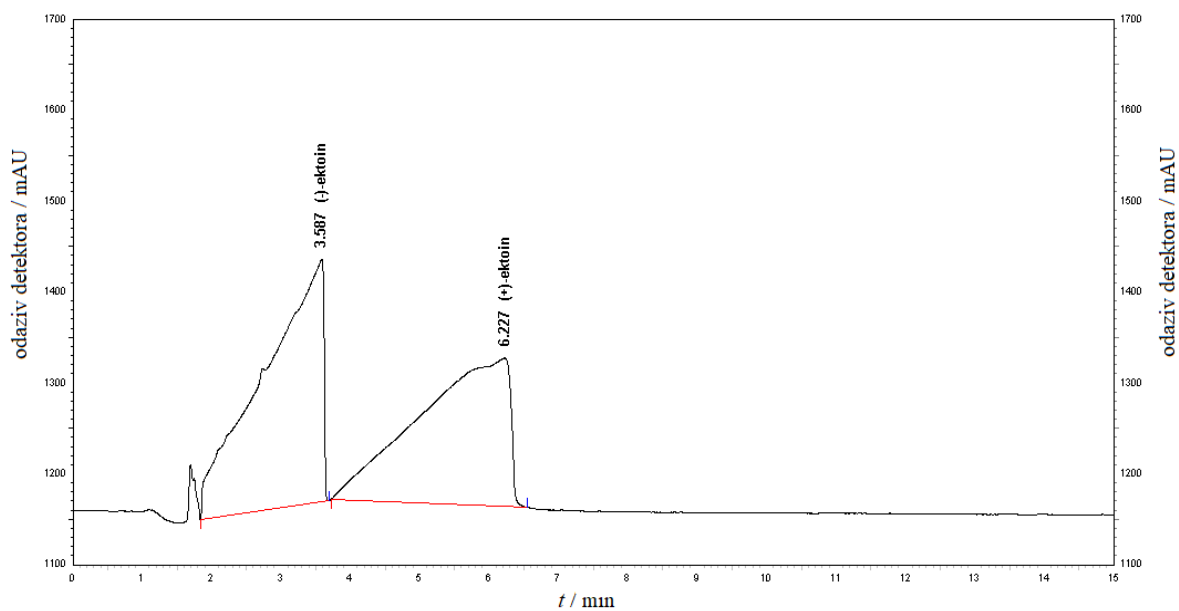


Slika D3.1.5. Kromatogram reakcijske smjese tijekom pripreve spoja 1, a prije destilacije.

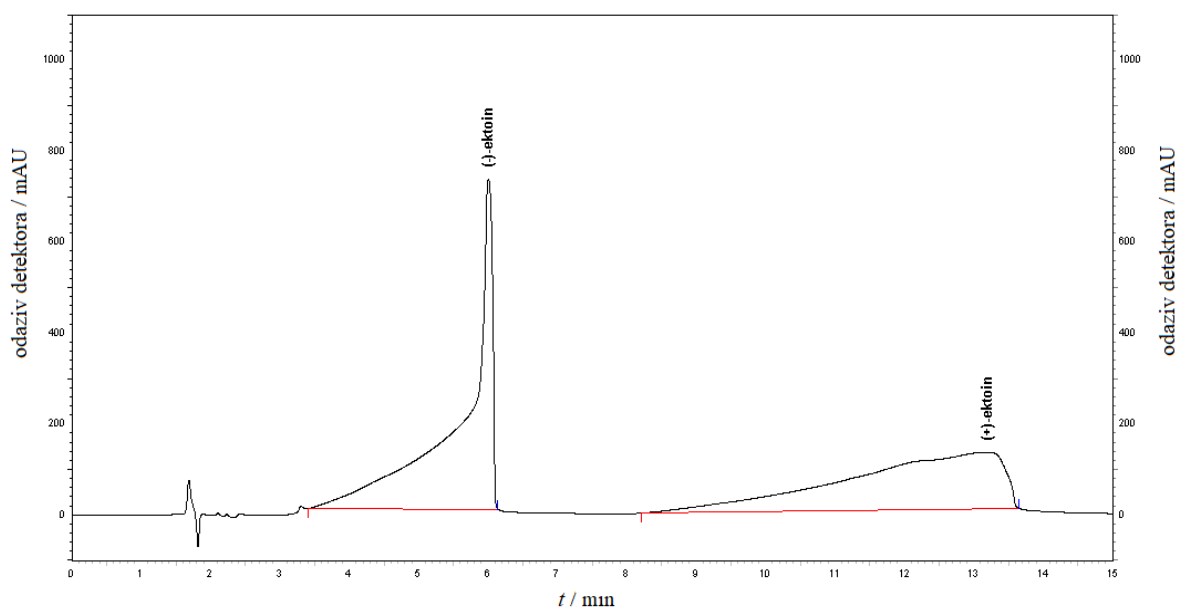
8.3.2. Odvajanje enantiomera (\pm)-ektoina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti



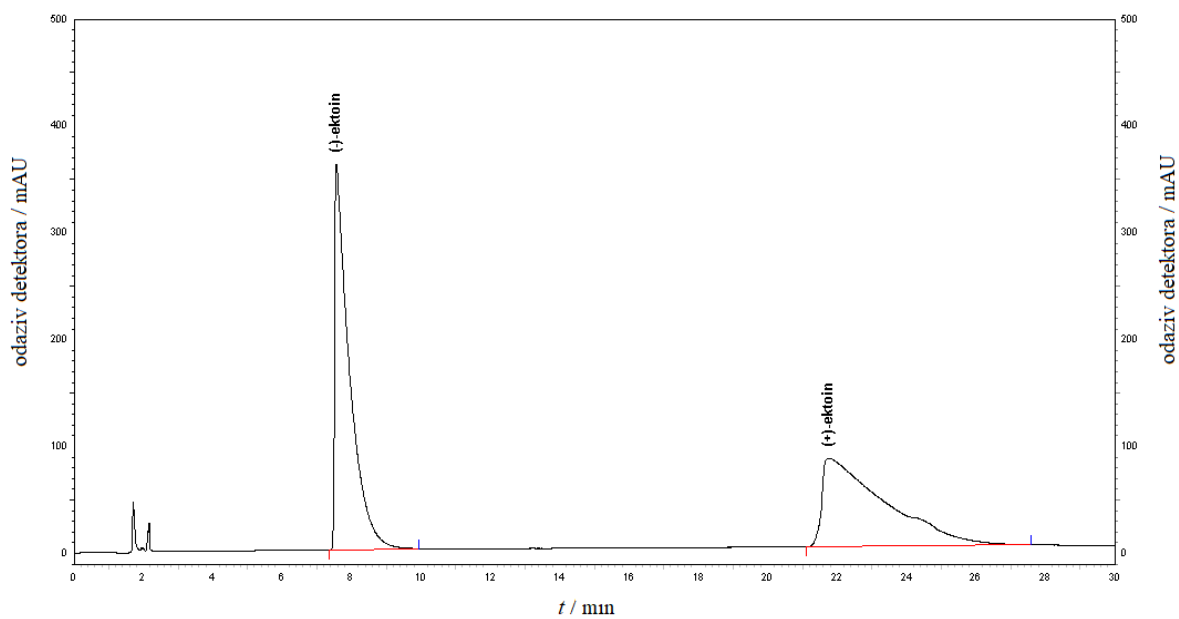
Slika D3.2.1. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 16).



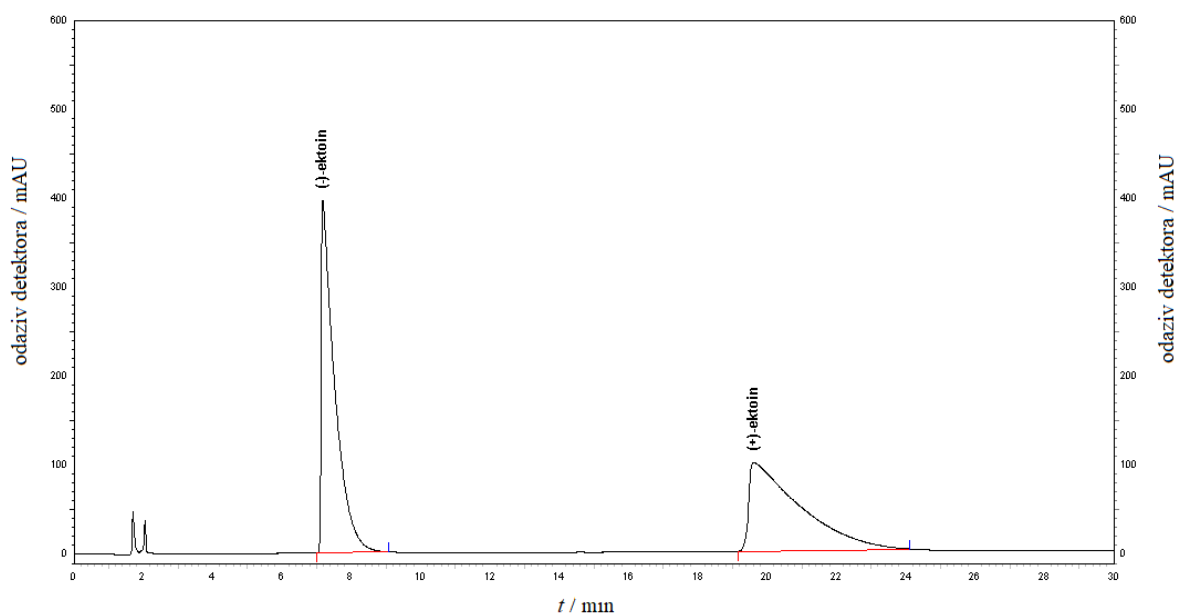
Slika D3.2.2. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 17).



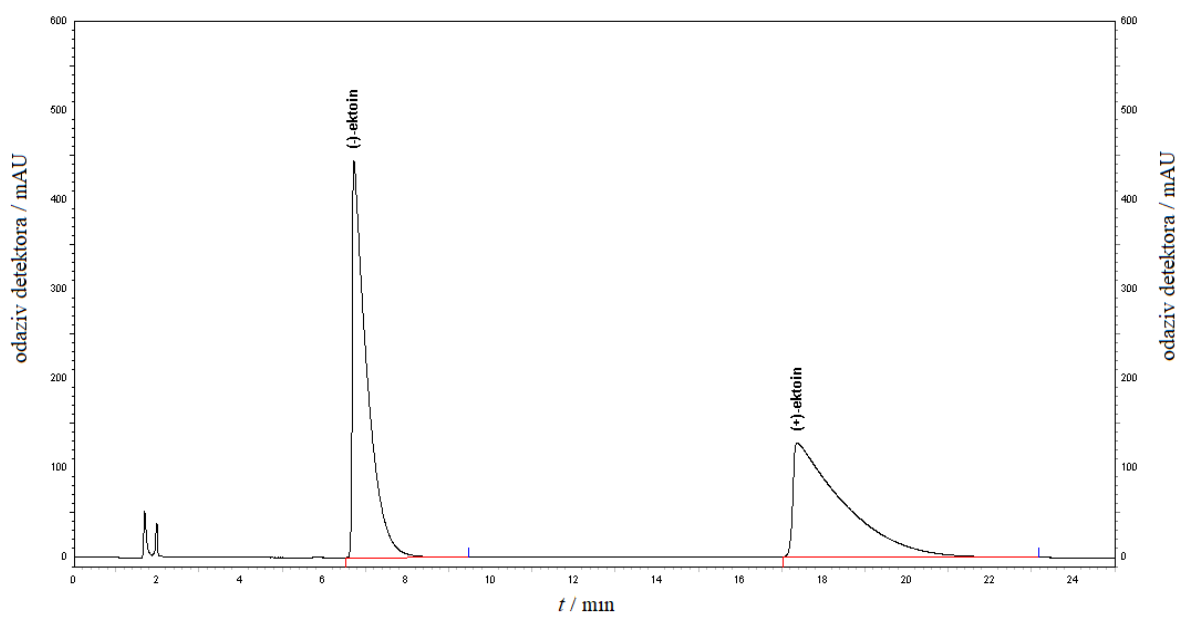
Slika D3.2.3. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 18).



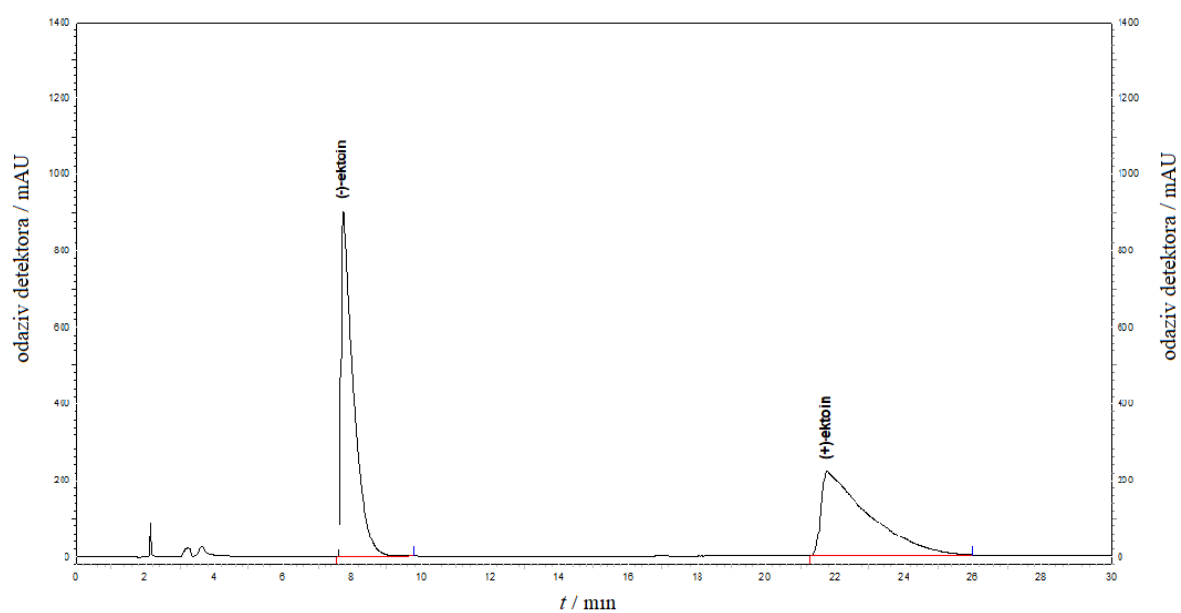
Slika D3.2.4. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 20).



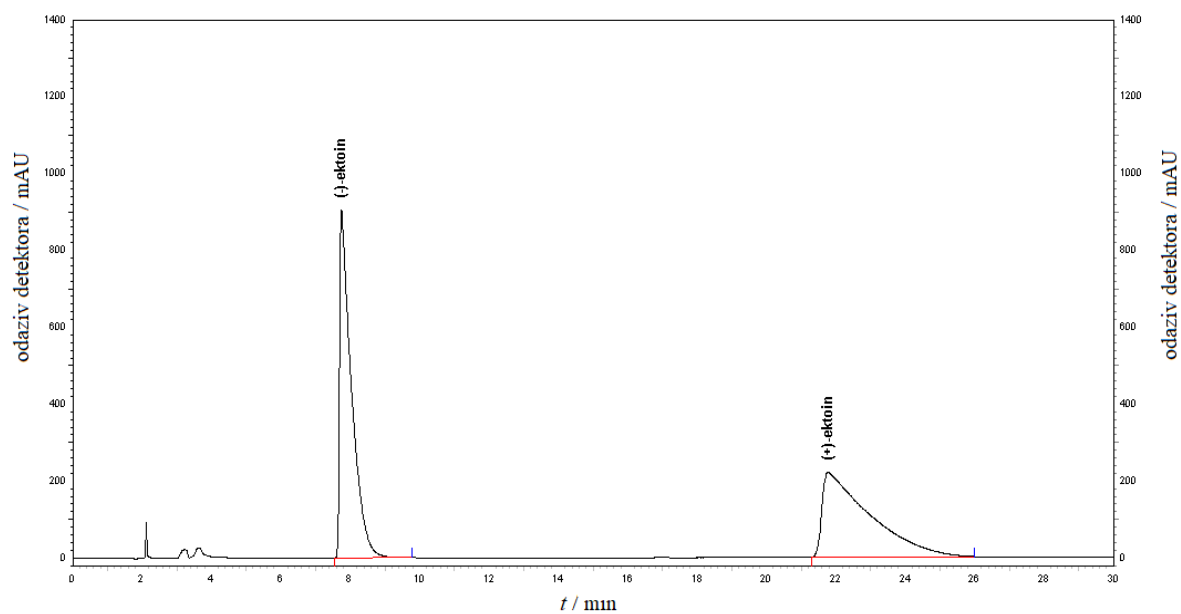
Slika D3.2.5. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 21).



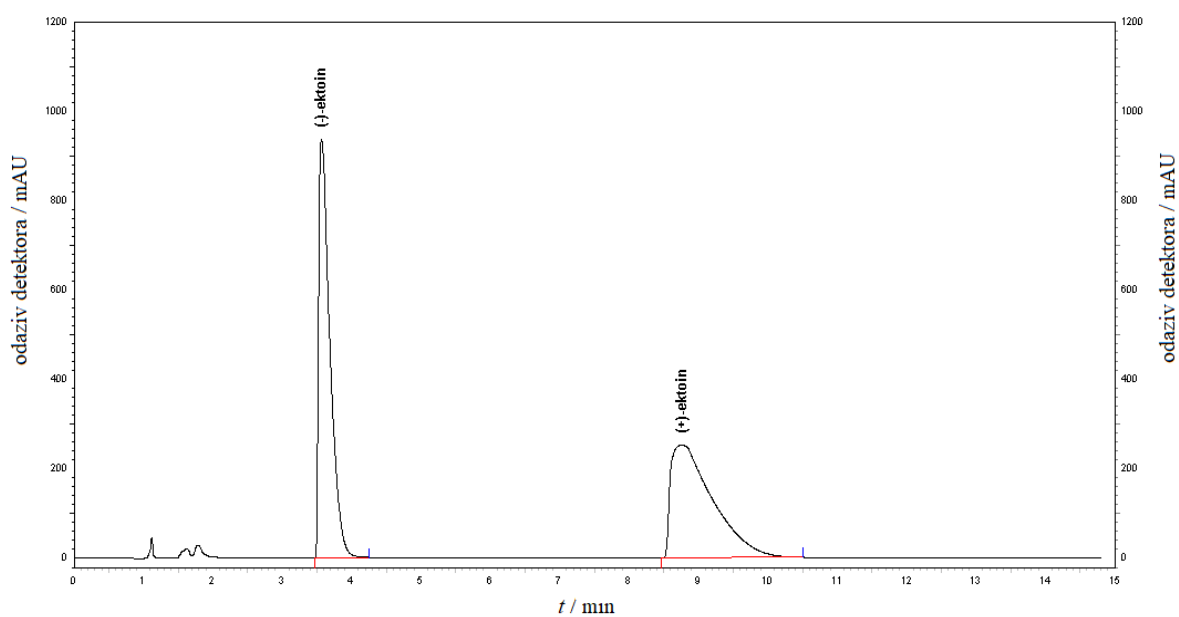
Slika D3.2.6. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 22).



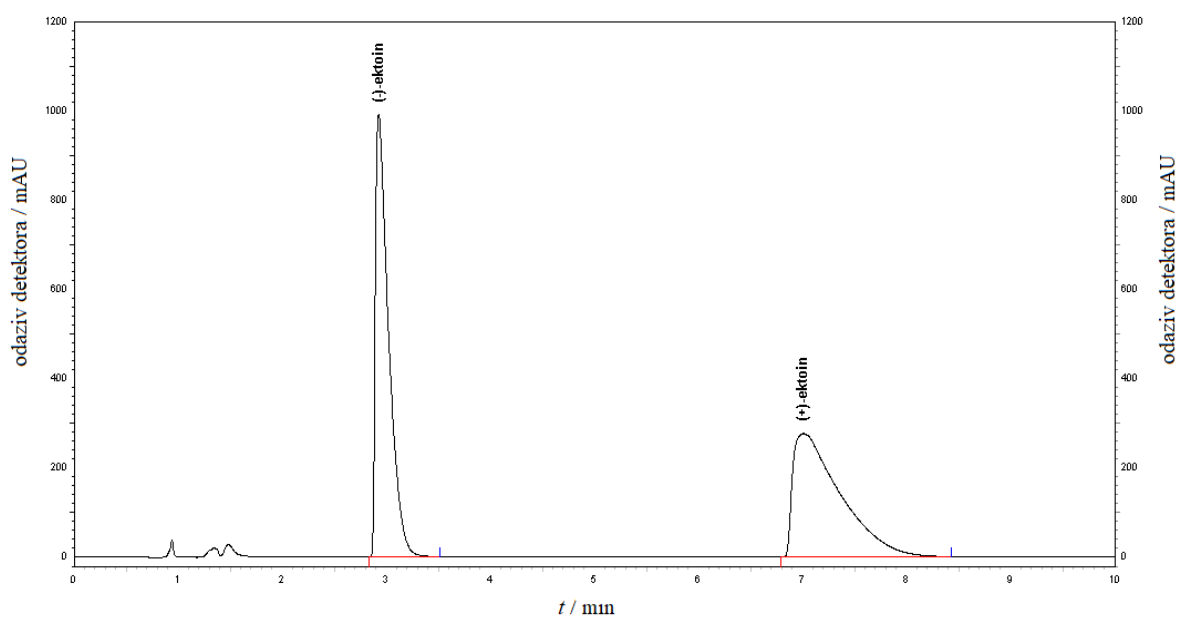
Slika D3.2.7. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 23).



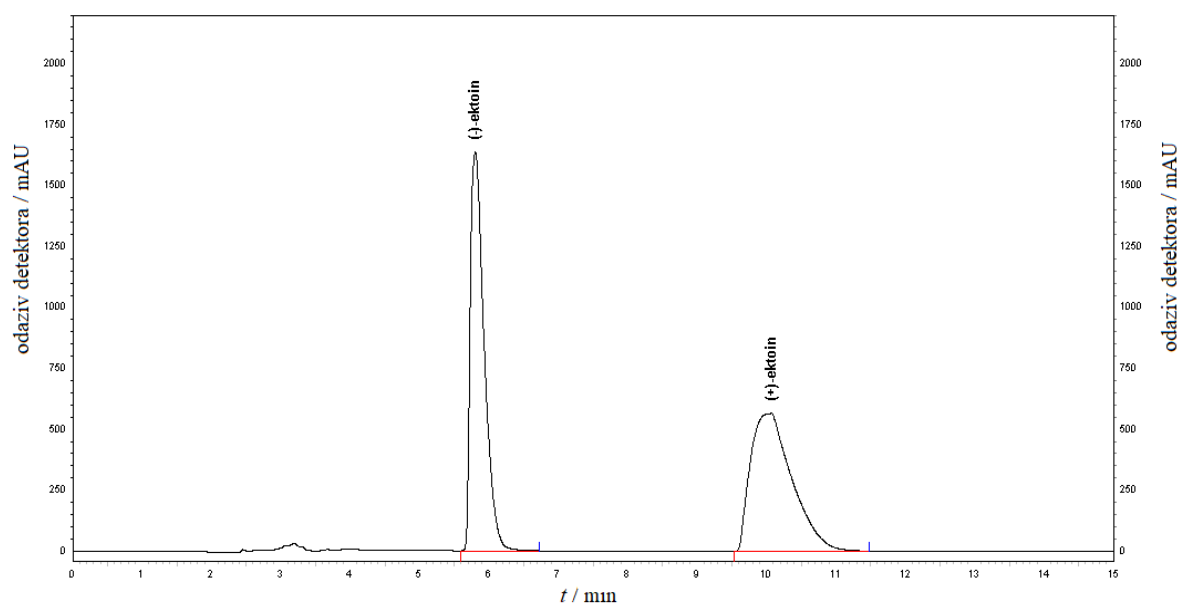
Slika D3.2.8. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 24).



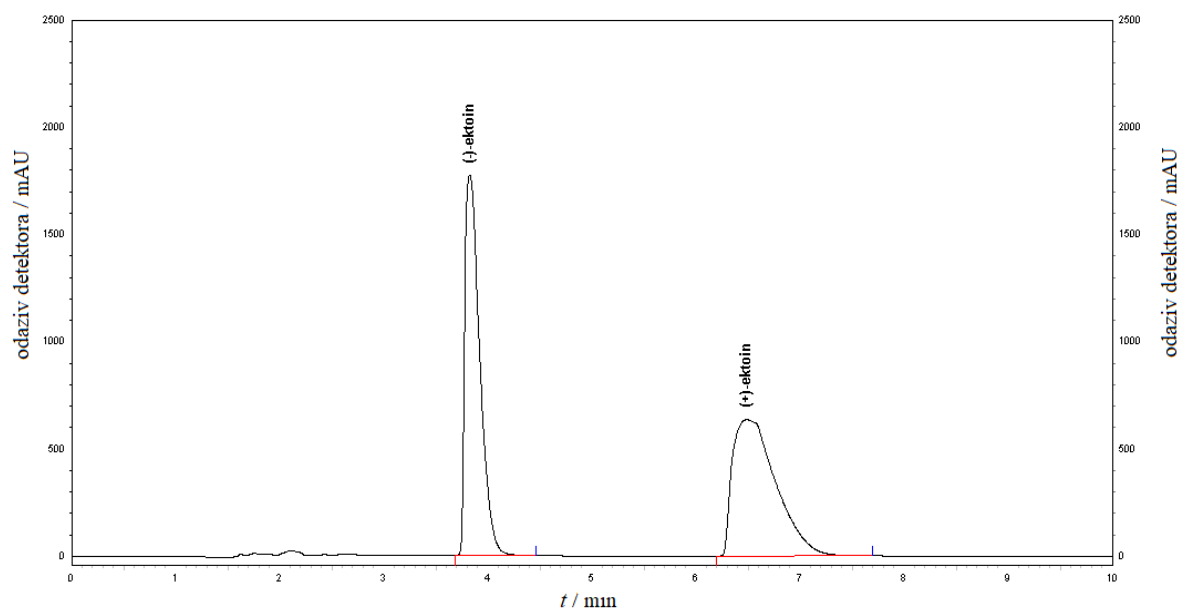
Slika D3.2.9. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 25).



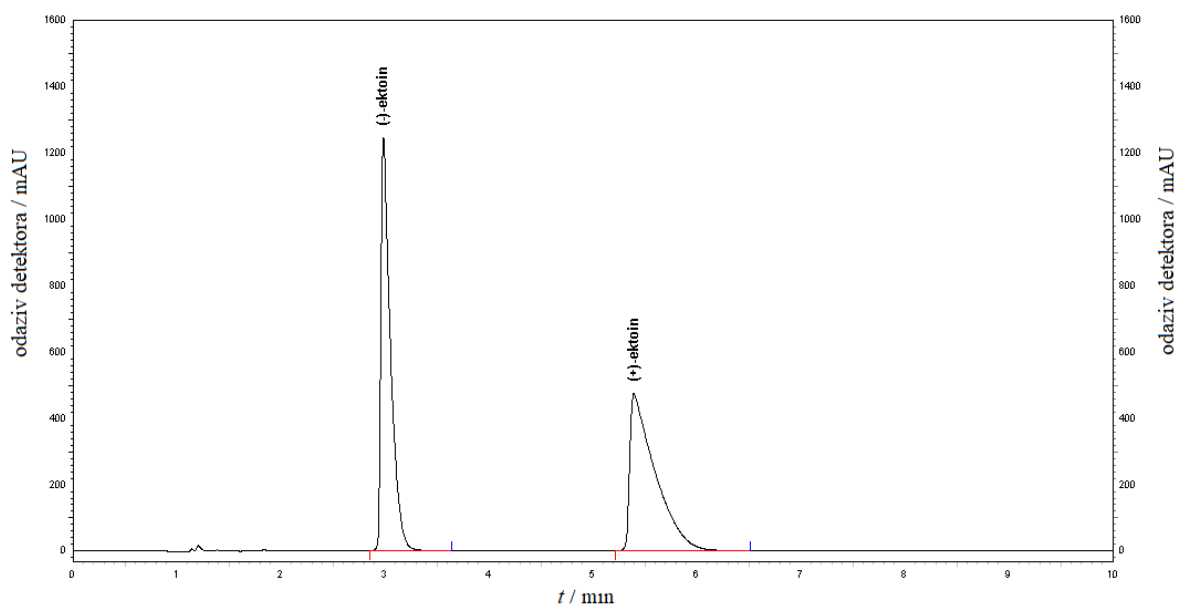
Slika D3.2.10. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 26).



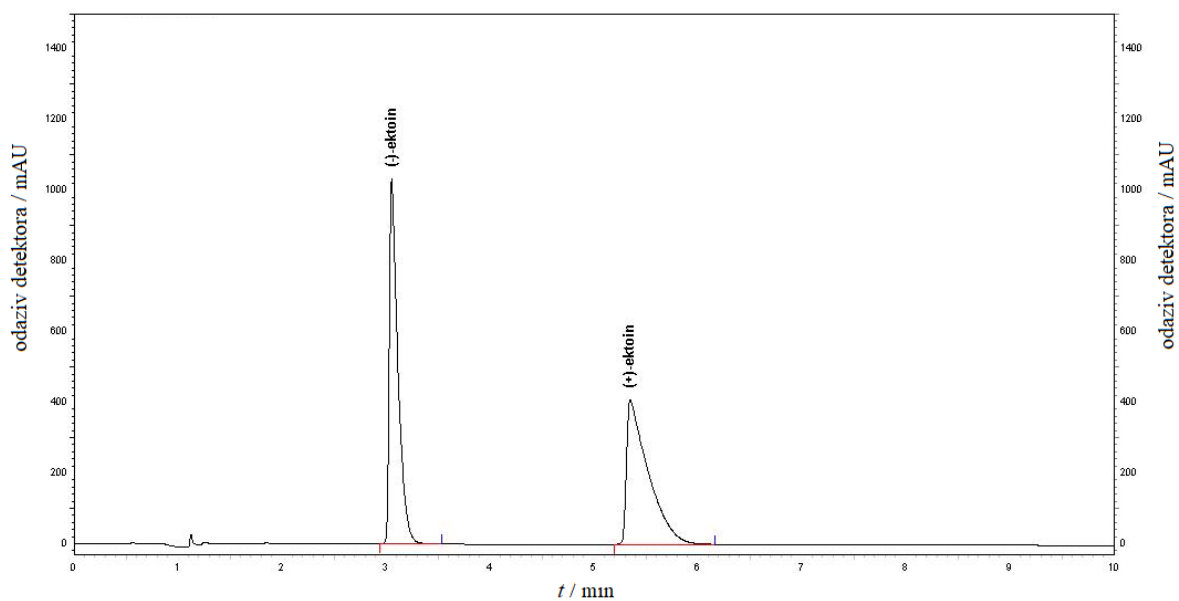
Slika D3.2.11. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 27).



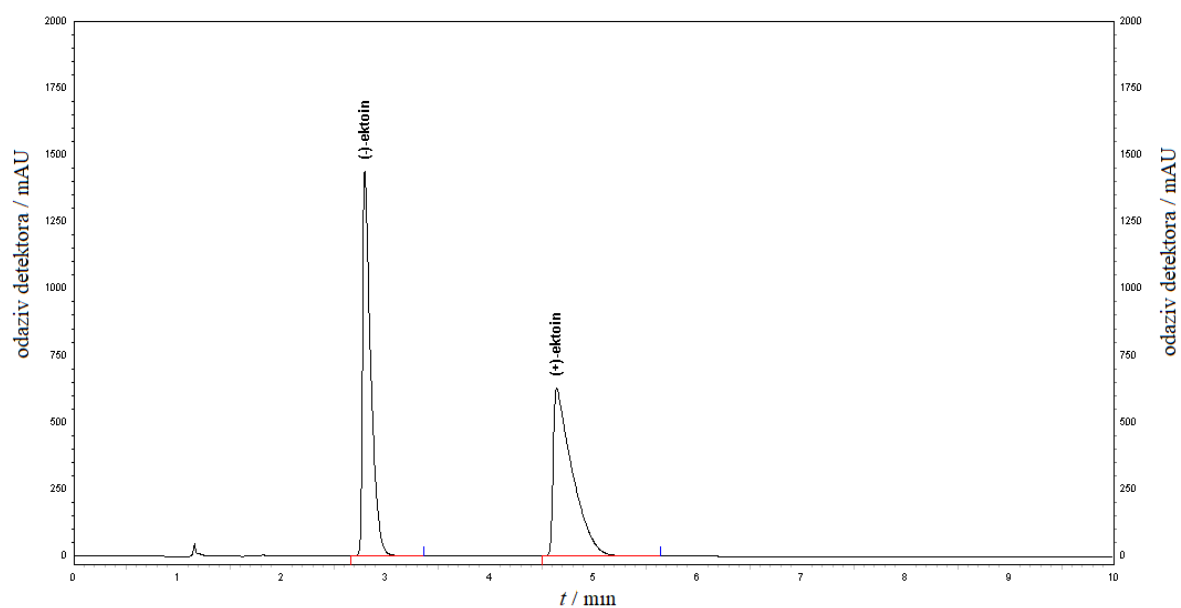
Slika D3.2.12. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 28).



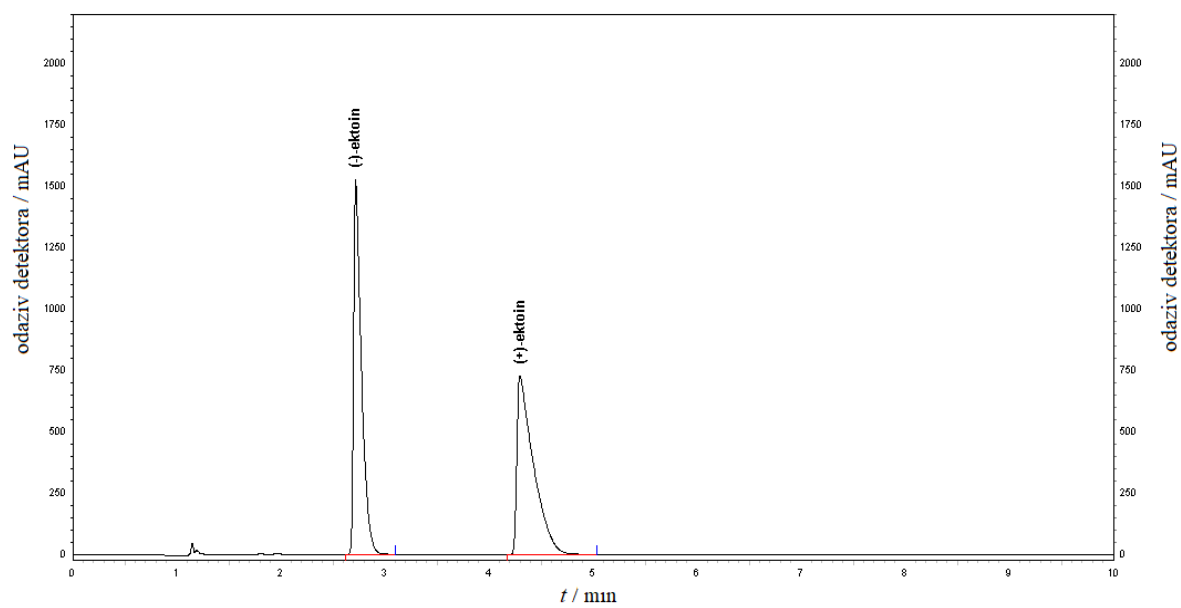
Slika D3.2.13. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 29).



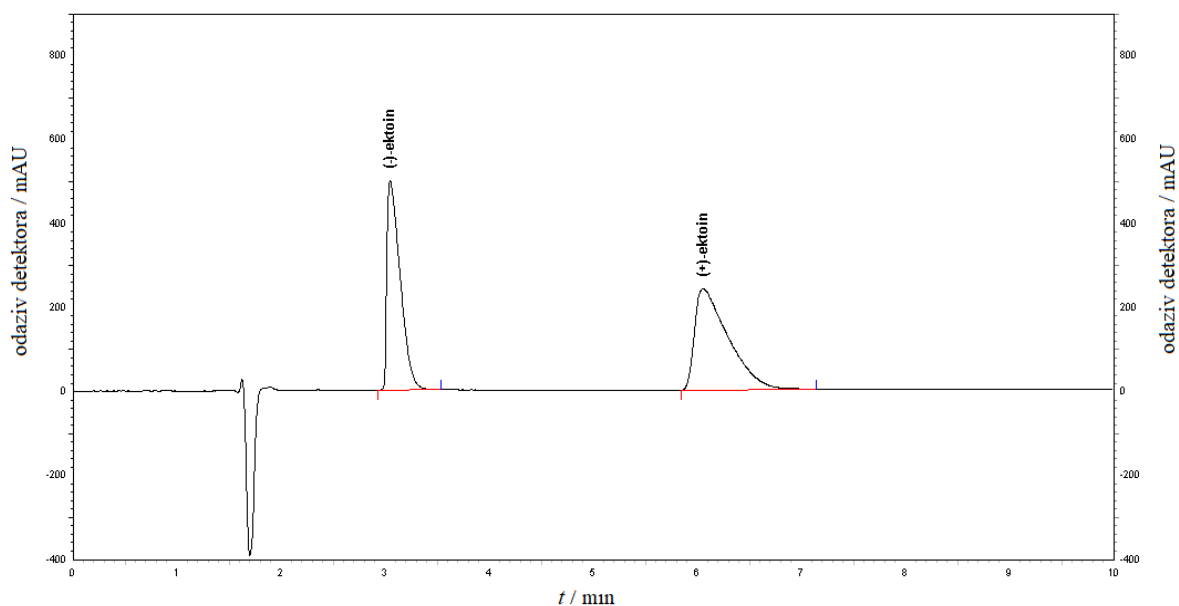
Slika D3.2.14. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 30).



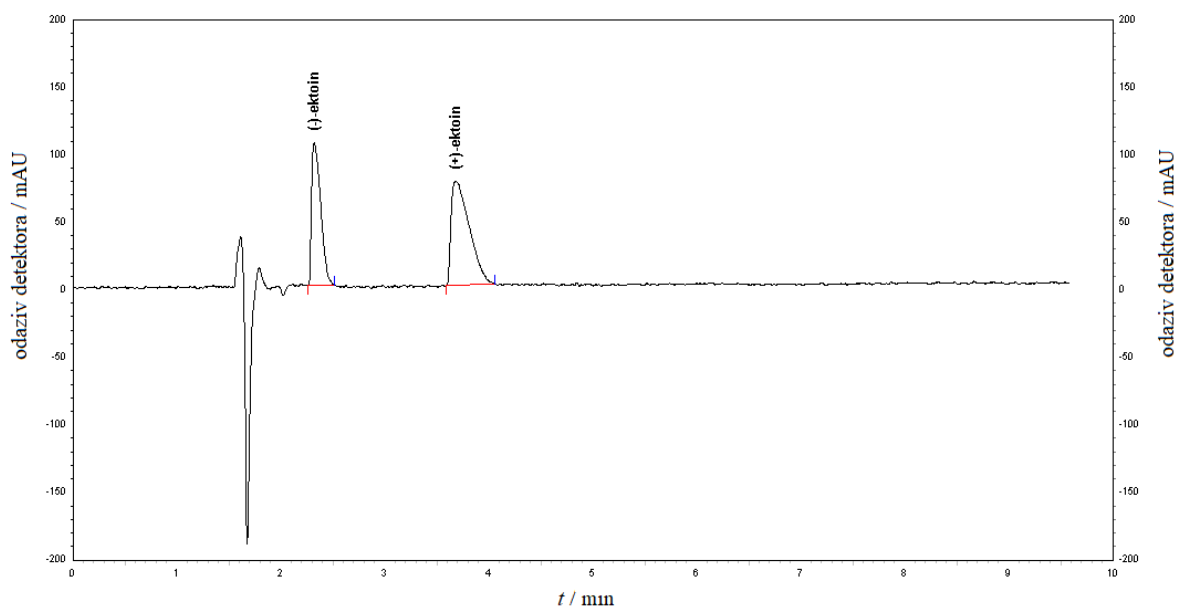
Slika D3.2.15. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 31).



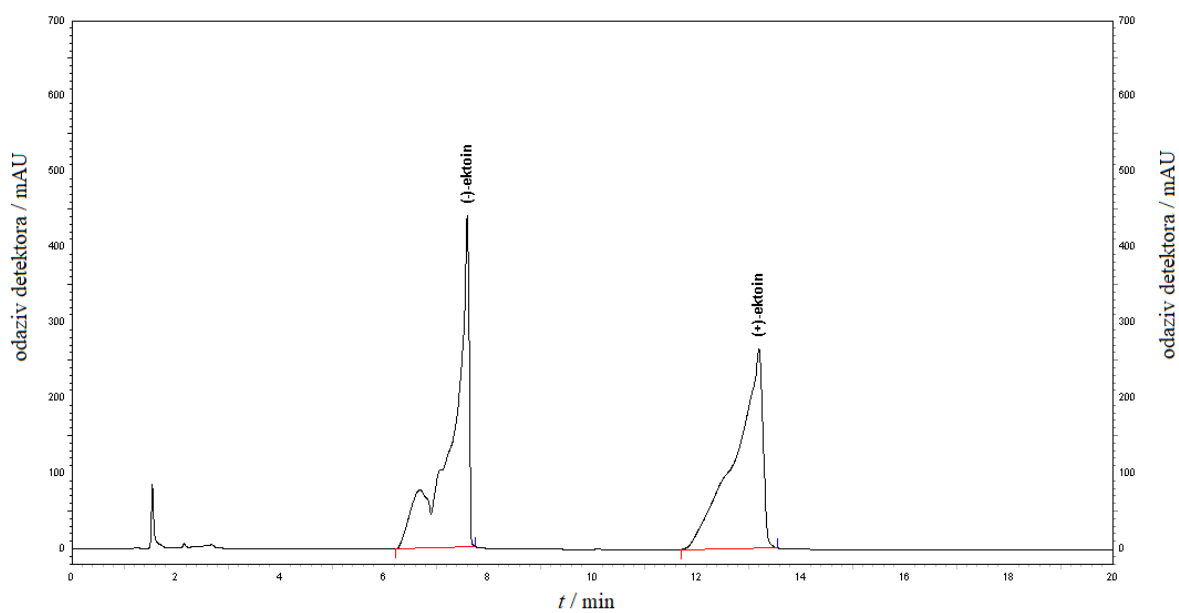
Slika D3.2.16. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 32).



Slika D3.2.17. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 33).

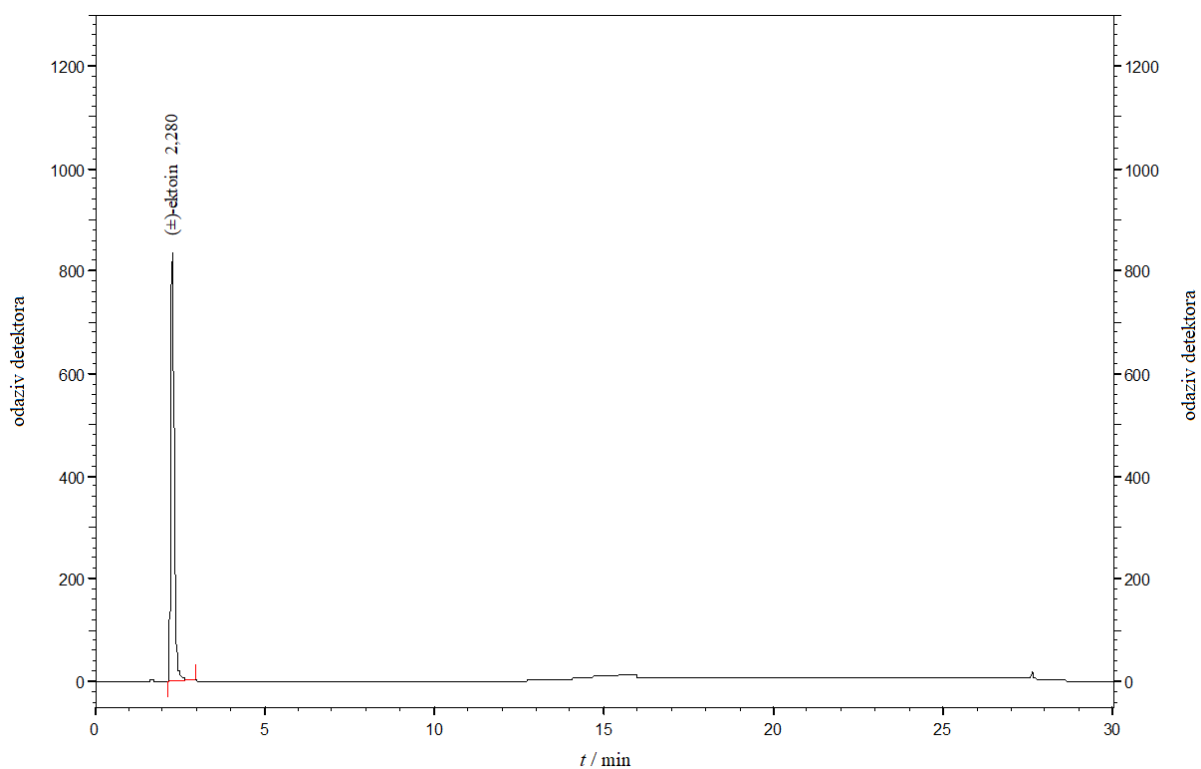
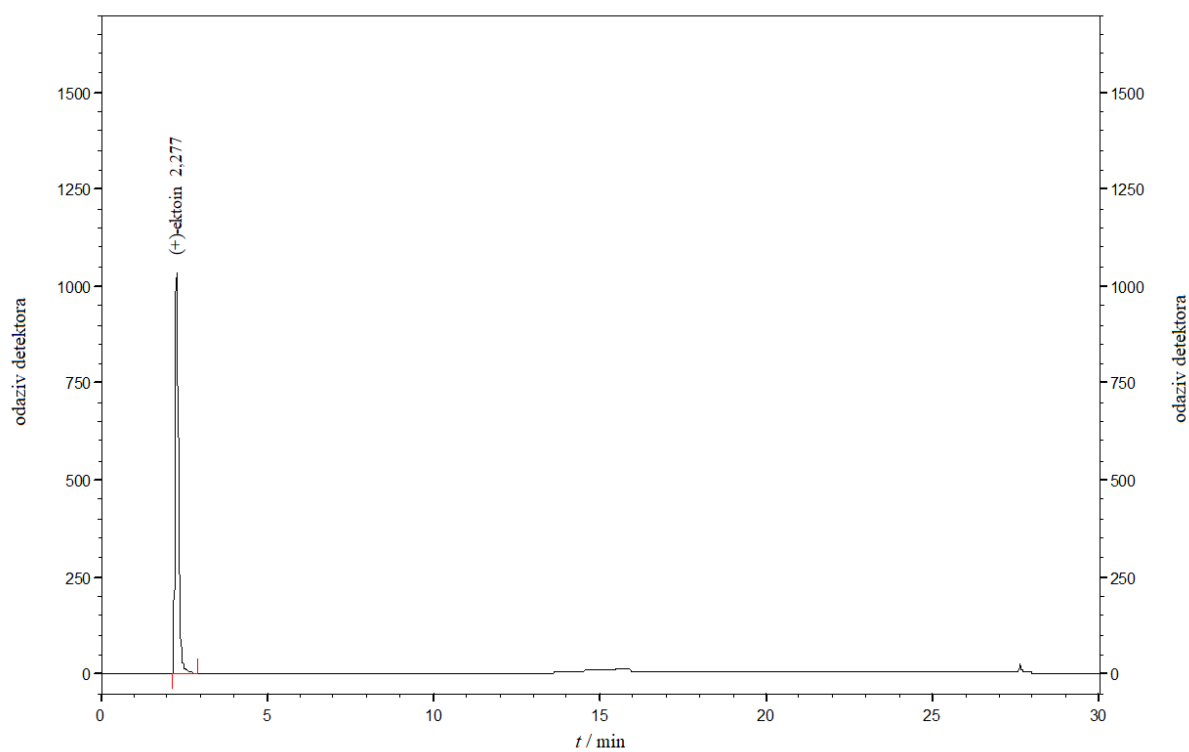


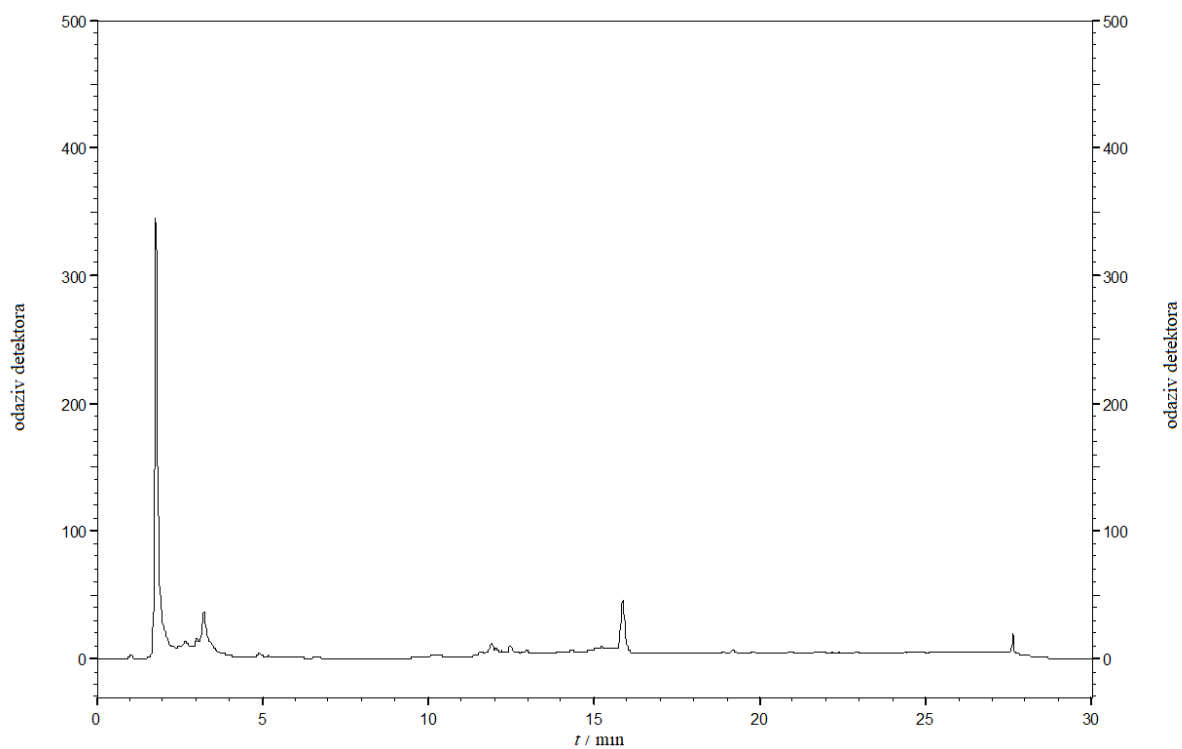
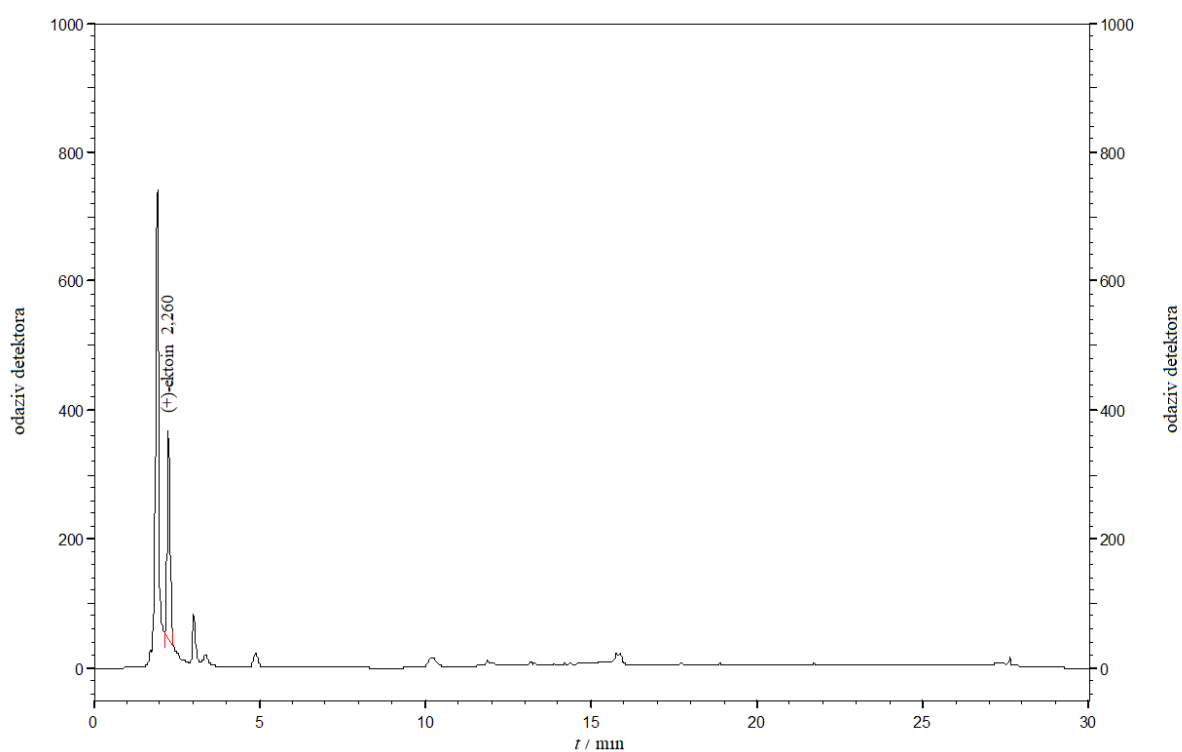
Slika D3.2.18. Kromatogram odvajanja enantiomera (±)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 34).

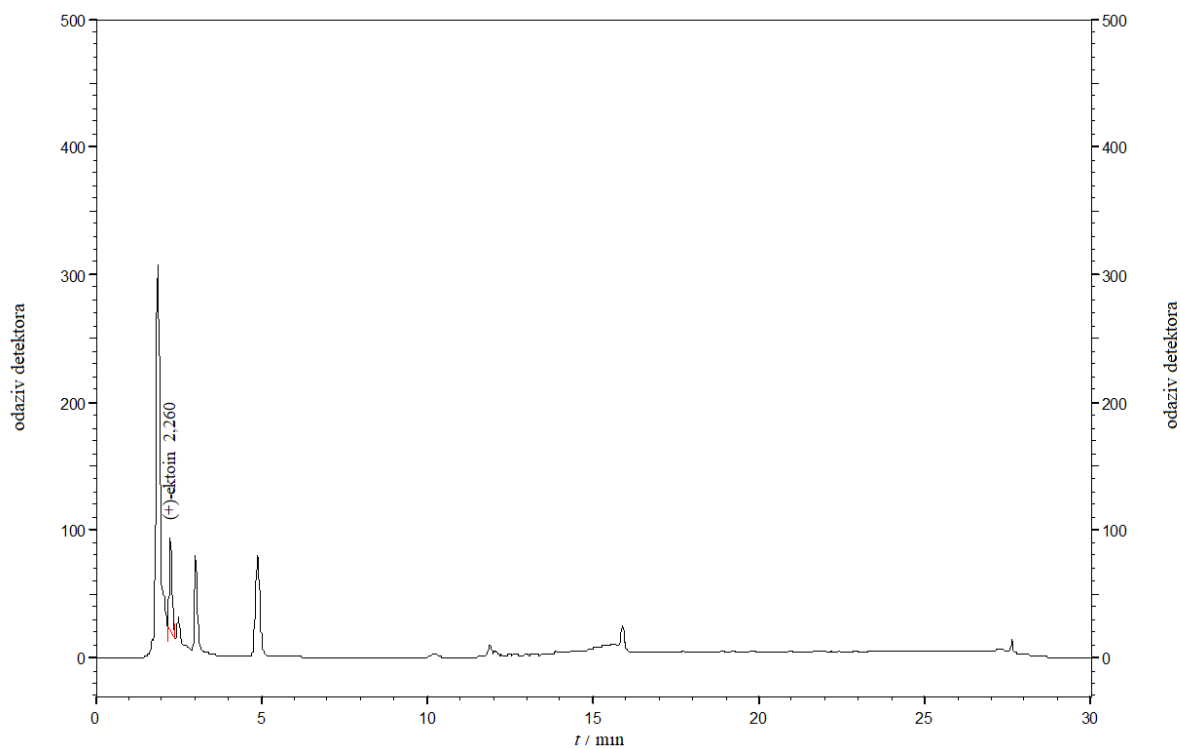


Slika D3.2.19. Kromatogram odvajanja enantiomera (\pm)-ektoina pri $\lambda = 210$ nm na Chiral T koloni (metoda 35).

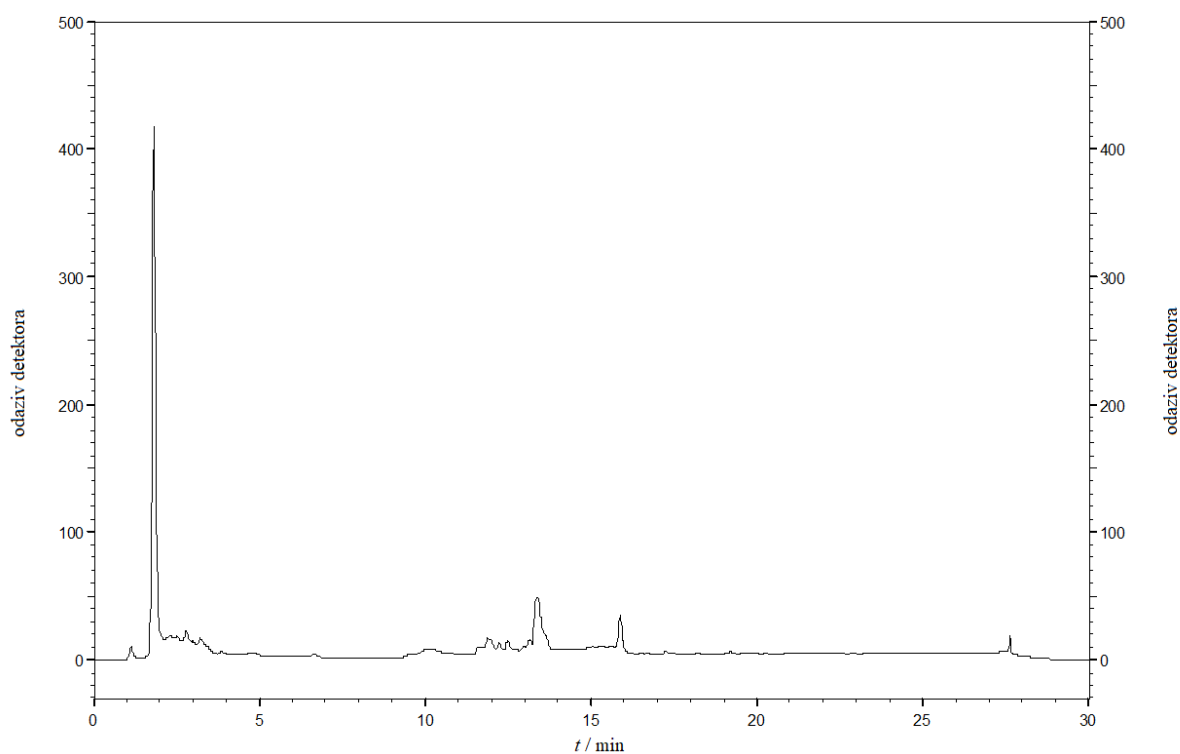
8.3.3. Ispitivanje prisutnosti (+)-ektoina u hranjivom mediju

Slika D3.3.1. Kromatogram (±)-ektoina pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.2. Kromatogram (+)-ektoina pri $\lambda = 220$ nm.

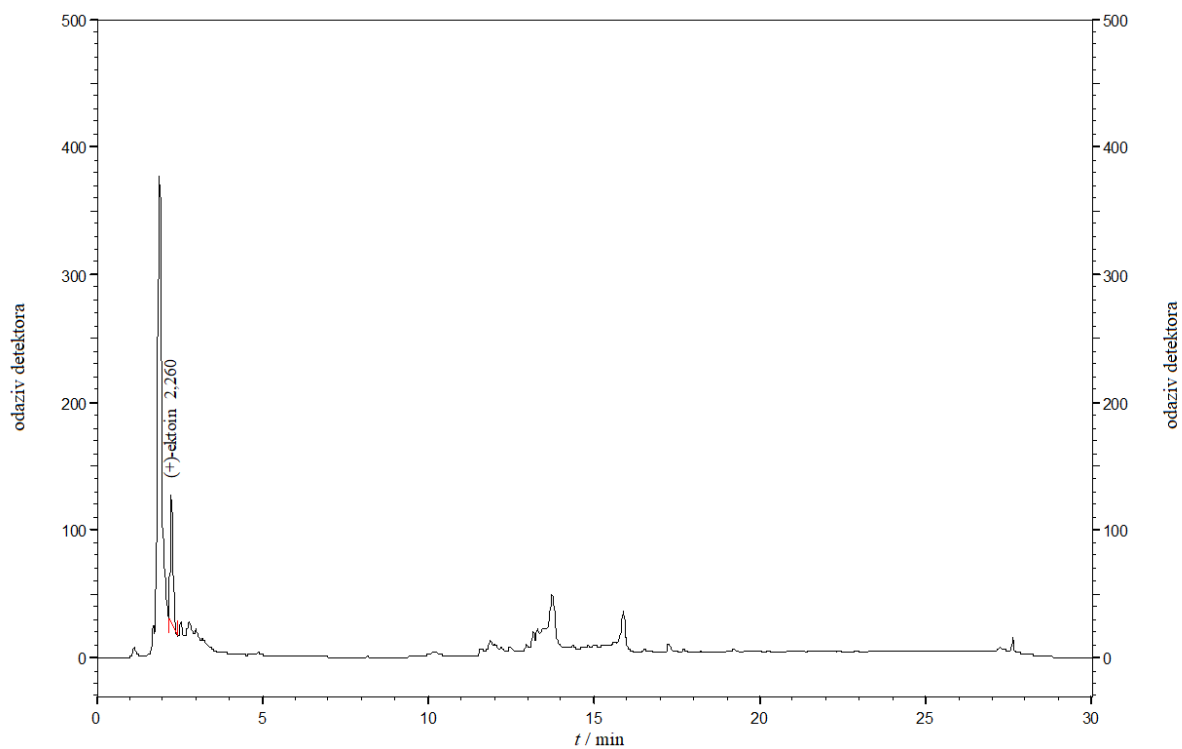
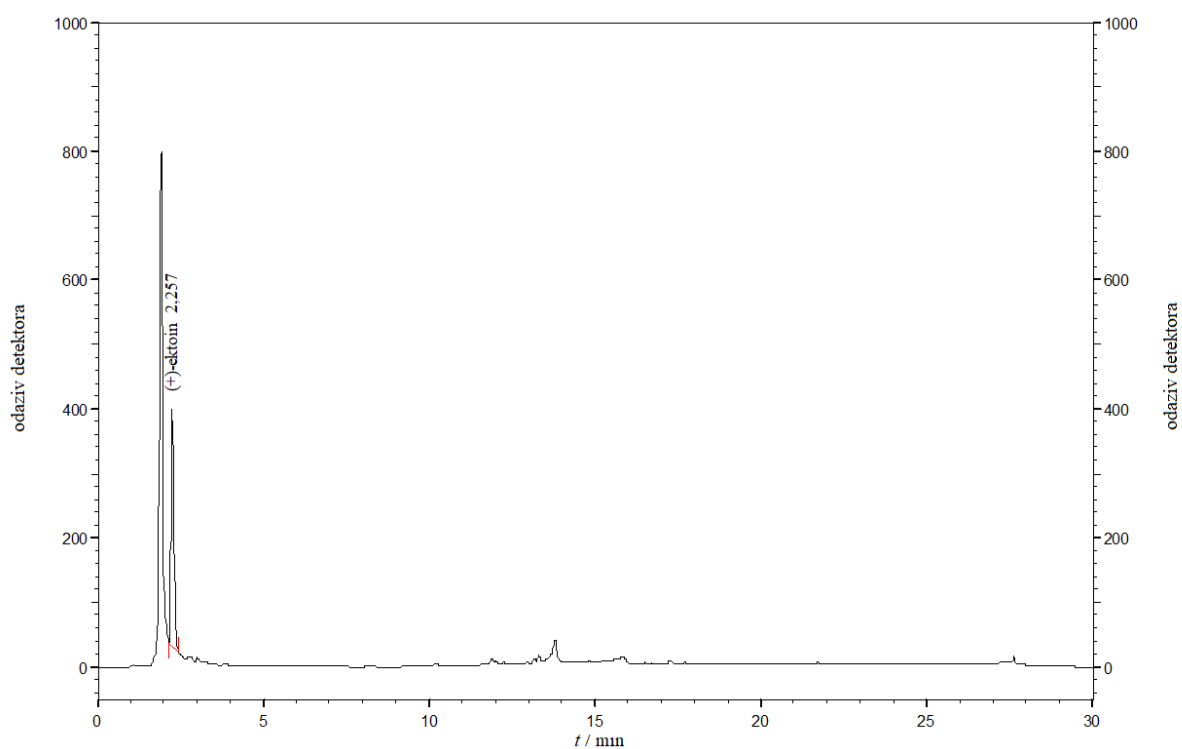
Slika D3.3.3. Kromatogram uzorka 1 pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.4. Kromatogram uzorka 2 pri $\lambda = 220$ nm.

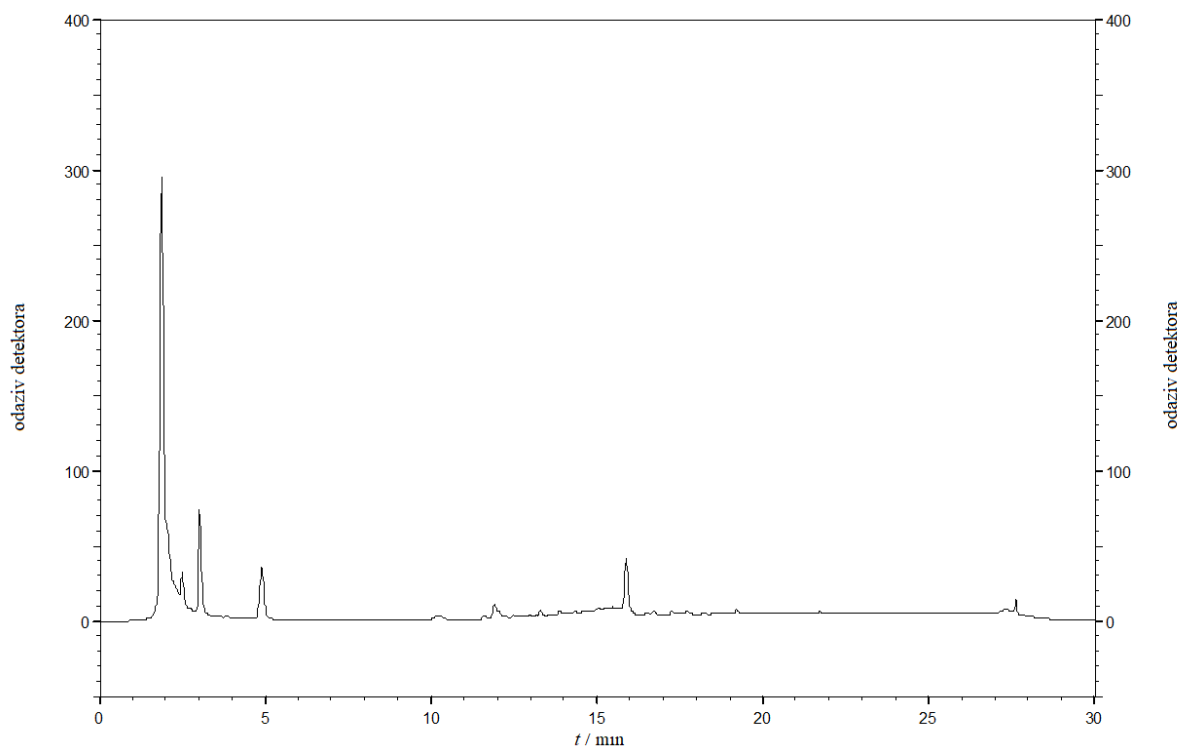


Slika D3.3.5. Kromatogram uzorka 3 pri $\lambda = 220$ nm.

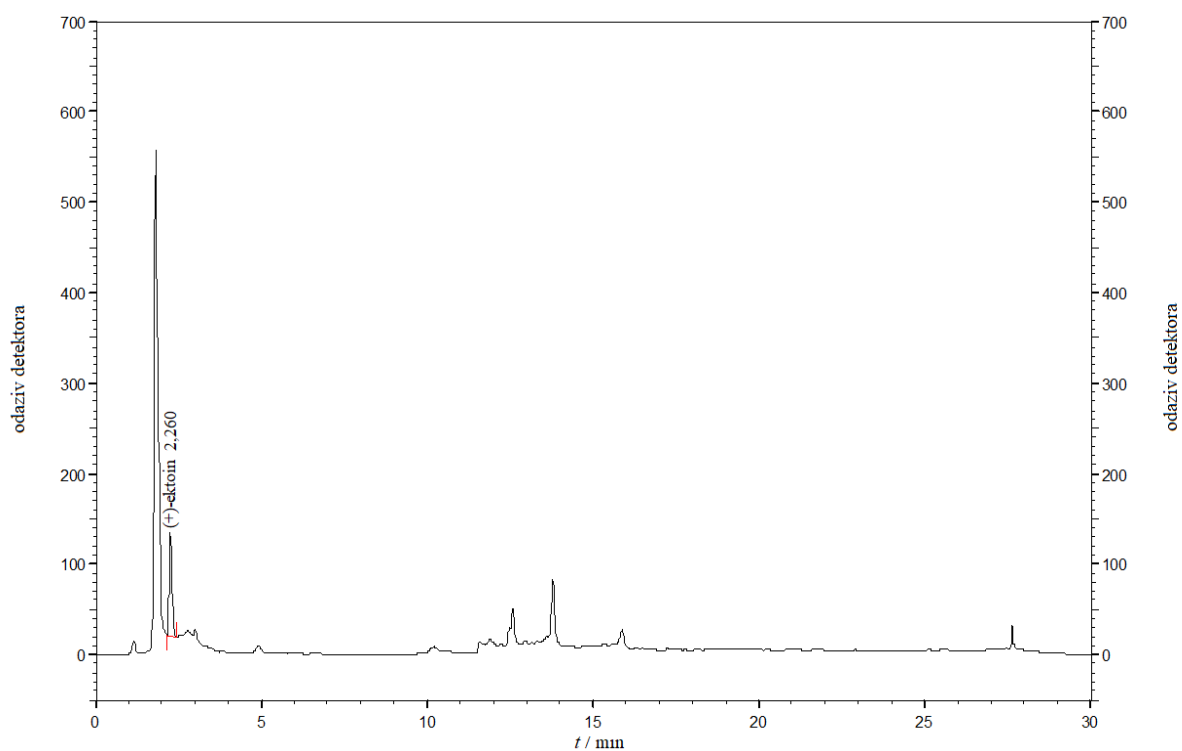


Slika D3.3.6. Kromatogram uzorka 4 pri $\lambda = 220$ nm.

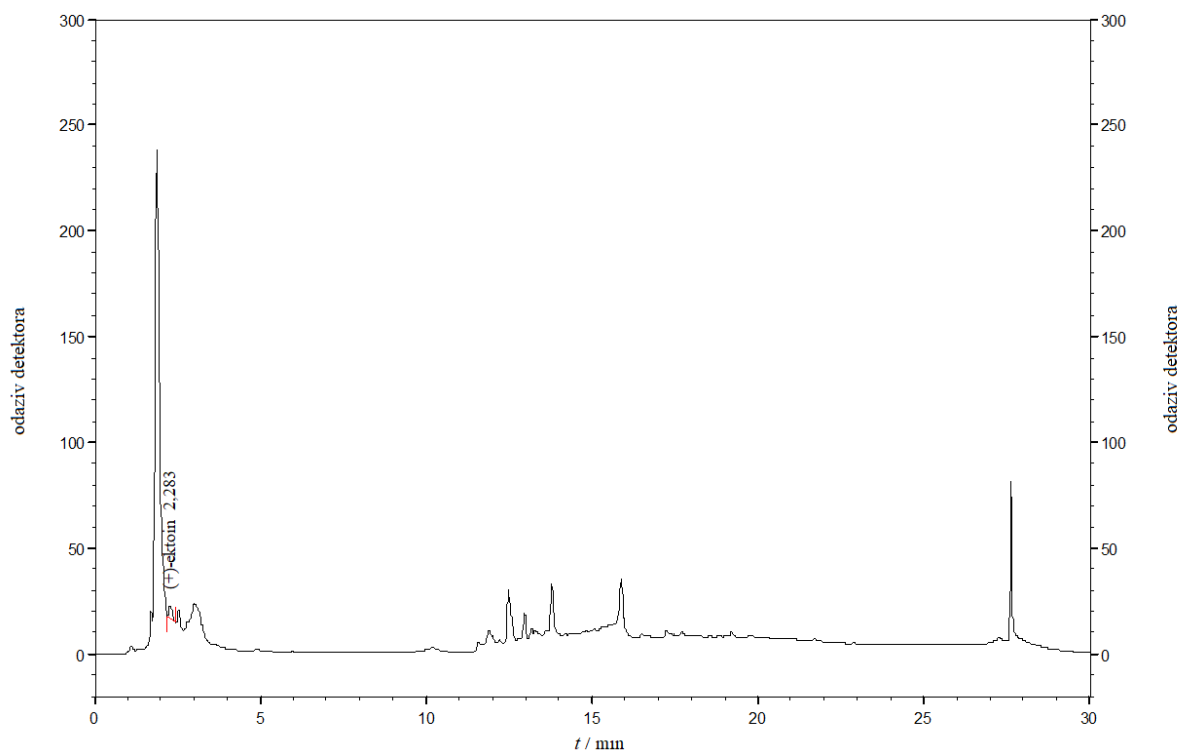
Slika D3.3.7. Kromatogram uzorka 5 pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.8. Kromatogram uzorka 6 pri $\lambda = 220$ nm.



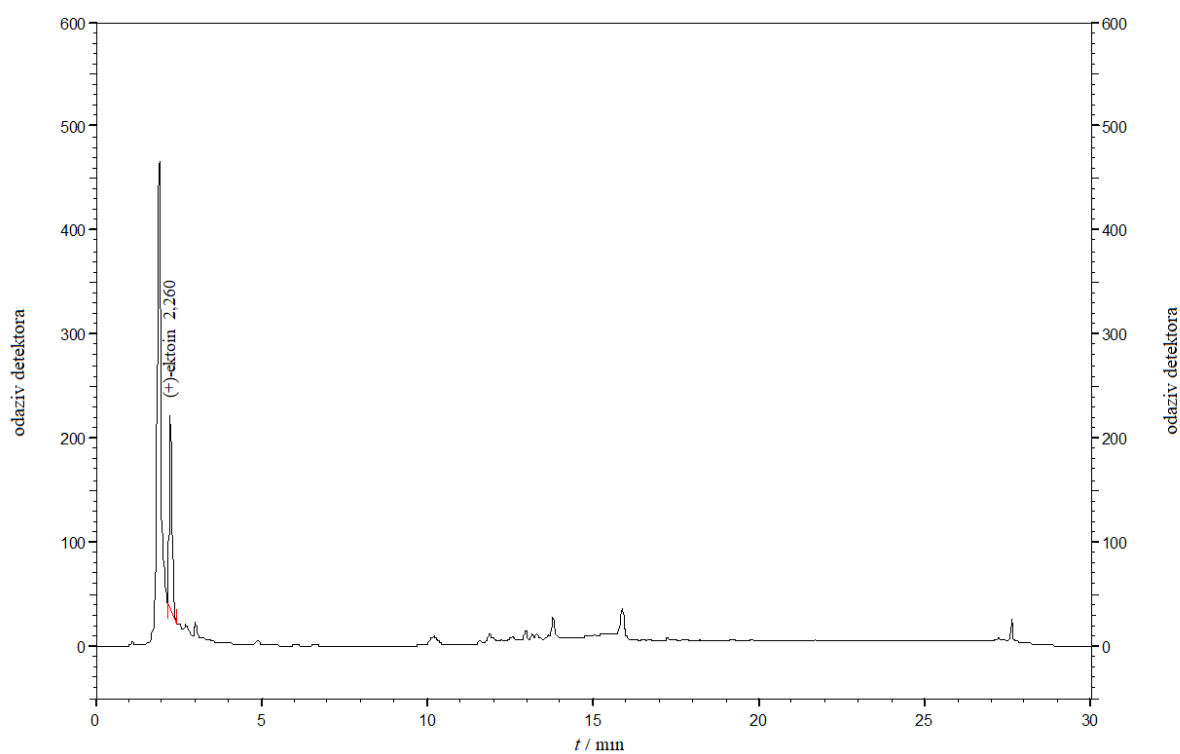
Slika D3.3.9. Kromatogram uzorka 7 pri $\lambda = 220$ nm.



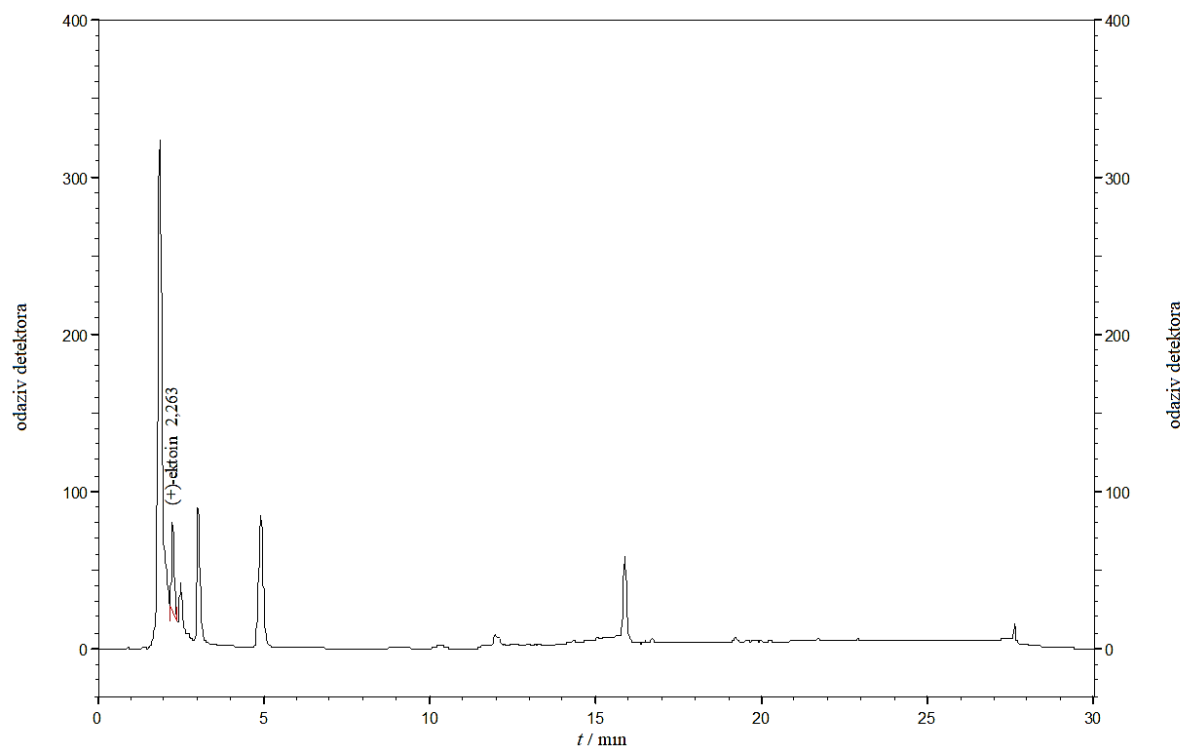
Slika D3.3.10. Kromatogram uzorka 8 pri $\lambda = 220$ nm.



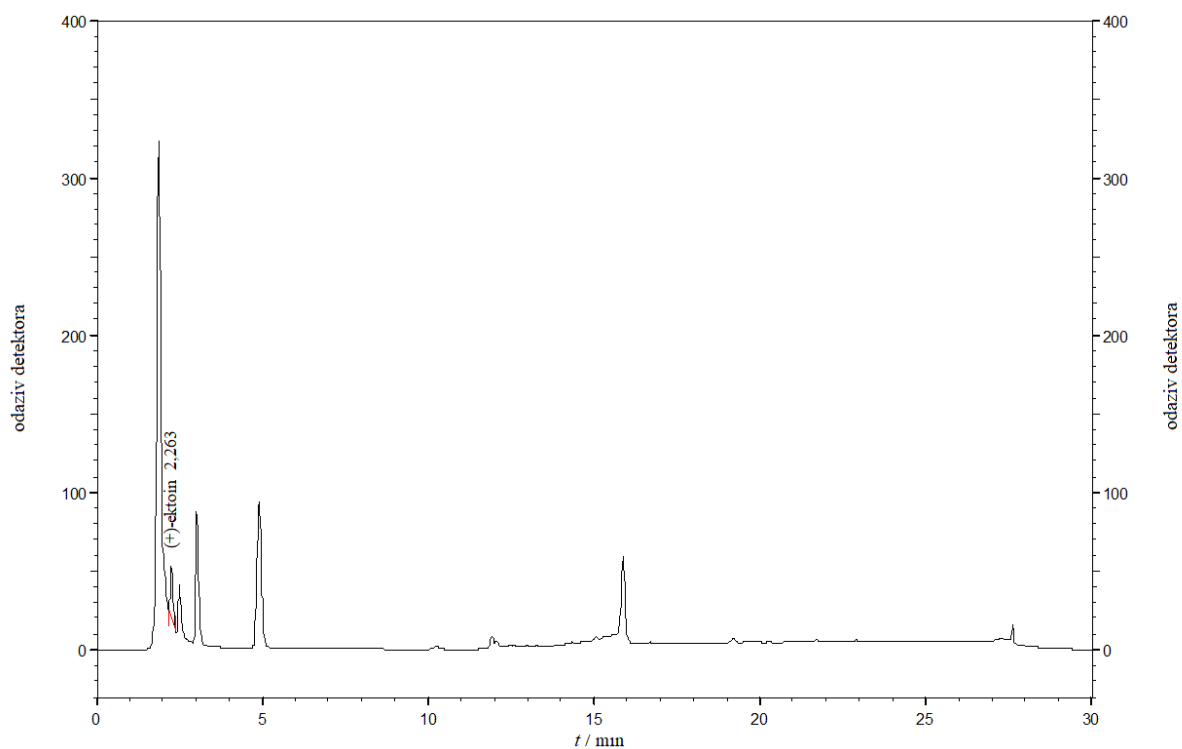
Slika D3.3.11. Kromatogram uzorka 9 pri $\lambda = 220$ nm.



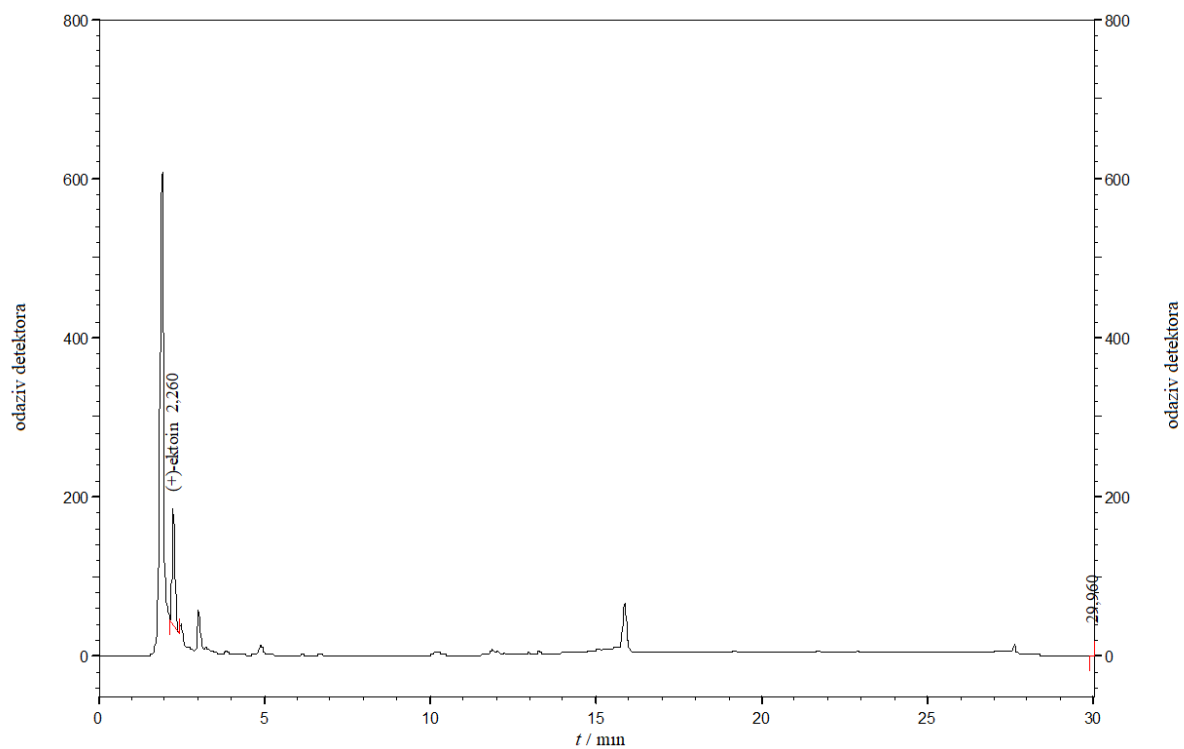
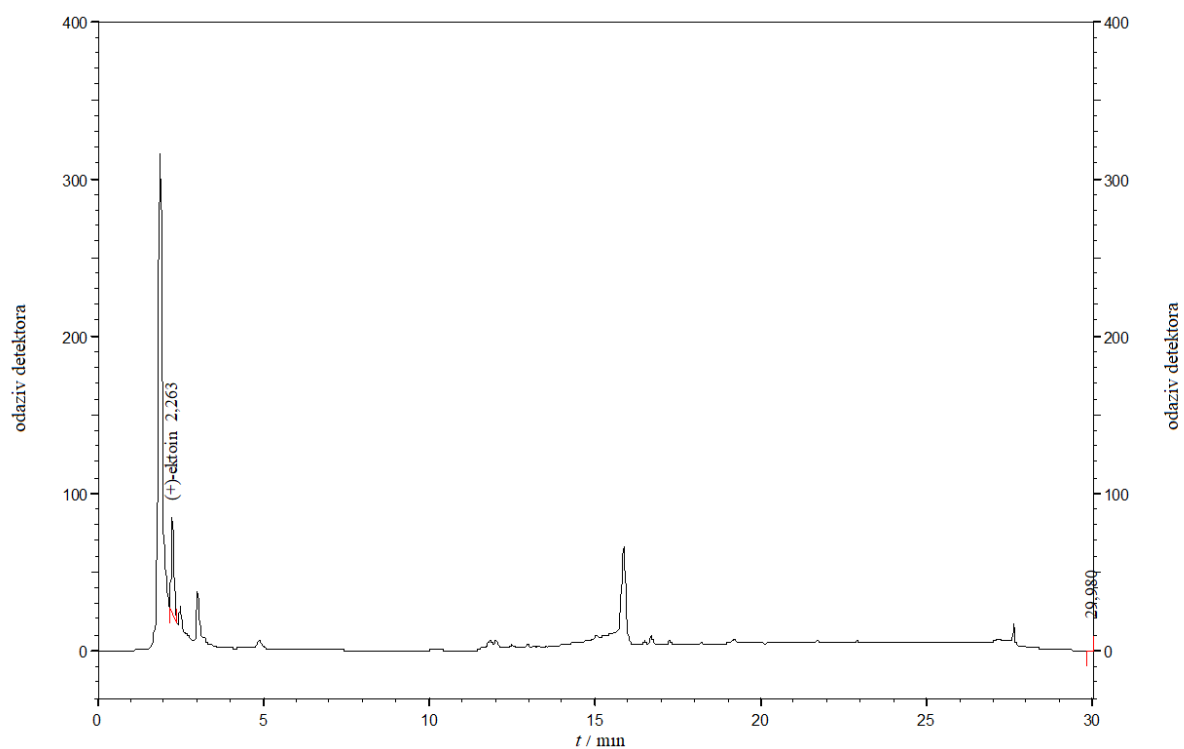
Slika D3.3.12. Kromatogram uzorka 10 pri $\lambda = 220$ nm.

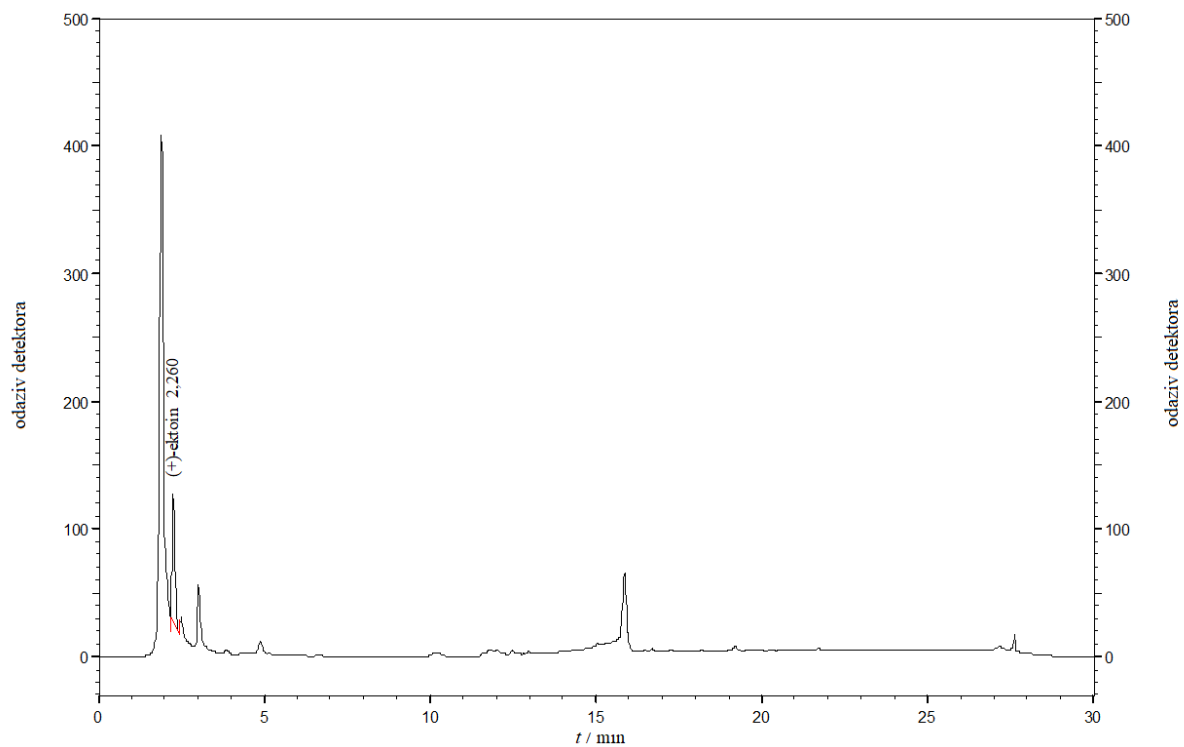


Slika D3.3.13. Kromatogram uzorka 11 pri $\lambda = 220$ nm.

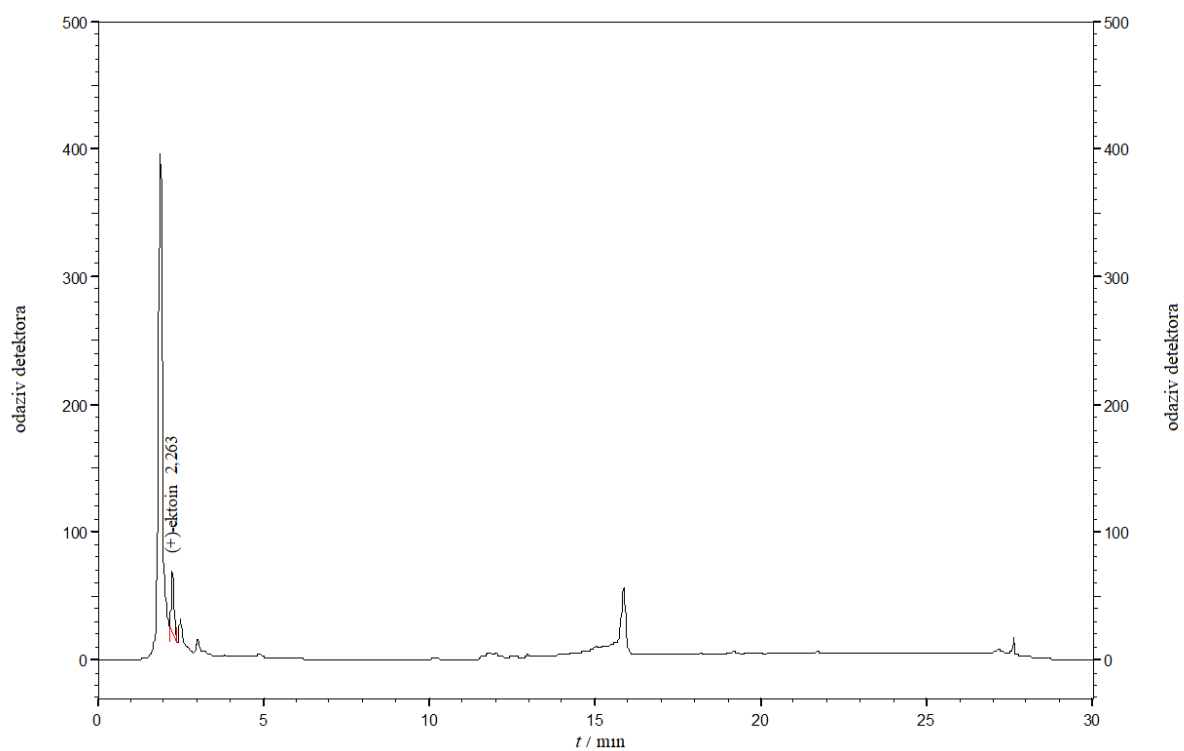


Slika D3.3.14. Kromatogram uzorka 12 pri $\lambda = 220$ nm.

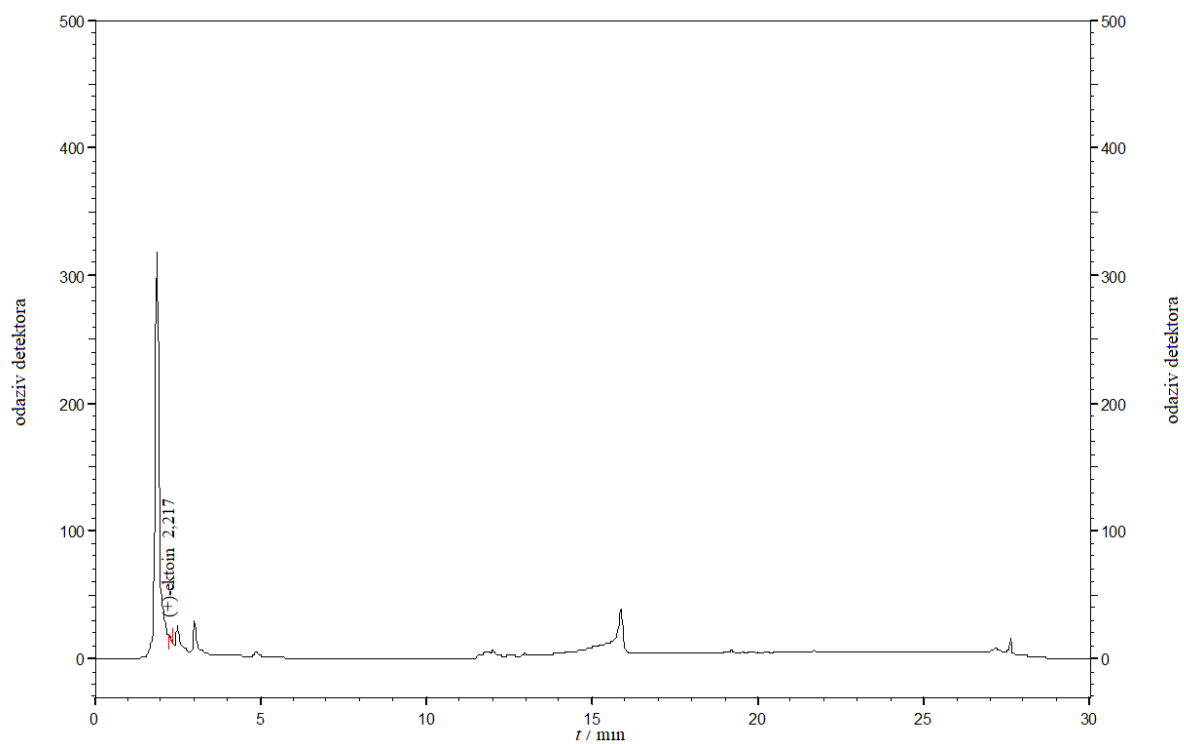
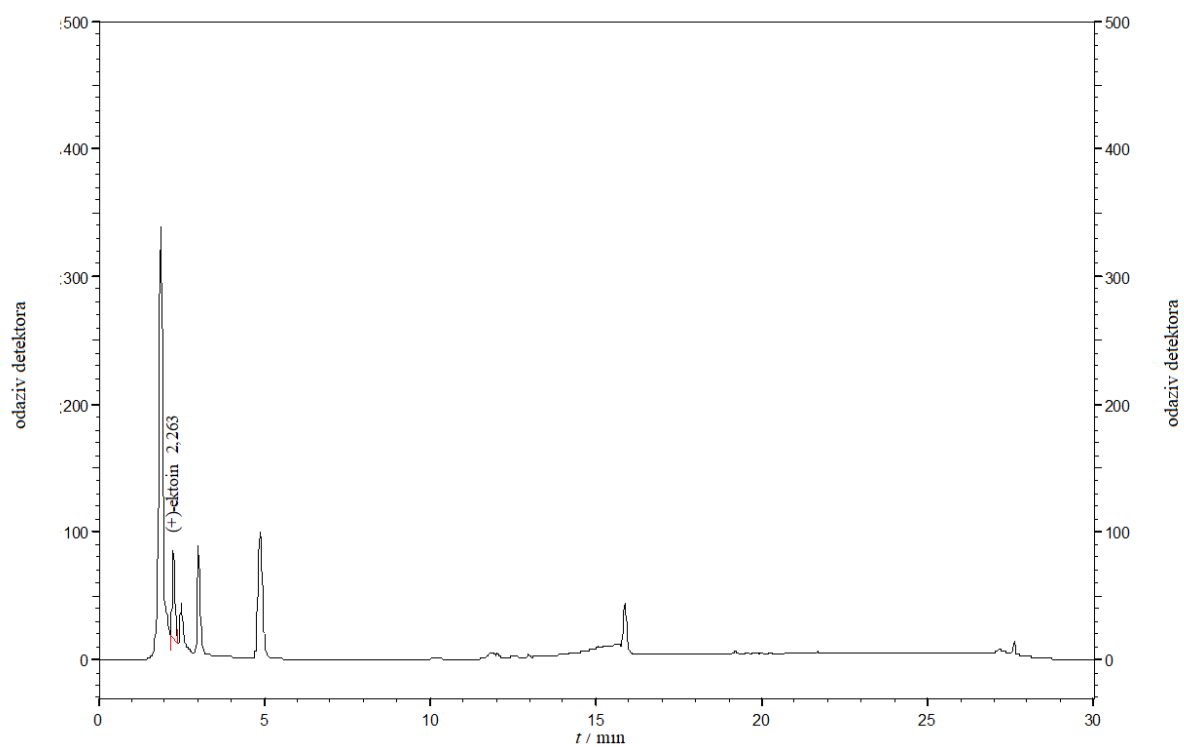
Slika D3.3.15. Kromatogram uzorka 13 pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.16. Kromatogram uzorka 14 pri $\lambda = 220$ nm.

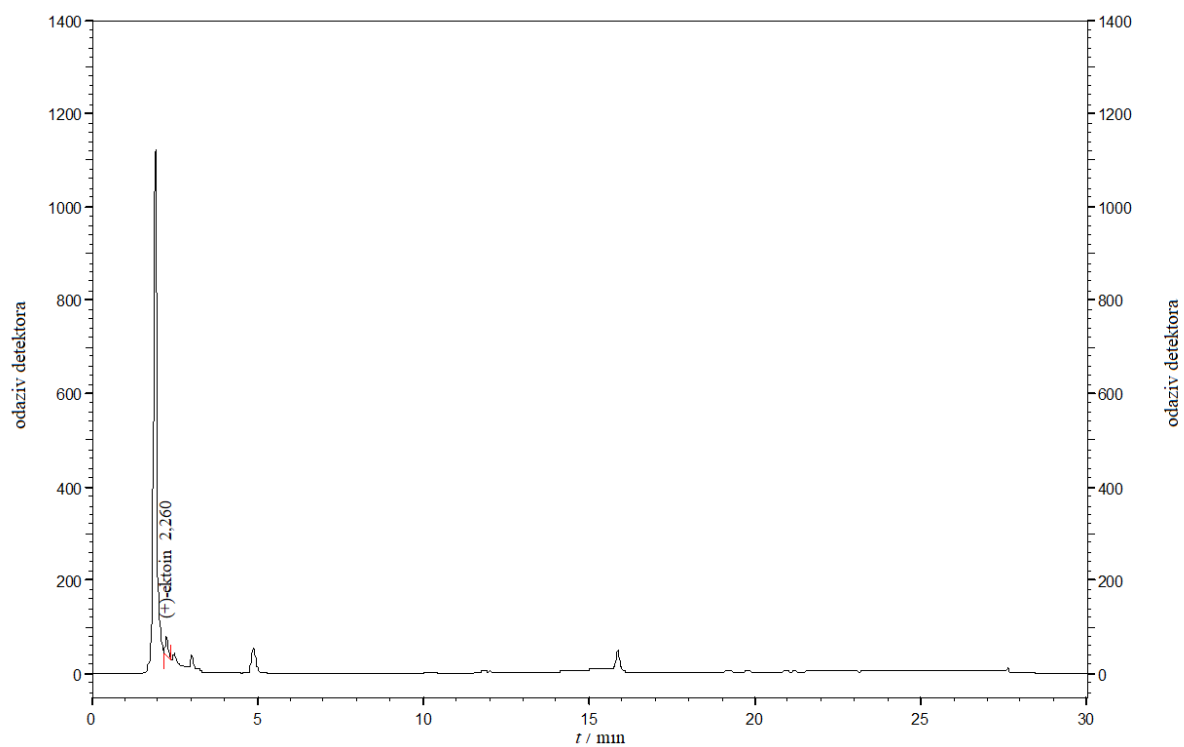
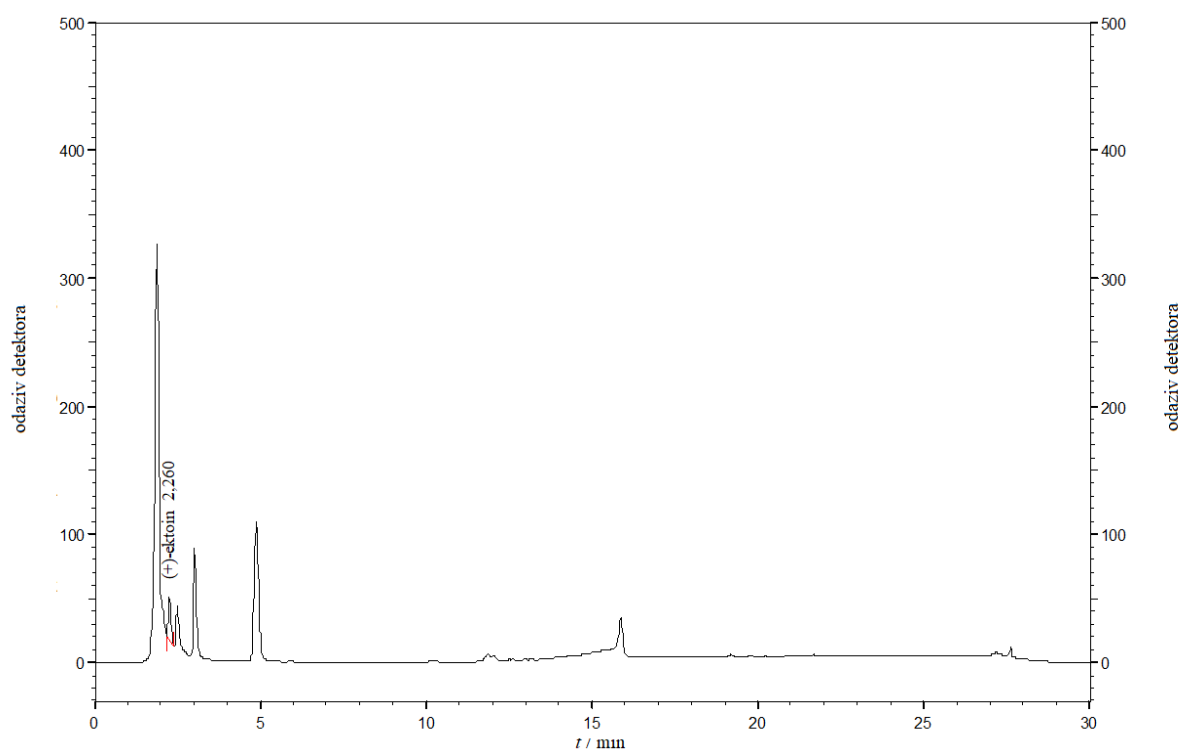


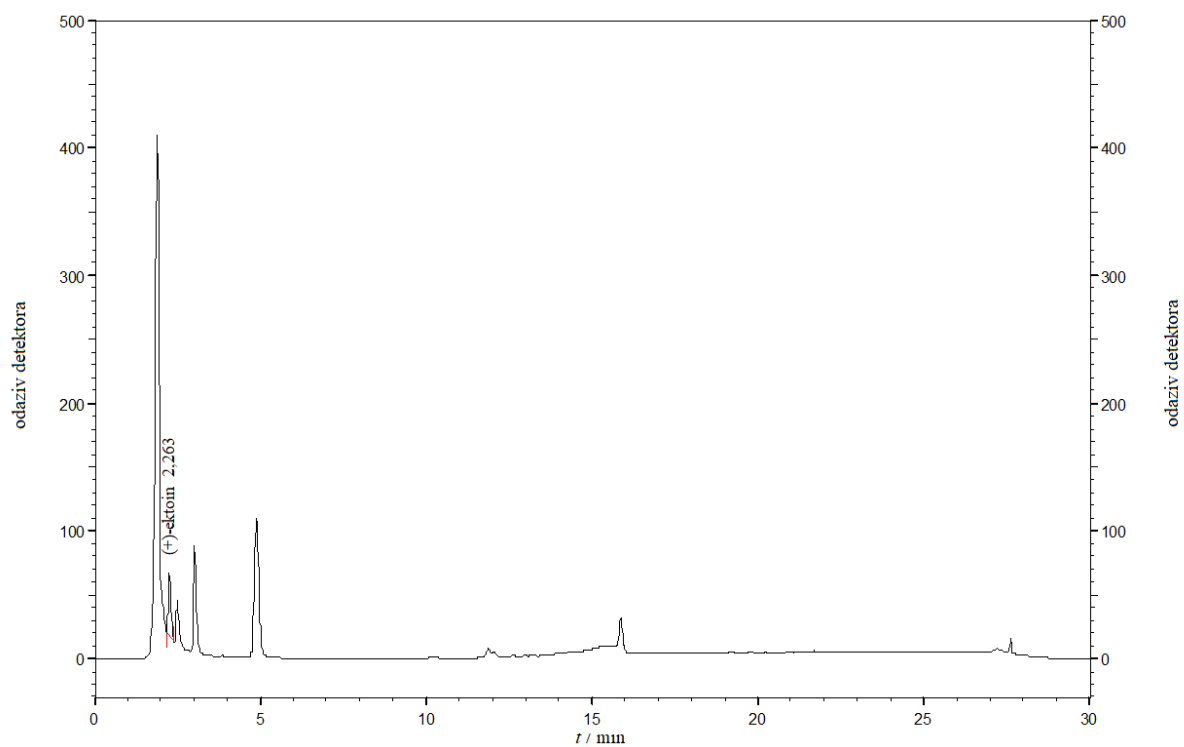
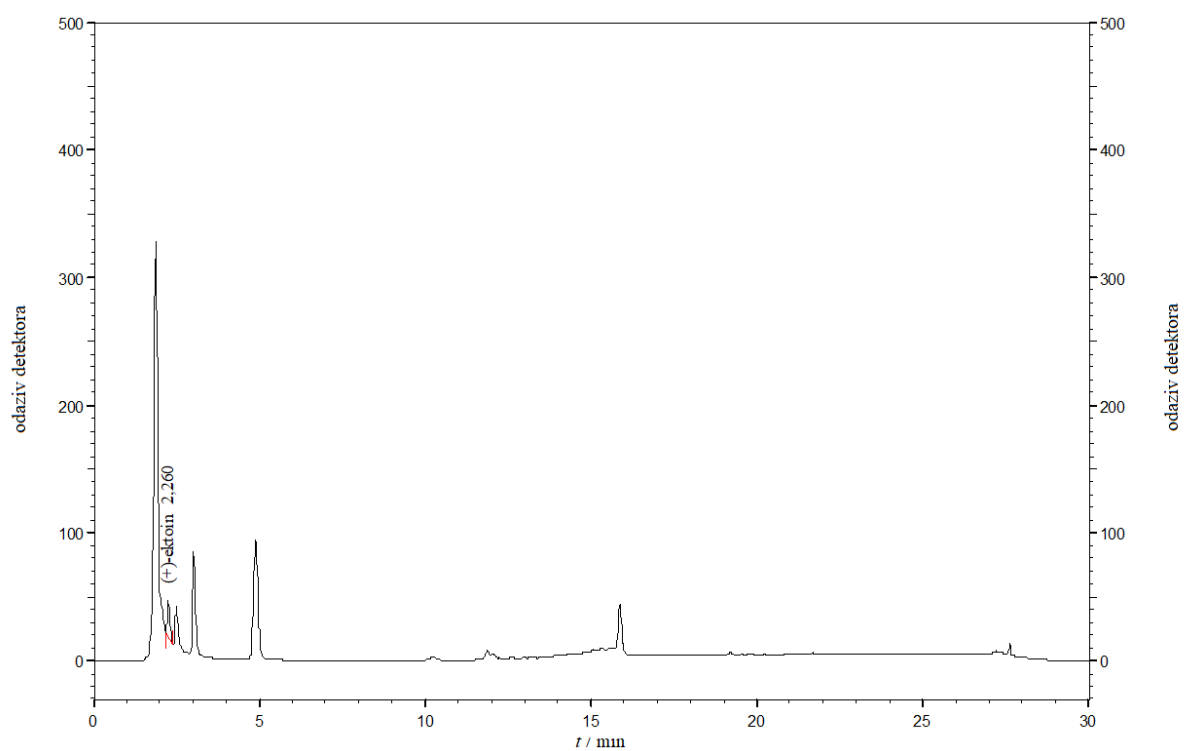
Slika D3.3.17. Kromatogram uzorka 15 pri $\lambda = 220$ nm.

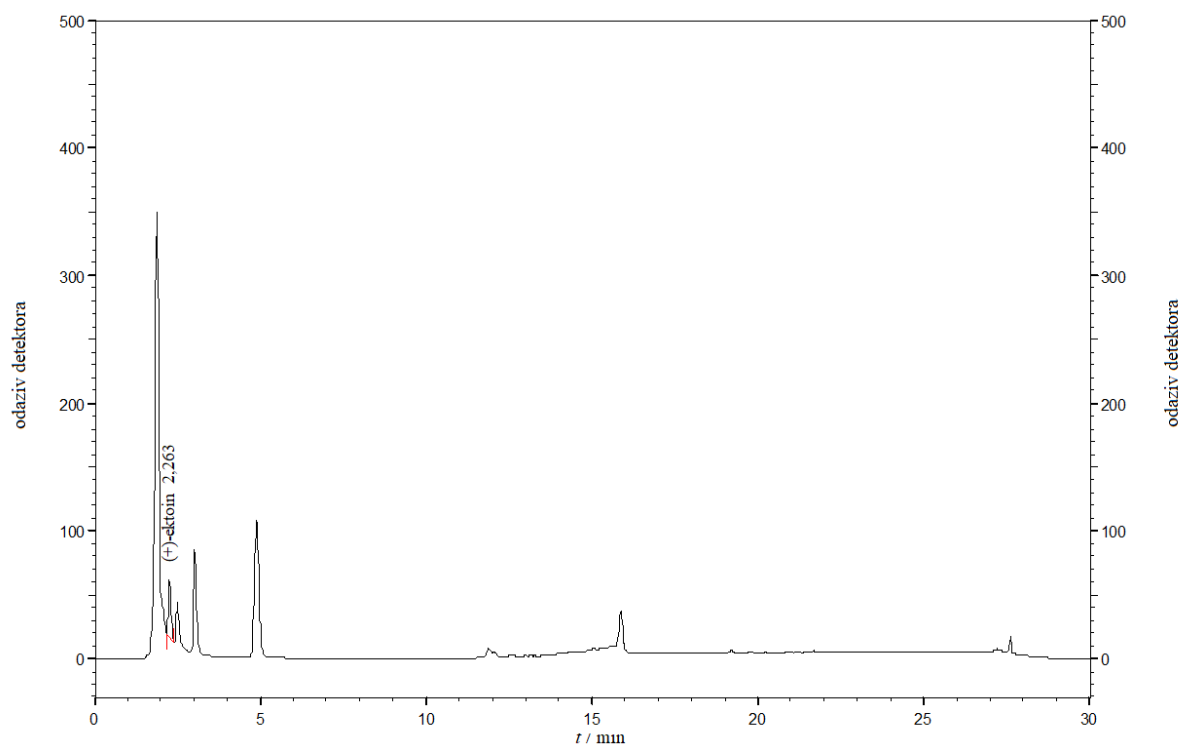


Slika D3.3.18. Kromatogram uzorka 16 pri $\lambda = 220$ nm.

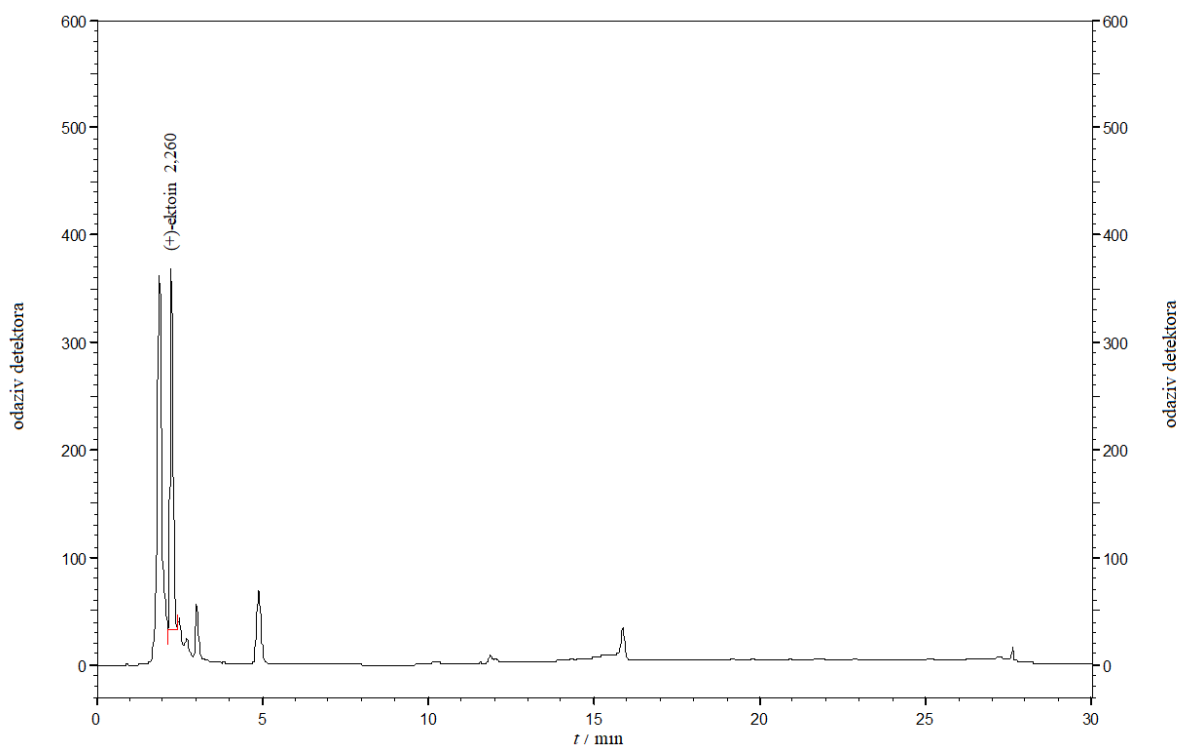
Slika D3.3.19. Kromatogram uzorka 17 pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.20. Kromatogram uzorka 18 pri $\lambda = 220$ nm.

Slika D3.3.21. Kromatogram uzorka **19** pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.22. Kromatogram uzorka **20** pri $\lambda = 220$ nm.

Slika D3.3.23. Kromatogram uzorka 21 pri $\lambda = 220$ nm.Slika D3.3.24. Kromatogram uzorka 22 pri $\lambda = 220$ nm.



Slika D3.3.25. Kromatogram uzorka 23 pri $\lambda = 220$ nm.



Slika D3.3.26. Kromatogram uzorka 24 pri $\lambda = 220$ nm.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marcela Šišić

Datum rođenja: 11. 7. 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003. – 2011. Osnovna škola Malešnica, Zagreb

2011. – 2015. XIII. gimnazija, Zagreb

2015. – 2019. Sveučilišni preddiplomski studij Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2019. – Sveučilišni diplomski studij Kemije, istraživački smjer, grane: biokemija i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016. Otvoreni dani Kemijskog odsjeka PMF-a