Analiza onečišćenja 7-etiltriptofola pomoću sustava LC-SPE/krio NMR

Janeš, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:346895

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

KARLA JANEŠ

ANALIZA ONEČIŠĆENJA 7-ETILTRIPTOFOLA POMOĆU SUSTAVA LC-SPE/krio NMR

Zagreb

2017.

KARLA JANEŠ

ANALIZA ONEČIŠĆENJA 7-ETILTRIPTOFOLA POMOĆU SUSTAVA LC-SPE/krio NMR

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistre prirodnih znanosti (kemija)

Zagreb

2017.

Ova je magistarska radnja izrađena na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim vodstvom mag. chem. Ive Habinovec

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentoru Predragu Novaku na pruženoj prilici za rad na ovom izuzetno zanimljivom istraživanju koje mi je omogućilo da iskusim realnu znanost.

Hvala neposrednoj voditeljici rada Ivi Habinovec na nebrojenim satima uloženim u rad sa mnom. Bila je izuzetno zanimljiva i zabavna suradnja čak i u trenucima kada nam ništa nije išlo na ruku. Također, zahvaljujem se Katarini Pičuljan i Tomislavu Jednačku na pomoći oko snimanja NMR spektara, te Ivani Biljan na interpretaciji istih.

Hvala mama i tata na potpori tijekom cijelog školovanja, na strpljenju, savjetima, razgovorima i bezuvjetnoj ljubavi. Volim vas više od najviše ☺.

Veliko hvala mojoj Martini. Ti si najbolje šta mi se dogodilo na faksu ☺.

SADRŽAJ

SAŽETAK vi

ABSTRACT vii

1. UVOD 2

2. LITERATURNI PREGLED 4

2.1. ETODOLAC (ETD) 4

2.2. 7-ETILTRIPTOFOL 5

2.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) 7

2.4. EKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) 8

2.5. SPEKTROSKOPIJA NMR (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) 9

2.6. VEZANI SUSTAV LC-SPE/krio NMR 12

3. MATERIJALI I METODE 15

3.1. HPLC ANALIZA 15

3.2. SPE ANALIZA 16

3.3. SPEKTROSKOPIJA NMR 16

4. REZULTATI I RASPRAVA 20

4.1. RAZVOJ METODE HPLC ZA ODJELJIVANJE ONEČIŠĆENJA U UZORKU 7-ETILTRIPTOFOLA 20

4.2. ANALIZA NEPOZNATIH ONEČIŠĆENJA TEHNIKOM LC-SPE/krio NMR 26

5. ZAKLJUČAK 43

6. LITERATURNI IZVORI 45

7. PRILOG 47

ŽIVOTOPIS

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet Diplomski rad

Kemijski odsjek

ANALIZA ONEČIŠĆENJA 7-ETILTRIPTOFOLA POMOĆU SUSTAVA LC-SPE/krio NMR

KARLA JANEŠ

Horvatovac 102A, 10000 Zagreb

Polazna sirovina za sintezu etodolaca, nesteroidnog protuupalnog lijeka, je 7-etiltriptofol, 2-(7-etil-1*H*-indol-3-il)etanol. Ovisno o putu sinteze 7-etiltriptofola komercijalno dostupna sirovina može sadržavati velik broj onečišćenja koja uzrokuju nastajanje koprodukata prilikom sinteze etodolaca, a time otežavaju i pročišćavanje konačnog produkta.

Kako bi se razvila optimalna metoda pročišćavanja etodolaca, potrebno je poznavati strukture onečišćenja polazne sirovine 7-etiltriptofola. U ovom istraživanju korištena je metodologija LC-SPE/krio NMR za određivanje onečišćenja u uzorku 7-etiltriptofola. Najbolje kromatografsko odjeljivanje sastojaka postignuto je na kolonama Waters XBridge Phenyl i C18 (150 mm x 4,6 mm; 3,5 μm) uz kombinaciju izokratnog i gradijentnog eluiranja. Onečišćenja su ukoncentrirana poslijekolonskim višestrukim skladištenjem (engl. *multitrapping*) na HySphere Resin GP SPE-kolonama. Snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR (^{1}H, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC) i MS spektri na temelju kojih su određene strukture onečišćenja.

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, HR-10000 Zagreb

Ključne riječi: 7-etiltriptofol, onečišćenja, LC-SPE/krio NMR

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Predrag Novak

Doc. dr. sc. Ivana Biljan

Izv. prof. dr. sc. Mirta Rubčić

Zamjena: Doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Rad prihvaćen: 2. veljače 2017.

ABSTRACT

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Master Thesis

IMPURITY ANALYSIS OF 7-ETHYLTRYPTOPHOL USING LC-SPE/cryo NMR

KARLA JANEŠ

7-Ethyltryptophol, 2(7-ethyl-1*H*-indol-3-yl)ethanol, is a key starting material in the synthesis of etodolac, a non-steroidal anti-inflammatory drug. Depending on the synthetic pathway for 7-ethyltryptophol, commercially available material comprises many different impurities which can cause formation of coproducts in the synthesis of etodolac thus complicating the purification of the final product. Therefore, to develop an optimal purification procedure of etodolac, it is important to elucidate the structures of impurities in 7-ethyltryptophol.

In this study LC-SPE/cryo NMR methodology was used to identify impurities in 7-ethyltryptophol. The best chromatographic separation was achieved with Waters XBridge Phenyl and C18 columns (150 mm x 4.6 mm; 3.5 μm) using a combination of gradient and isocratic elution. Mixture components were trapped on HySphere Resin GP cartridges in the SPE multitrapping mode. One and two dimensional NMR (^{1}H, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC) and MS spectra were recorded and analysed which enabled structure determination of the present impurities.

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102a, HR-10000 Zagreb

Keywords: 7-ethyltryptophol, impurities, LC-SPE/cryo NMR

Supervisor: Dr. Predrag Novak, Full Professor

Reviewers: Dr. Predrag Novak, Full Professor

Dr. Ivana Biljan, Asst. Prof

Dr. Mirta Rubčić, Assoc. Prof

Replacement: Dr. Tomislav Jednačak, Asst. Prof

Thesis accepted: 2nd February, 2017

UVOD

1. UVOD

Prilikom razvoja lijeka regulatorna tijela zahtijevaju identifikaciju svih onečišćenja prisutnih u udjelu većem od 0,1%. Selektivne, specifične i osjetljive metode analize, koje su po mogućnosti nedestruktivne, od velike su važnosti prilikom razvoja lijeka.[1] Metodologija LC-SPE-NMR predstavlja snažan i sofisticiran spregnuti analitički sustav koji u posljednjih dvadeset godina sve više pronalazi svoju primjenu u analizi farmaceutika, metabolita, prirodnih spojeva, razgradnih produkata te onečišćenja.[2,3] Sprega tekućinske kromatografije (engl. *Liquid Chromatography*, LC) s ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) omogućuje učinkovito odjeljivanje komponenata smjese na kromatografskoj koloni, zatim izolaciju i ukoncentriravanje svakog pojedinog analita na SPE-koloni (engl. SPE-*cartridge*), nakon čega slijedi identifikacija i određivanje strukture izoliranog spoja spektroskopijom NMR.

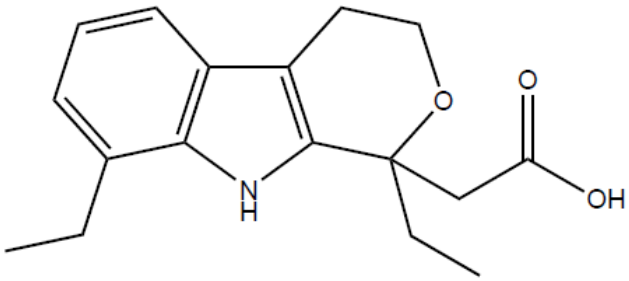
Cilj ovog diplomskog rada bio je identifikacija i strukturna karakterizacija onečišćenja prisutnih u uzorku 7-etiltriptofola, polaznog spoja u sintezi metilnog estera etodolaca, pomoću sustava LC-SPE/krio NMR. Stoga će se optimirati eksperimentalni uvjeti za postizanje najboljeg odjeljivanja komponenata smjese tekućinskom kromatografijom (različite kolone, pokretne faze i sl.), kao i parametri ključni za učinkovito ukoncentriravanje i zadržavanje analita na SPE-koloni (vrsta nepokretne faze na SPE-koloni, volumen injektiranog uzorka, broj injektiranja i dodatni protok pokretne faze). Očekuje se da će konačni rezultati provedenog istraživanja dati potpuni uvid u strukture onečišćenja na brži i učinkovitiji način od standardnih metoda *off-line* koristeći pritom znatno manje količine uzorka i otapala.

LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

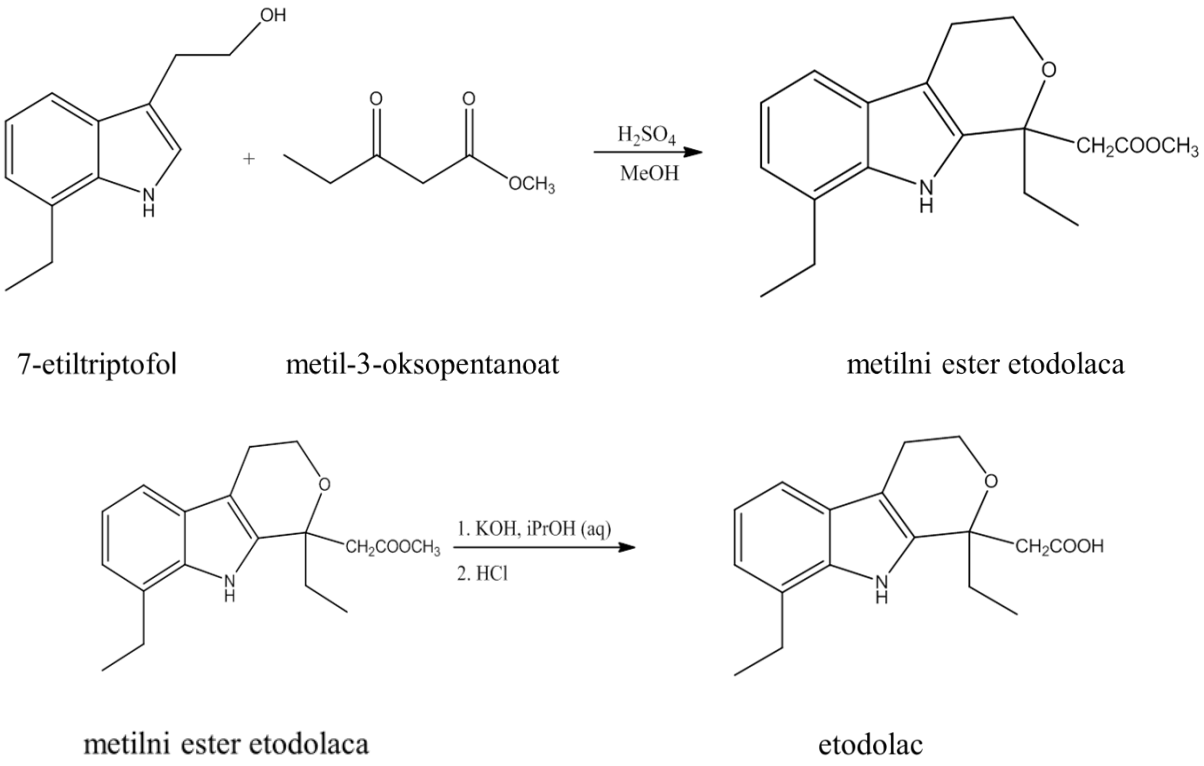
2.1. ETODOLAC (ETD)

Etodolac, 1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano-[3,4,-*b*]indol-1-octena kiselina, je selektivni ciklooksigenazni inhibitor koji pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova. Koristi se kod povišene tjelesne temperature i upala, ali i za ublažavanje bolova i upale kod osteoartritisa i reumatskog artritisa.[4]



Slika 2.1. Kemijska struktura etodolaca.[4]

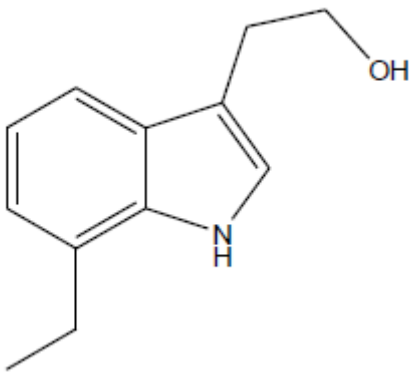
Etodolac (Slika 2.1.) blokira enzime (ciklooksigenaze, Cox) koji proizvode prostaglandine, odgovorne za bol i povišenu tjelesnu temperaturu prilikom upale.[5] Točnije, on djeluje kao selektivni inhibitor Cox-2 enzima koji katalizira biosintezu prostaglandina, dok druga izoforma ciklooksigenaze, Cox-1, ostaje neaktivna tijekom upalnog procesa.[6] Nedavne studije pokazale su učinkovitost etodolaca u poboljšanju funkcije stražnjih udova kod pasa koji boluju od displazije kukova ili kroničnog osteoartritisa.[7] Put sinteze etodolaca prikazan je na Shemi 1.



Shema 1. Put sinteze etodolaca.

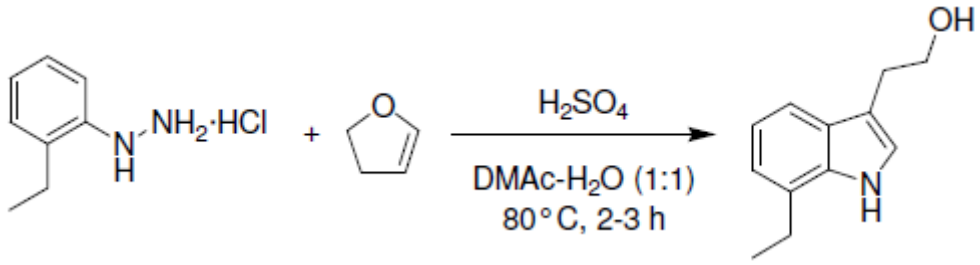
2.2. 7-ETILTRIPTOFOL

Triptofoli su derivati 2-(1*H*-indol-3-il) etanola, klase indola koji sadrže C-3 hidroksietilni lanac. Triptofoli i njihovi derivati se uglavnom izoliraju iz prirodnih izvora, a neki derivati pokazuju i biološku aktivnost. Nastajanje triptofola metabolizmom triptofana uključeno je u patofiziološki mehanizam koji uzrokuje bolest spavanja prilikom infekcije tripanosomom. 7-etiltriptofol ili 2-(7-etil-1*H*-indol-3-il)etanol je polazni spoj za sintezu etodolaca (Slika 2.2.1.).[8]



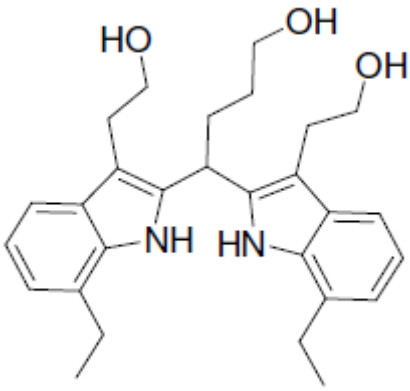
Slika 2.2.1. Strukturna formula 7-etiltriptofola.[8]

Poznate su dvije metode priprave 7-etiltriptofola. Jedna uključuje reakciju 2-etilanilina i 2,2,2-trikloroetan-1,1-diola koji daje odgovarajući aldehid koji se dalje tretira s hidroksilamin hidrokloridom i nastaje 7-etilisatin. Nastali 7-etilisatin razgrađuje se do konačnog produkta, 7-etiltriptofola, u tri koraka preko 7-etil-3-indolilglioksilata. Druga metoda, Fischerova indolna sinteza, uključuje reakciju 2-etilfenilhidrazin hidroklorida i 4-hidroksibenzaldehida ili 2,3-dihidrofurana. Reakcija se izvodi u vodi pomiješanoj s 1,4-dioksanom, tetrahidrofuranom (THF), dimetoksietanom ili etilen glikol monometilnim eterom.[6] Takva priprava 7-etiltriptofola nije reproducibilna, nizak je prinos reakcije (＜50%) i nastaju različiti nusprodukti koje je teško izolirati. Kako bi se poboljšalo iskorištenje, kao katalizator koristi se H_2SO_4 koji se pokazao kao daleko bolji kiseli katalizator od octene kiseline (CH_3COOH), *p*-toluensulfonske kiseline (PTSA) i poli-*p*-toluensulfonske kiseline (PPTSA).[7]



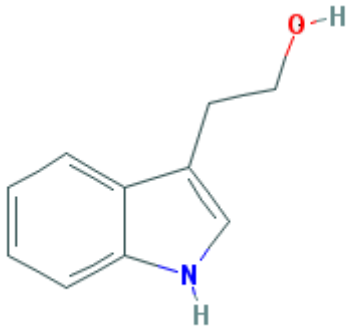
Slika 2.2.2. Reaktanti 1-(2-etilfenil)hidrazin hidroklorid i dihidrofuran (DHF) u reakciji priprave 7-etiltriptofola uz H_2SO_4 kao katalizator i *N*,*N*-dimetilacetamid (DMAc)-H_2O (1:1) kao otapalo.[7]

Tijekom priprave 7-etiltriptofola u reakciji prikazanoj na Slici 2.2.2. iskorištenje reakcije bilo je 69%. Prilikom priprave 7-etiltriptofola nastaju nečistoće. Jedna od njih je izolirana kolonskom kromatografijom i identificirana metodom LC-MS kao 4,4-bis(7-etil-3-(2-hidroksietil)-1*H*-indol-2-il)butan-1-ol (Slika 2.2.3.).[7] 7-etiltriptofol i dihidrofuran netopljivi su u vodi i tvorili su organski sloj dajući triol kao nusprodukt.



Slika 2.2.3. Strukturna formula nečistoće 4,4-bis(7-etil-3-(2-hidroksietil)-1*H*-indol-2-il) butan-1-ol.[7]

Izolirana je i identificirana još jedna nečistoća prisutna uz 7-etiltriptofol, a to je 3-(2-hidroksietil)indol, koji se još naziva triptofol (EDL-1) i prikazan je na Slici 2.2.4.



Slika 2.2.4. Strukturna formula triptofola (EDL-1).[9]

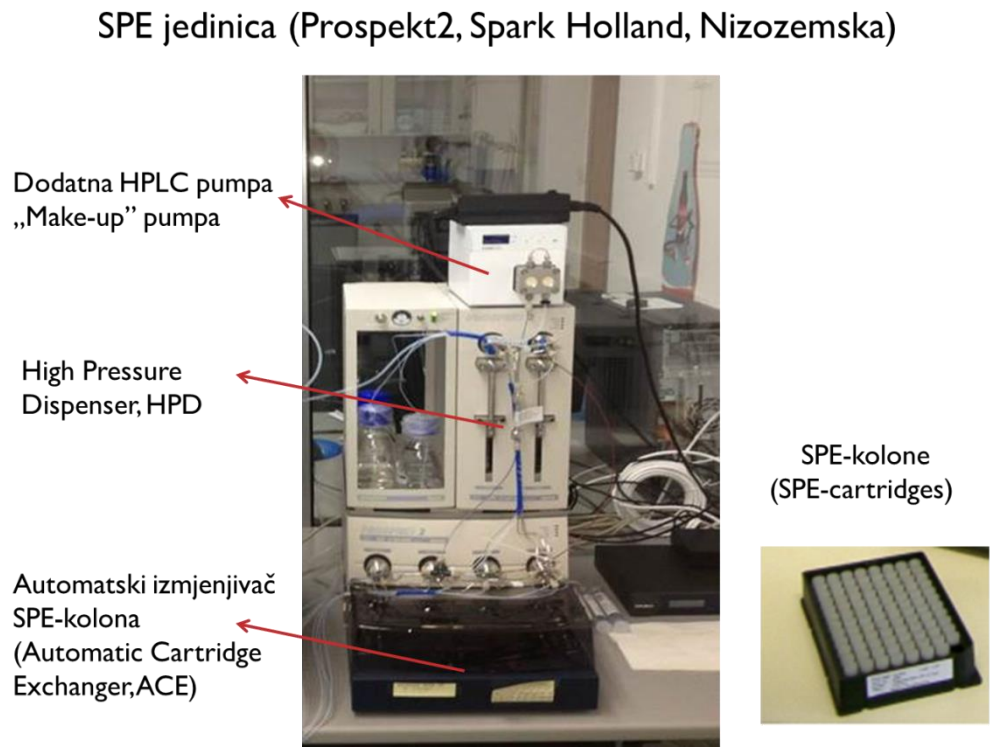
2.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Kromatografija je tehnika kojom se komponente smjese odjeljuju na temelju različite raspodjele između dviju faza- pokretne i nepokretne. Pokretna faza nosi smjesu analita krećući se preko nepokretne faze. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je najčešće korištena kromatografska tehnika. Visoka djelotvornost ove tehnike postignuta je smanjenjem čestica nepokretne faze kojom su punjene kolone u odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju. Kolone su napravljene od nehrđajućeg čelika i imaju glatke unutarnje površine radi postizanja što većeg broja teorijskih tavana. Velike brzine protoka pokretne faze postignute su pomoću crpke koja povisuje tlak u sustavu. U našem slučaju korištena je naizmjenična crpka koja potiskuje pokrenu fazu konstantnim protokom pomoću naizmjeničnih klipova. Za unošenje uzorka koristi se premosni injektor s petljom u koju se uzorak unosi automatiziranom injekcijskom špricom. Da bi odjeljivanje bilo učinkovito, sastojci koji se odjeljuju moraju biti topljivi u pokretnoj fazi, ali i imati afinitet prema nepokretnoj fazi. Prema principu kromatografskog razdvajanja uz upotrebu tekuće pokretne faze kromatografske tehnike možemo podijeliti na: adsorpcijsku kromatografiju, razdjelnu kromatografiju, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju, kromatografiju isključenjem, afinitetnu kromatografiju. U ovom radu korištena je razdjelna kromatografija obrnutih faza u kojoj je pokretna faza polarnija od nepokretne faze. U smjesi komponenata koje se odjeljuju manje polarni analiti duže se zadržavaju na nepolarnoj nepokretnoj fazi nego polarniji analiti. Najpolarnija komponenta prva eluira s kolone, dok nepolarna komponenta stvara jače interakcije s hidrofobnim C18 skupinama vezanima na slikagel. Postoje tri načina eluiranja: izokratno, gradijentno i stupnjevito. Pri izokratnom eluiranju sastav pokretne faze tijekom vremena je stalan i koristi se za jednostavne smjese. Gradijentnim eluiranjem sastav pokretne faze kontinuirano se mijenja tijekom vremena i

koristi se za kompleksnije smjese u kojima se sastojci razlikuju po polarnosti. Stupnjevitim eluiranjem sastav pokretne faze mijenja se u koracima tijekom vremena. Nakon eluiranja s kolone razdvojeni sastojci mogu se detektirati na različite načine. Primjerice, mjerenjem apsorpcije UV i vidljivog zračenja, mjerenjem fluorescencije, uz pomoć IR spektroskopije ili spektrometrije masa. U ovom radu korišten je HPLC instrument s DAD (engl. *Diode Array Detector)* detektorom (detektor s nizom fotodioda). Informacija koja se dobiva iz kromatograma može biti kvalitativna i kvantitativna. Kvalitativna informacija pokazuje koje od komponenata su prisutne u uzorku, a dobiva se usporedbom položaja pika u kromatogramu uzorka s položajem pika u kromatogramu standarda. Kvantitativna informacija daje uvid u količinu prisutnih komponenti u uzorku, a dobiva se integriranjem površine ispod pika ili mjerenjem visine pika. Visina pika može znatno varirati zbog širenja pika, koji je posljedica promjene tlaka i temperature, pa se češće koristi površina ispod pika kao pouzdaniji podatak. Površina ispod pika proporcionalna je koncentraciji analita. U idealnom slučaju pikovi prate oblik Gaussove krivulje.[10] U ovom istraživanju korišten je vezani sustav kojim se odmah nakon kromatografskog odjeljivanja i detekcije spojevi šalju na SPE analizu.

2.4. EKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je postupak ekstrakcije kod koje se odvajanje analita od matrice uzorka temelji na selektivnom vezanju analita na sorbens smješten u maloj koloni, nakon čega slijedi desorpcija ispiranjem odgovarajućim otapalom.[11] Ova metoda zbog svoje brzine, učinkovitosti, selektivnosti i mnogo manjeg utroška štetnih otapala, u posljednjih deset godina istiskuje ekstrakciju tekuće-tekuće iz analitičke uporabe. Nalazi primjenu kod ukoncentriravanja analita, uklanjanja interferirajućih supstanci, te promjene matriksa analita za potrebe kolonske kromatografije.[12] SPE se koristi i u poslijekolonskoj analizi. Glavni dio SPE-jedinice je automatski izmjenjivač SPE-kolona (engl. *Automatic Cartridge Exchanger*, ACE) u kojem su smještene SPE-kolone s različitim nepokretnim fazama (C2, C8, C18, -CN, ionski izmjenjivači, polidivinilbenzenske smole i dr.) (Slika 2.4.1.). Najčešće se primjenjuje kromatografija obrnutih faza (pokretna faza polarnija od nepokretne) na SPE-kolonama s vezanim C18-skupinama[13] Spojevi razdvojeni na HPLC koloni detektiraju se UV/DAD-detektorom te se skladište na SPE-kolone koje su prethodno kondicionirane i ekvilibrirane otapalima koja su korištena i u kromatografiji. Da bi se spojevi zadržali na SPE-koloni, potrebno je smanjiti elucijsku jakost pokretne faze (organskog otapala), a to se postiže upotrebom dodatne HPLC pumpe (tzv. *Make-up* pumpe) koja osigurava dodatni protok vodene faze. Nakon skladištenja spojeva na SPE-kolonu protonirano otapalo koje je korišteno u HPLC analizi uklanja se sušenjem u struji dušika. Za ispiranje analita sa SPE-kolona koristi se deuterirano otapalo, u ovom istraživanju CD_3CN. Ovisno o konfiguraciji sustava LC-SPE-NMR analit se ispire izravno u protočnu ćeliju NMR ili u cjevčicu NMR, a potom se snimanju spektri NMR.

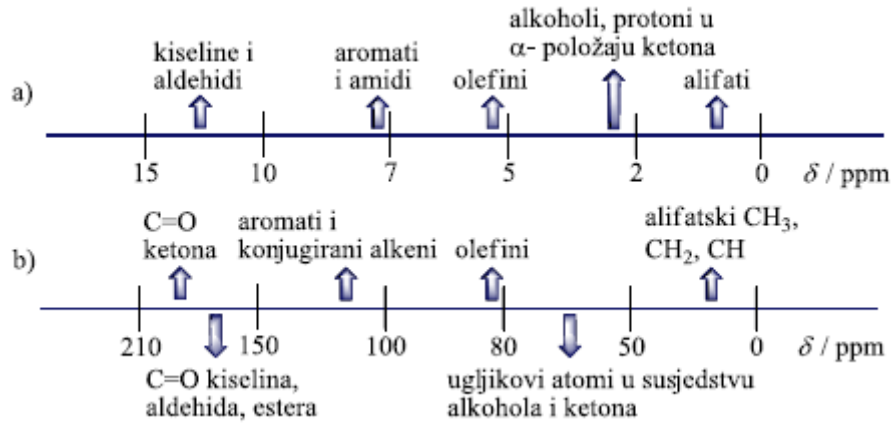


Slika 2.4.1. Jedinica za poslijekolonsku ekstrakciju na čvrstoj fazi u tehnici LC-SPE-NMR.

2.5. SPEKTROSKOPIJA NMR (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*)

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je apsorpcijska spektroskopska tehnika koja omogućuje određivanje funkcijskih skupina organskih, anorganskih i bioloških molekula, utvrđivanje strukture pojedinih molekulskih fragmenata te povezivanje fragmenata u cjelovitu dvodimenzijsku strukturu. Dvodimenzijske tehnike NOESY i ROESY u kombinaciji s tehnikama molekulskog modeliranja omogućuju određivanje i trodimenzijske strukture. Jezgre koje daju efekt NMR moraju imati spin različit od nule, kao ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F, ^{15}N.., odnosno, zbroj protona i neutrona mora biti neparan broj. Takve jezgre posjeduju magnetni moment (μ) i njemu pridruženu kutnu količinu gibanja (P). Svaka jezgra posjeduje dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina (I) te nuklearni magnetni spinski kvantni broj (m_I) . Prema Planckovoj kvantnoj teoriji za prijelaz iz stanja m_I u stanje m_{I+1} potrebna je energija fotona koja mora biti jednaka razlici energija između dvaju spinskih stanja pri čemu je frekvencija fotona jednaka frekvenciji precesije odnosno Larmorovoj frekvenciji. Kada je frekvencija fotona jednaka frekvenciji precesije spinova jezgri oko vektora vanjskog magnetnog polja (B_o) dolazi do rezonancije.[14] Kada se ispuni rezonancijski uvjet, dolazi do apsorpcije kvanta energije iz radiovalnog područja elektromagnetnog spektra i promjene orijentacije nuklearnog spina iz smjera magnetnog polja u suprotni smjer. Budući da svaka jezgra ima svoju vlastitu vrijednost žiromagnetne konstante (γ), uz pretpostavku istoga magnetnog polja, svaka će jezgra rezonirati svojom frekvencijom, koja se razlikuje od

frekvencija svih ostalih jezgara. Rezonancijske frekvencije jezgara bit će u istom odnosu kao njihovi magnetožirni omjeri.[15] Elektroni koji okružuju jezgru stvaraju lokalna magnetna polja što dovodi do zasjenjenja te jezgre od vanjskog magnetnog polja, te je efektivno magnetno polje koje osjeća pojedina jezgra umanjeno za konstantu zasjenjenja (σ). Položaj pojedine jezgre u spektru NMR naziva se kemijski pomak, a predstavlja pomak signala NMR jezgre od refererentnog signala, najčešće tetrametilsilana (TMS). Jezgra koja ima manji kemijski pomak nalazi se pri manjoj frekvenciji i na višem magnetnom polju od jezgre s većim kemijskim pomakom, odnosno kažemo da je došlo do zasjenjenja. Skala za kemijski pomak izražava se u jedinicama ppm, a njezin raspon ovisi o prirodi promatrane jezgre, odnosno s, p, d i f elektronima (Slika 2.5.1.).[16]

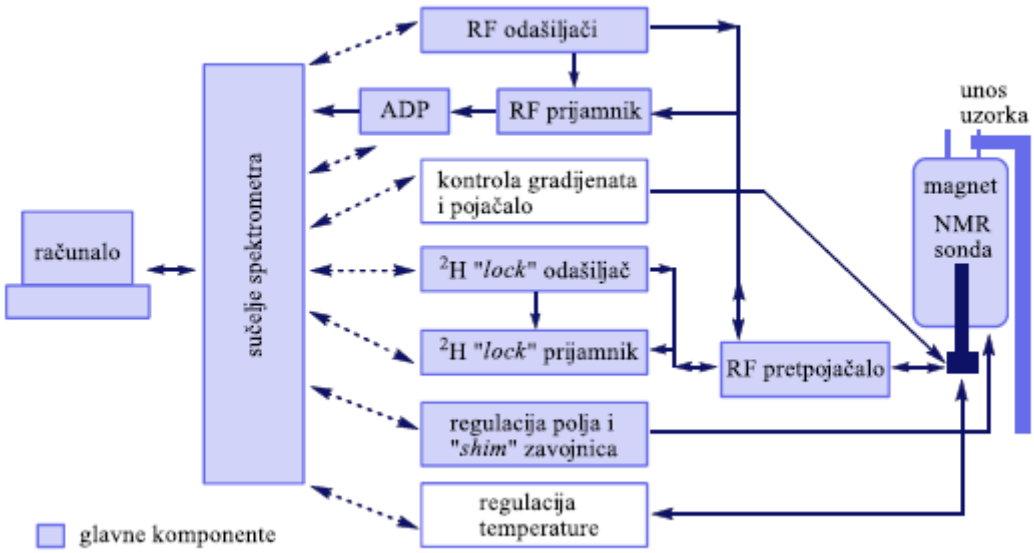


Slika 2.5.1. Skala kemijskih pomaka za: **a)** jezgre ^{1}H, **b)** jezgre ^{13}C s položajem signala karakterističnim za pojedine razrede spojeva.[10]

Među spinovima postoje interakcije. U izotropnom mediju mogu se opaziti skalarne interakcije ili interakcije spin-spin koje opisuje konstanta sprege *J*, a izražava se u hertzima (Hz). Spinsko stanje susjedne jezgre može utjecati na energijske razine promatrane jezgre. Za takve jezgre kažemo da su međusobno spregnute preko jedne ili više kemijskih veza. Zbog sprezanja sa susjednom jezgrom, NMR signal promatrane jezgre simetrično se cijepa na multiplet s brojem signala $2nI + 1$, pri čemu je n broj susjednih jezgara, a *I* spinski kvantni broj jezgre u sprezi. Prema multipletnosti razlikujemo *singlet* (s), *dublet* (d), *triplet* (t), *kvartet* (q), *kvintet*, itd. Jezgre mogu biti kemijski i magnetno ekvivalentne. Kemijski ekvivalentne jezgre posjeduju isti kemijski pomak. Da bi jezgre bile magnetno ekivalentne, moraju imati isti kemijski pomak i isto sprezanje sa susjednim jezgrama. Svi spinovi koji su međusobno u sprezi čine jedan spinski sustav.

Moguće je snimati tekuće i krute uzorke, čiste spojeve, ali i smjese spojeva. Spektrometar NMR sastoji se od supravodljivog magneta koji služi za generiranje homogenog magnetnog polja (od 200 MHz do 1GHz), radiofrekvencijskih (RF) odašiljača koji se koriste za pobudu molekula uzorka, RF pretpojačala koje omogućuje pojačanje intenziteta signala, probe NMR sa cjevčicom u kojoj se nalazi uzorak i drži ga u središtu magnetnog polja. Da bi se povećao omjer signala i šuma u ovom istraživanju korištena je krio proba te je dio elektronike (RF

zavojnice i pretpojačalo) hlađen tekućim dušikom. Homogenost i stabilnost magnetnog polja spektrometra održavaju se korištenjem ^{2}H „*lock*“ kanala i „*shim*“ zavojnica. Dobiveni signal prenosi se RF prijamnikom do analogno-digitalnog pretvornika (ADP) te na kraju do računala (Slika 2.5.2.).



Slika 2.5.2. Shematski prikaz modernog spektrometra.[14]

Iz spektara ^{1}H NMR dobivaju se signali kemijski neekvivalentnih protona u spoju čiji broj je proporcionalan omjeru površina ispod pojedinih signala. Jednodimenzijski spektri NMR bilježe ovisnost intenziteta signala o kemijskom pomaku koji je proporcionalan Larmorovoj frekvenciji. Nakon pobude, detektirani signal u vremenskoj domeni (vrijeme akvizicije, t_a) prevodi se postupkom Fourierove transformacije u frekvencijsku domenu. Na temelju opaženih kemijskih pomaka i konstanti sprege spin-spin može se utvrditi prisutnost određenih fragmenata i funkcijskih skupina u spoju.

Pulsni slijed svake dvodimenzijske tehnike spektroskopije NMR uključuje nekoliko perioda: pripremu (P), evoluciju (E), miješanje (M) i detekciju (D). Osnovna razlika između 1D i 2D tehnika je ta što se u tehnici 2D vrijeme evolucije $t1$ povećava za isti iznos u svakom sljedećem ponavljanju pulsnog slijeda tijekom evolucijskog perioda čime se generira druga frekvencijska dimenzija.

COSY (engl. *correlation spectroscopy*) je jedna od najjednostavnijih i najviše korištenih homonuklearnih dvodimenzijskih tehnika NMR. Koristi se za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze.

Tehnika HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) se koristi za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i heterojezgri (^{13}C, ^{15}N).

Tehnika HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) omogućava uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri, pa čak i četiri kemijske veze te povezivanje pojedinih spinskih sustava. Pomoću ove heteronuklearne tehnike mogu se opaziti korelacije između protona i kvarternih ugljikovih atoma (primjerice karbonilnih ili aromatskih ugljikovih atoma na mjestu supstitucije). Primjenom tehnike HMBC moguće je utvrditi povezanost između atoma koji se ne nalaze u istom spinskom sustavu te tako povezati pojedine molekulske fragmente u cjelinu.

2.6. VEZANI SUSTAV LC-SPE/krio NMR

Prve spregnute metode LC-NMR su zabilježene 1978. godine kada su Watanabe i Niki modificirali klasičnu probu NMR tako što su napravili protočnu ćeliju NMR pomoću teflonske cjevčice koju su spojili s detektorom LC pomoću ventila s 3 petlje. Koristili su sustav normalnih faza za odjeljivanje spojeva i tehniku zaustavljenog protoka (engl. *stopped-flow*) za snimanje spektara NMR.[17] Međutim, zbog slabe osjetljivosti tehnike NMR u to vrijeme, metoda nije bila praktična za širu analitičku primjenu. Kasnija poboljšanja u tehnologiji LC-NMR proširila su analitičku primjenu na stereo-kemijska istraživanja[18], kemiju okoliša[19], analizu prirodnih spojeva[20], fotokemiju[21], razvoj lijekova[1] i istraživanje metabolita[22]. Tehnike LC-NMR su: tehnika kontinuiranog protoka (engl. *on-flow*), tehnika zaustavljenog protoka (engl. *stopped-flow*), tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim intervalima (engl. *time-slice*), tehnika skladištenja pikova u kapilarnim petljama (engl. *loop collection*) i tehnika skladištenja pikova na čvrstom nosaču (LC-SPE-NMR). U tehnici kontinuiranog protoka analit se vrlo kratko zadržava u protočnoj ćeliji pa je moguće snimiti samo jednodimenzijske spektre ^{1}H i ^{19}F NMR. Tehnika je pogodna za snimanje glavnih sastojaka smjese i nestabilnih spojeva koji se brzo raspadaju ili izomeriziraju. Tehnika zaustavljenog protoka omogućava snimanje dvodimenzijskih homo- i heteronuklearnih spektara NMR jer se kromatografska analiza zaustavlja čim analit dođe u protočnu ćeliju. Tehnika je pogodna za spojeve koji imaju definirano vrijeme zadržavanja na koloni i karakteristične UV kromofore. Ako je razlučivanje sastojaka smjese loše ili dva sastojka koeluiraju s kolone, može se koristiti tehnika zaustavljenog protoka u kratkim vremenskim intervalima. Kada želimo odrediti strukture većeg broja spojeva razdvojenih na koloni, najpogodnija je tehnika skladištenja pikova u kapilarnim petljama. U tom slučaju spojevi skladišteni u petljama moraju biti stabilni, jer se spektri NMR snimaju tek po završetku kromatografskog odjeljivanja.[23] U tehnici LC-NMR tijekom kromatografske analize u sustavu obrnutih faza kao pokretna faza mora se koristiti smjesa protoniranog (CH_3CN) i deuteriranog otapala (D_2O). Najpogodniji način eluiranja je izokratno eluiranje jer gradijentni način eluiranja narušava homogenost magnetskog polja u protočnoj ćeliji. Signali otapala korištenih u kromatografskoj analizi često prekrivaju signale analita. Kako bi se oni maknuli iz spektra koriste se sekvence za supresiju signala otapala: WET, WATERGATE, prezasićenje (NOESY tip) i dvostruka spinska jeka pulsnih gradijenata (engl. pulsed field gradients, pfg). Nedostatak supresije signala otapala je što će signali analita koji su u blizini signala otapala također biti suprimirani, čime se gubi strukturna informacija o analitu. Niska osjetljivost povezana s

mjerenjima NMR predstavlja veliki izazov u razvoju metoda LC-NMR prikladnih za izolaciju i određivanje analita prisutnih u niskoj koncentraciji. Napredak u tehnologiji NMR, poput razvoja magneta jačih polja, krio probe, tehnika supresije signala otapala i poboljšanja u dizajnu protočnih ćelija dramatično su unaprijedile osjetljivost tehnike NMR, a time i sustava LC-NMR.[24] Također, postojao je problem u tome da uređaj HPLC bude fizički blizu magneta NMR, no to je prevladano razvojem novih magnetskih štitova.[1] Za razliku od izravnog povezivanja sustava LC-NMR, prednost tehnike LC-SPE-NMR je ta što jedinica SPE omogućuje upotrebu protoniranih otapala za LC analizu čime se smanjuju troškovi analize. Isto tako nema efekta širenja pika koji se javlja u tehnici LC-NMR, jer u tehnici LC-SPE-NMR svaka komponenta odvojena na kromatografskoj koloni može biti brzo uskladištena na SPE-koloni.[25] Višestruko skladištenje analita na istu SPE-kolonu uzastopnim ponavljanjem analize LC (engl. *multitrapping*) koristi se za ukoncentriravanje spoja zastupljenog u niskoj koncentraciji u uzorku, a pridonosi većoj osjetljivosti mjerenja NMR i dobivanju heteronuklearnih spektara 2D NMR.[26] Vezani sustav korišten u ovom istraživanju prikazan je na Slici 2.7.1.



Slika 2.7.1. Vezani sustav LC-SPE/krioNMR.

MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. HPLC ANALIZA

Uzorci 7-etiltriptofola (Pliva) otopljeni su u acetonitrilu tako da masena koncentracija iznosi γ = 2,0 mg ml^{-1} , γ = 50,0 mg ml^{-1} i γ = 123,0 mg ml^{-1}.

Pripravljena je i standardna otopina triptofola, 3-(2-hidroksietil)indola, Sigma-Aldrich, čistoće 97%, masene koncentracije γ = 2,0 mg ml^{-1} u acetonitrilu.

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti:

Agilent 1260 Infinity s UV-DAD detektorom

Kromatografske kolone:

Waters XBridge Phenyl (150 mm × 4,6 mm; 3,5 μm)

Waters XBridge C18 (150 mm × 4,6 mm; 3,5 μm)

Waters Symmetry Shield ^{TM} RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 μm,

Pokretne faze: Metanol*/fosfatni pufer pH 7

Acetonitril* (ACN)/voda

ACN/acetatni pufer pH 4

*Metanol i acetonitril su čistoće za HPLC, proizvođača J. T. Baker.

Priprava fosfatnog pufera: 6,81 g kalijevog dihidrogen fosfata je otopljeno u 1 L deionizirane vode. pH otopine korigiran je pomoću pH-metra polaganim dodatkom vodene otopine natrijevog hidroksida (c = 2,0 mol dm^{-3}). Tako pripravljena otopina je profiltrirana pod sniženim tlakom kroz filter veličine pora 0,45 μm.

Priprava acetatnog pufera: 5 ml octene kiseline otopljeno je u 1 L deionizirane vode. pH otopine korigiran je pomoću pH-metra polaganim dodatkom vodene otopine natrijevog hidroksida (c = 2,0 mol dm^{-3}). Tako pripravljena otopina je profiltrirana pod sniženim tlakom kroz filter veličine pora 0,45 μm.

Način eluiranja: kombinacija izokratnog i gradijentnog eluiranja

Protok: 1 - 1,6 ml/min

Volumen injektiranja: 20 μl

Temperatura kolone: 25 °C

Detekcija: 225 nm, 273 nm

Vrijeme eluiranja: 30 min (fenilna kolona)

60 min (C18 kolona)

3.2. SPE ANALIZA

Instrument:

Spark Holland Prospekt 2 SPE jedinica sa Knauer pumpom K-120

SPE-kolone: HySphere Resin GP i C18 kolone (10 × 2 mm)

Dodatni protok vode: 3 ml/min

Višestruko skladištenje spojeva (engl. *multitrapping*): 9 do 20 puta

Kondicioniranje SPE-kolona: 500 µl CH_3CN

Ekvilibracija SPE-kolona: 500 µl H_2O

Sušenje SPE-kolona: 60 min u struji dušika

Otapalo za eluiranje analita sa SPE-kolona: 200 µl CD_3CN

3.3. SPEKTROSKOPIJA NMR

Spektrometar NMR:

Bruker Avance III HD 400 MHz Ascend s BBO 5 mm Prodigy krioprobom

NMR cjevčice: 3 mm

Otapalo: CD_3CN

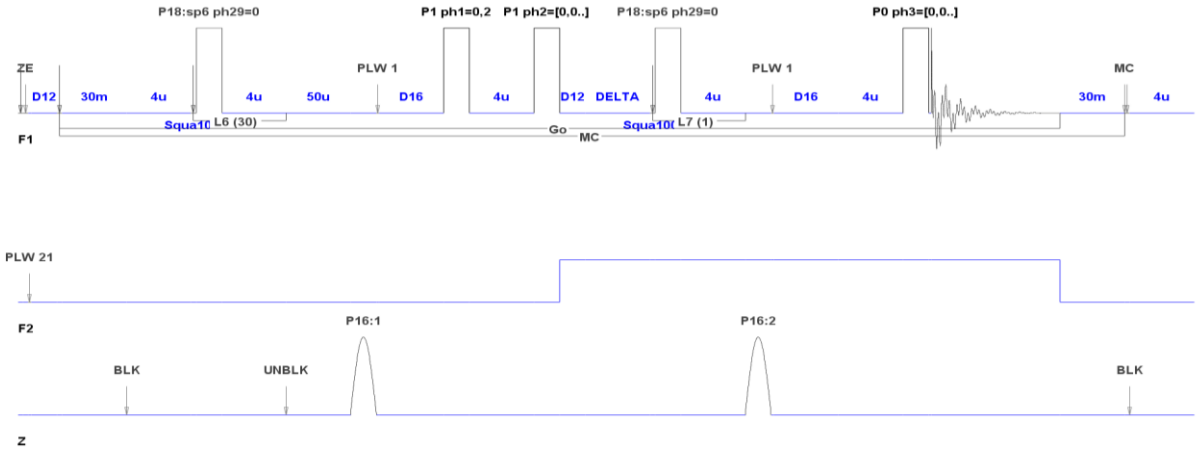
Unutrašnji standard: TMS

Temperatura: 298 K

Snimljeni spektri NMR: ^{1}H, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC (korišteni su pulsni programi unutar programskog paketa TopSpin 3.5)

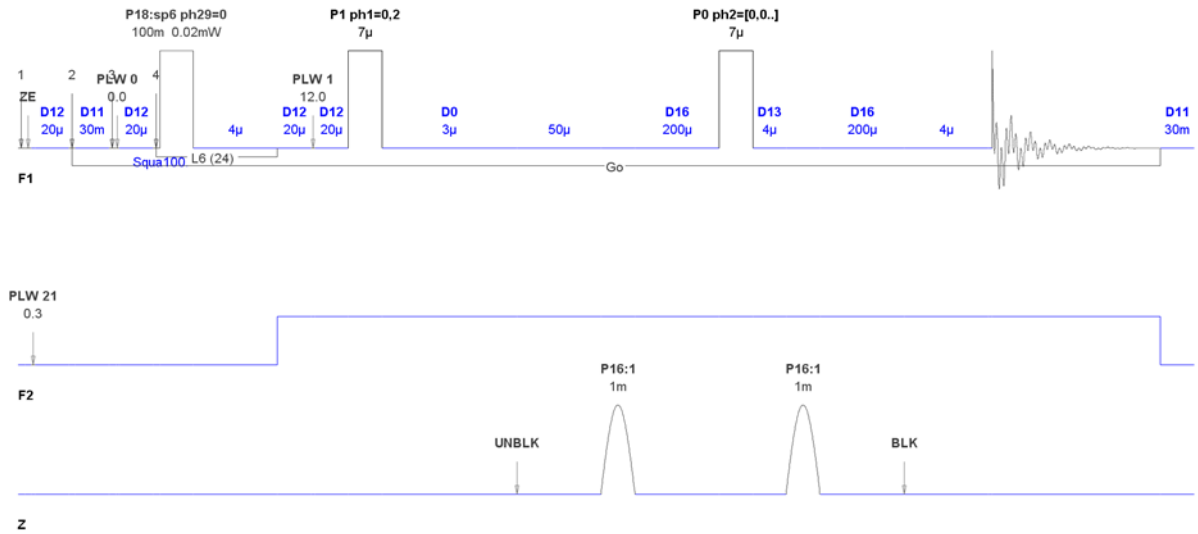
Za snimanje spektara ^{1}H NMR korištena je spektralna širina od 8000 Hz, ukupno vrijeme snimanja od 10 min i broj snimaka 128. Upotrijebljen je pulsni slijed 1D NOESY za supresiju

signala otapala koji koristi dva selektivna pulsa za prezasićenje tijekom odgode relaksacije i vremena miješanja. Slijed koristi i dva gradijentna pulsa za bolju supresiju signala otapala. Shematski prikaz pulsnog slijeda nalazi se na Slici 3.3.1.



Slika 3.3.1. Pulsni slijed 1D NOESY za supresiju signala otapala.

Broj snimaka za homonuklearne i heteronuklearne eksperimente 2D ovisio je o koncentraciji spoja, odnosno o omjeru signala i šuma u spektru ^{1}H. Spektri COSY su snimljeni upotrebom 2048 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement primijenjeno je 8 snimaka, spektralno područje od 6393,86 Hz te relaksacijsko vrijeme odgode od 2 s. Digitalna rezolucija bila je 6,34 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 49,95 Hz u F1 dimenziji. Za snimanje spektra COSY upotrijebljen je pulsni slijed za supresiju signala otapala koji koristi selektivni (meki) puls za prezasićenje, gradijentne pulseve za odabir magnetizacije, te rasprezanje signala ^{13}C u F2 domeni tijekom vremena evolucije t1 i vremena detekcije t2. Shematski prikaz sekvence nalazi se na Slici 3.3.2.



Slika 3.3.2. Pulsni slijed za supresiju signala otapala u spektru COSY.

Za snimanje spektara HSQC korištene su 1024 točke u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement primijenjeno je 12 - 100 snimaka ovisno o koncentraciji analita. Spektralno područje bilo je 6393,86 Hz u F2 dimenziji i 18115,94 u F1 dimenziji. Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je 2 s. Digitalna rezolucija bila je 12,49 Hz po točki u F2 dimenziji, odnosno 141,53 Hz u F1 dimenziji. Spektri HMBC snimljeni su upotrebom spektralne širine od 5330,49 Hz u F2 dimenziji, odnosno 22345,60 Hz u F1 dimenziji. Korišteno je 4096 točaka u F2 dimenziji i 256 inkremenata u F1 dimenziji. Za pojedini inkrement primijenjeno je 48 - 180 snimaka. Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je 1,5 s. Digitalna rezolucija iznosila je 2,60 Hz u F2 dimenziji odnosno 174,39 Hz po točki u F1 dimenziji.

REZULTATI I RASPRAVA

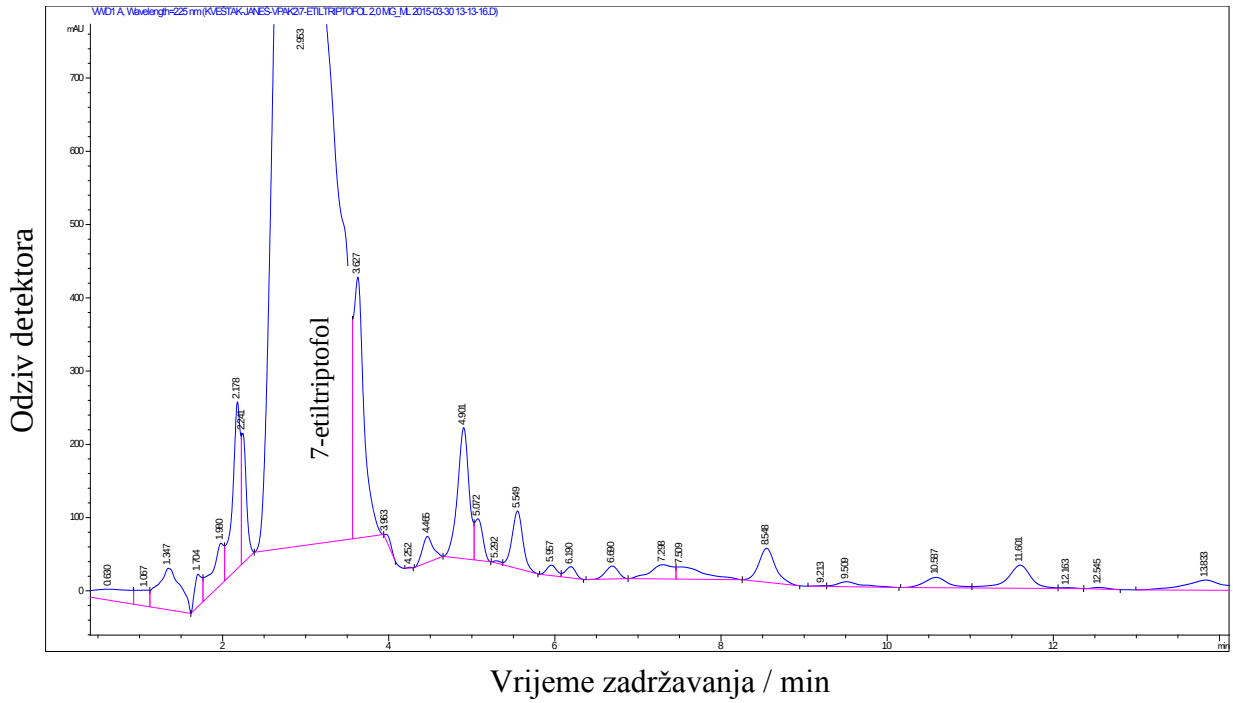
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RAZVOJ METODE HPLC ZA ODJELJIVANJE ONEČIŠĆENJA U UZORKU 7-ETILTRIPTOFOLA

Prije analize LC-SPE/NMR bilo je potrebno razviti metodu HPLC za odjeljivanje onečišćenja. Uzorak 7-etiltriptofola eluiran je 15 minuta kroz kolonu Waters Symmetry Shield^{TM} RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm pri temperaturi kolone 25 °C. Uzorak je eluiran izokratno sustavom otapala acetonitril/acetatni pufer (pH 4) prema Tablici 4.1. Dobiveni kromatogram uzorka masene koncentracije γ = 2,0 mg ml^{-1} prikazan je na Slici 4.1. Na kromatogramu je označen pik 7-etiltriptofola.

Tablica 4.1. Uvjeti pri izokratnom načinu eluiranja na koloni Waters Symmetry Shield ^{TM} RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm.

Mobilna faza**:**	Protok**:**	Temperatura kolone**:**	Volumen injektiranja**:**	Radna valna duljina detekcije**:**	Vrijeme eluiranja**:**
ACN/acetatni pufer (pH 4) = 55/45 (*v/v*)	1,6 ml min^{-1}	25 °C	20 µl	225 nm	15 min

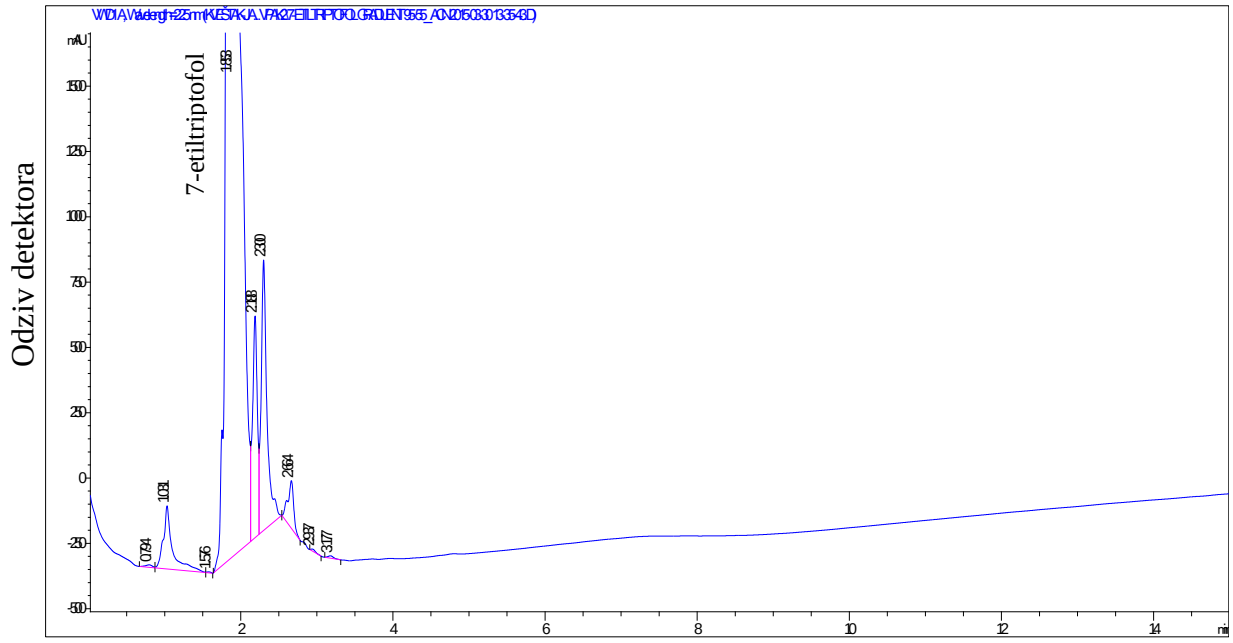


Slika 4.1. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (masena koncentracija, γ = 2,0 mg ml^{-1}) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.1.

Izokratnim eluiranjem sustavom otapala ACN/acetatni pufer (pH 4) dobiveno je dobro odvajanje većeg broja komponenti u uzorku 7-etiltriptofola. Kako bismo dodatno razlučili komponente čiji se pikovi preklapaju s pikom 7-etiltriptofola, primijenjeno je gradijentno eluiranje prema Tablici 4.2. Dobiveni kromatogram uzorka masene koncentracije γ = 2,0 mg ml^{-1} prikazan je na Slici 4.2.

Tablica 4.2. Uvjeti pri gradijentnom načinu eluiranja na koloni Waters Symmetry Shield ™ RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm

Mobilna faza:	Protok:	Temperatura kolone:	Volumen injektiranja:	Radna valna duljina detekcije:	Vrijeme eluiranja:	Način eluiranja:
ACN/ acetatni pufer (pH 4)	1,6 ml / min	25 °C	20 µl	225 nm	15 min	0- 15 min 95→55% ACN



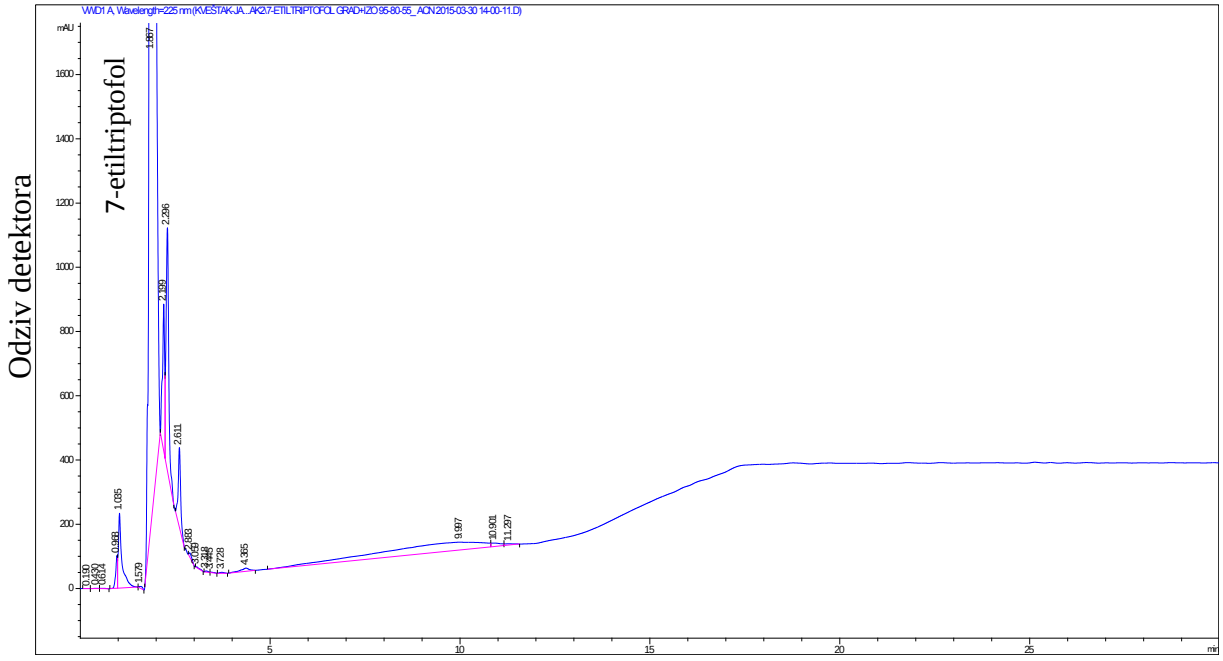
Slika 4.2. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (masena koncentracija, γ = 2,0 mg ml^{-1}) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.2.

Gradijentnim načinom eluiranja 7-etiltriptofol eluira s kolone znatno brže u odnosu na izokratan način eluiranja, no pikovi pojedinih nečistoća još uvijek nisu potpuno razlučeni od glavnog pika, niti se većina nečistoća eluira s kolone. Analizom dvaju kromatograma (Slika 4.1. i Slika 4.2.) pokazano je da bi se trebala primijeniti kombinacija izokratnog i gradijentnog eluiranja mobilnom fazom ACN/acetatni pufer (pH 4) prema Tablici 4.3. Dobiveni

kromatogram uzorka 7-etiltriptofola masene koncentracije, γ = 2,0 mg ml^{-1} prikazan je na Slici 4.3.

Tablica 4.3. Uvjeti pri kombinaciji izokratnog i gradijentnog načina eluiranja na koloni Waters Symmetry Shield ^{TM} RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm

Mobilna faza:	Protok:	Temperatura kolone:	Volumen injektiranja:	Radna valna duljina detekcije:	Vrijeme eluiranja:	Način eluiranja:
ACN/ acetatni pufer (pH 4)	1,6 ml / min	25 °C	20 µl	225 nm	30 min	0- 10 min 95→80% ACN
						10- 15 min 80→55% ACN
						15- 30 min 55% ACN



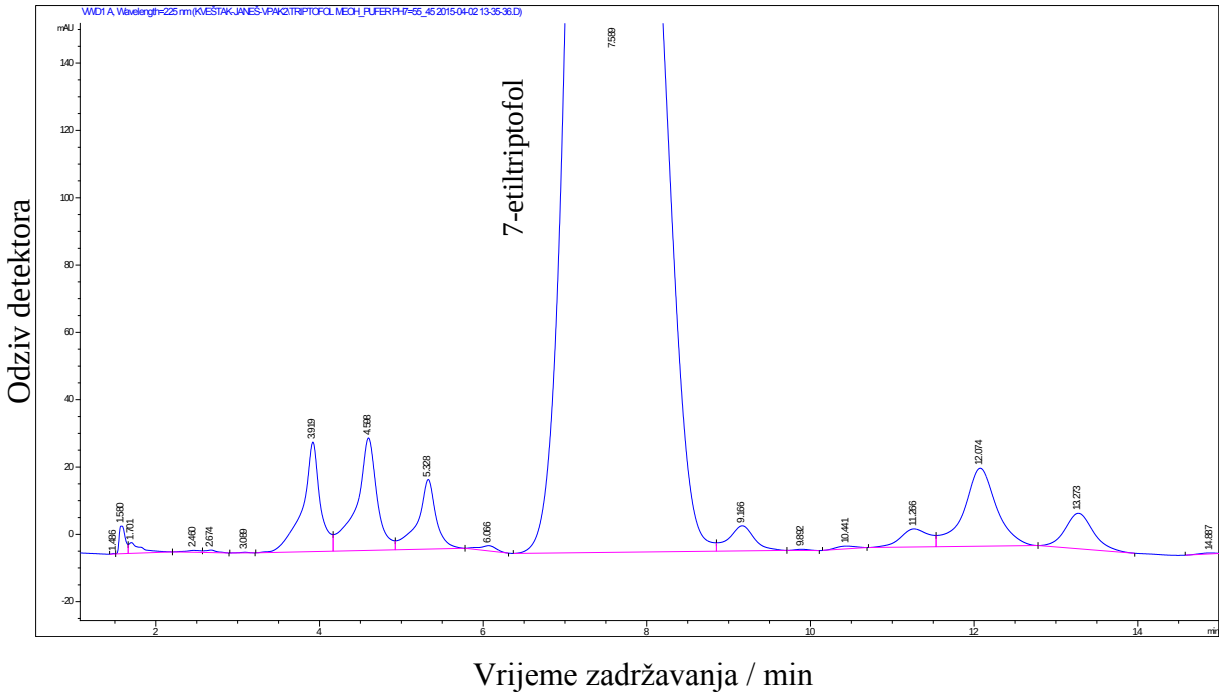
Slika 4.3. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (masena koncentracija, γ = 2,0 mg ml^{-1}) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.3.

Ovaj način eluiranja pokazuje najbolje razlučivanje pikova oko glavnog pika no većina nečistoća ne eluira s kolone ovim sustavom otapala. Sekharayya i suradnici koristili su pokretnu fazu metanol/fosfatni pufer (pH 7) i gradijentno eluiranje za praćenje sinteze 7-etiltriptofola i za identifikaciju onečišćenja[7]. Stoga je u našem slučaju ACN/acetatni pufer

zamijenjen pokretnom fazom metanol/fosfatni pufer (pH 7). Dobiveni kromatogram uzorka 7-etiltriptofola prikazan je na Slici 4.4.

Tablica 4.4. Uvjeti pri izokratnom načinu eluiranja na koloni Waters Symmetry Shield ^{TM} RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm uz novu pokretnu fazu.

Mobilna faza**:**	Protok**:**	Temperatura kolone**:**	Volumen injektiranja**:**	Radna valna duljina detekcije**:**	Vrijeme eluiranja**:**
MeOH /fosfatni pufer (pH 7) = 55 : 45 (*v/v*)	1,6 ml / min	25 ˚C	20 µl	225 nm	15 min

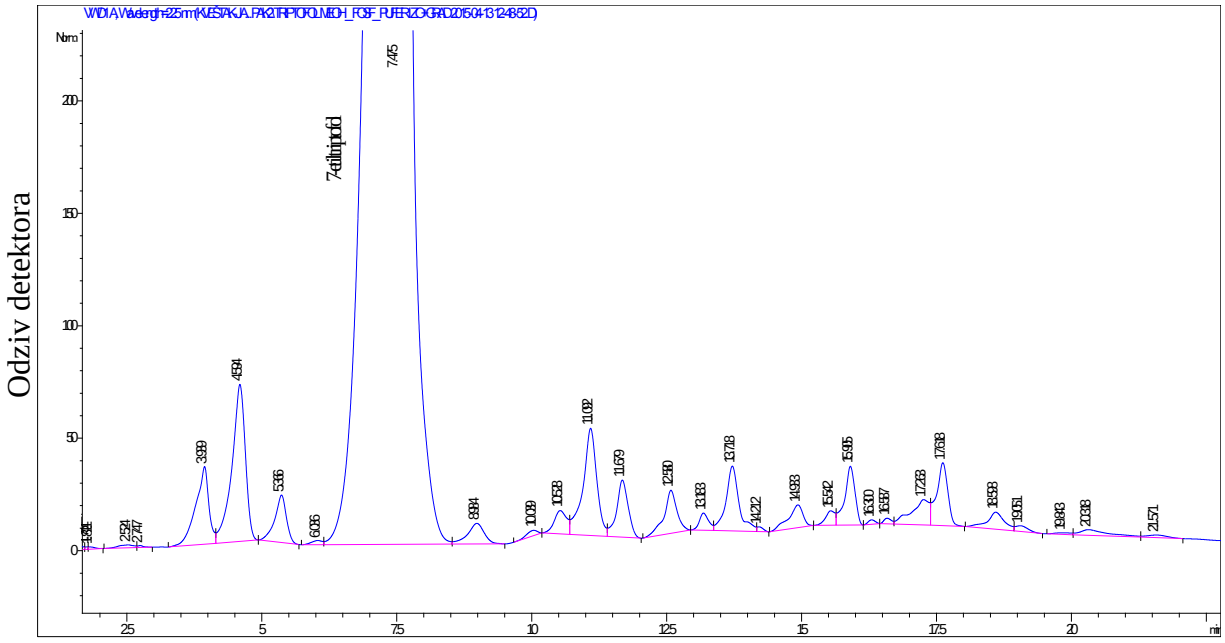


Slika 4.4. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (masena koncentracija, γ = 2,0 mg ml^{-1}) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.4.

Primjenom izokratnog načina eluiranja sustavom otapala metanol/fosfatni pufer (pH 7) postignuto je bolje razlučivanje pikova nego upotrebom ACN/acetatni pufer (pH 4). Pik 7-etiltriptofola je simetričniji, ali se nečistoće nisu eluirale unutar 15 min pa je vrijeme eluiranja produženo te je uvedena kombinacija gradijentnog i izokratnog načina eluiranja prema Tablici 4.5. Dobiveni kromatogram uzorka 7-etiltriptofola prikazan je na Slici 4.5.

Tablica 4.5. Uvjeti pri kombinaciji izokratnog i gradijentnog načina eluiranja na koloni Waters Symmetry Shield ^{TM} RP 18; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm.

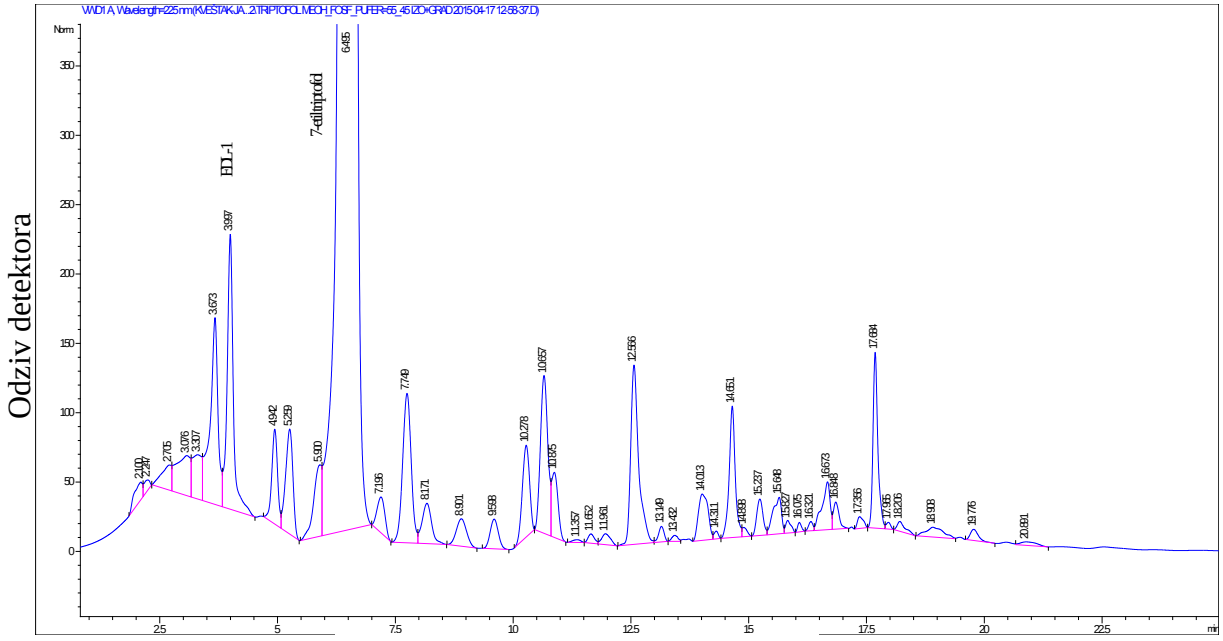
Mobilna faza:	Protok:	Temperatura kolone:	Volumen injektiranja:	Radna valna duljina detekcije:	Vrijeme eluiranja:	Način eluiranja:
MeOH/ fosfatni pufer (pH 7)	1,5 ml / min	25 ˚C	20 µl	225 nm	30 min	0- 6 min 55% metanol
						6- 15 min 55→80% metanol
						15 -30 min 80→55% metanol



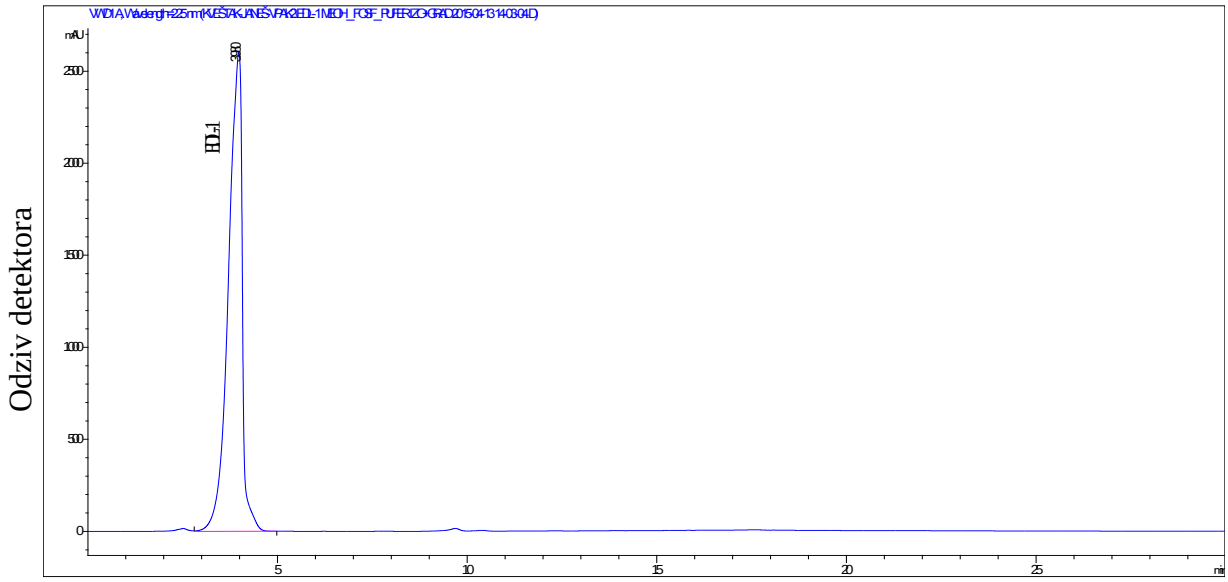
Slika 4.5. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (masena koncentracija, γ = 2,0 mg ml^{-1}) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.5.

Kombinacijom gradijentnog i izokratnog načina eluiranja uz sustav otapala metanol/fosfatni pufer (pH 7) postignuto je zadovoljavajuće odjeljivanje komponenata pa je taj sustav primijenjen i na fenilnu kolonu kako bi se istražilo odjeljivanje spojeva na drugoj vrsti nepokretne faze. Uzorak 7-etiltriptofola injektiran je na kolonu Waters XBridge ^{TM} Phenyl; 150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm pri 25 °C i eluiran uz kromatografske uvjete opisane u Tablici 4.5.

(Slika 4.6.) Snimljen je i kromatogram literaturno poznatog onečišćenja EDL-1.[7] Usporedbom vremena zadržavanja triptofola (EDL-1) u kromatogramu standarda (Slika 4.7.) s vremenom zadržavanja u kromatogramu uzorka (Slika 4.6.) identificirana je prisutnost opisanog spoja u uzorku. Struktura spoja prikazana je na Slici 2.2.4.



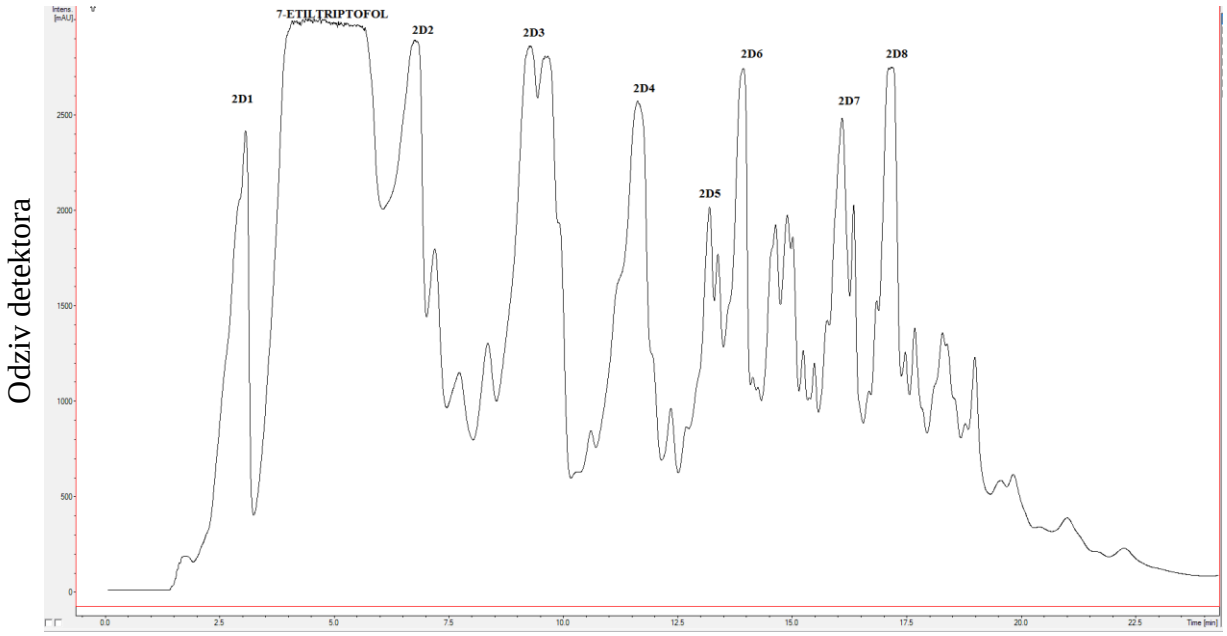
Slika 4.6. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (masena koncentracija, γ = 2,0 mg ml^{-1}) dobiven na fenilnoj koloni uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.5.



Slika 4.7. Kromatogram triptofola (EDL-1) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.5.

4.2. ANALIZA NEPOZNATIH ONEČIŠĆENJA TEHNIKOM LC-SPE/krio NMR

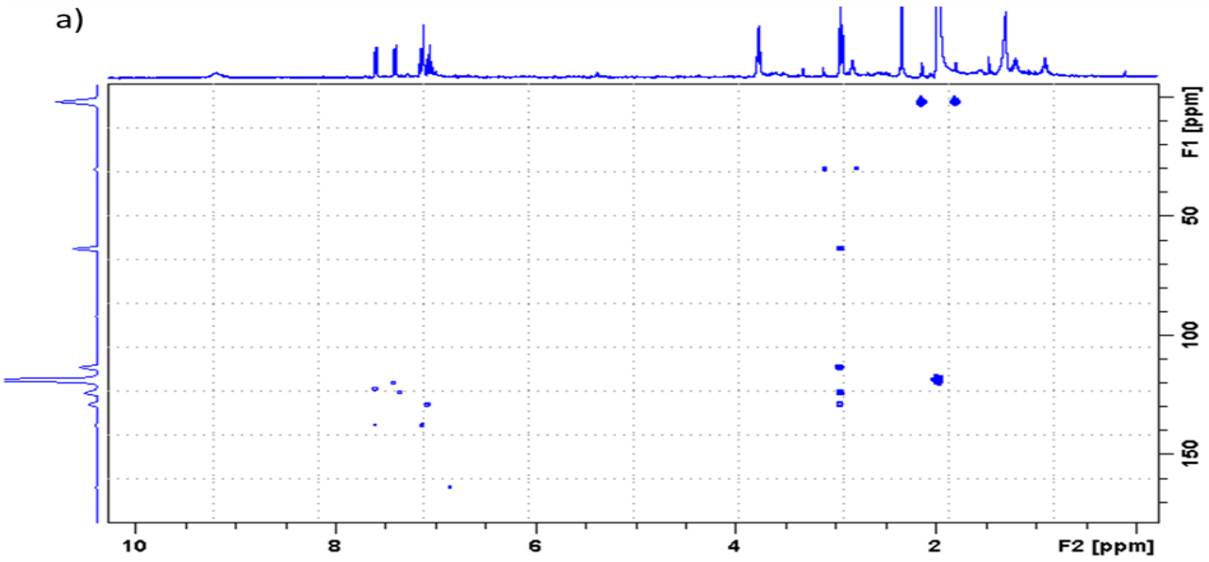
Nakon što je optimirano kromatografsko odjeljivanje nepoznatih onečišćenja u uzorku 7-etiltriptofola, istraženi su uvjeti za analizu LC-SPE. S obzirom da je tehnika NMR slabije osjetljiva nego HPLC i zahtjeva veću količinu uzorka za snimanje spektara NMR, bilo je potrebno povećati količinu uzorka koja će se injektirati na kolonu. Jedna je mogućnost povećati volumen injektiranja, a druga mogućnost je injektiranje istog volumena uzorka, ali veće početne koncentracije. Poznato je da povećanjem volumena injektiranja dolazi do širenja pikova i smanjenja razlučivosti[27], stoga je odabran drugi način te je pripravljen uzorak 7-etiltriptofola koncentracije γ = 123,0 mg ml^{-1}. Kromatogram uzorka prikazan je na Slici 4.8.



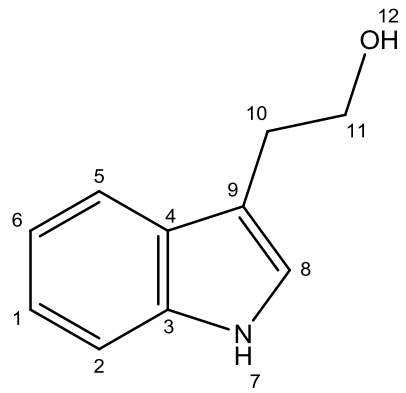
Slika 4.8. Kromatogram uzorka 7-etiltriptofola (γ = 123,0 mg ml^{-}1) dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.5.

Spojevi označeni kao 2D1, 2D2 i 2D8 uspješno su ekstrahirani na C18 SPE-koloni uzastopnim poslijekolonskim skladištenjem (engl. *multitrapping*) 9 puta. Spojevi su eluirani sa SPE-kolona deuteriranim acetonitrilom u 3 mm cjevčice NMR. Snimljeni su spektri ^{1}H, COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC i ^{1}H-^{13}C HMBC na temelju kojih su određene strukture spojeva (Slika 4.9.-4.11.). Identificirani spoj 2D1 odgovarao je od prije poznatom spoju EDL-1, dok su 2D2 i 2D8 nova onečišćenja čiji su molekulski ioni dobiveni snimanjem spektara MS te iznose *m/z* = 173 za 2D2, odnosno *m/z* = 224 za 2D8.

a)



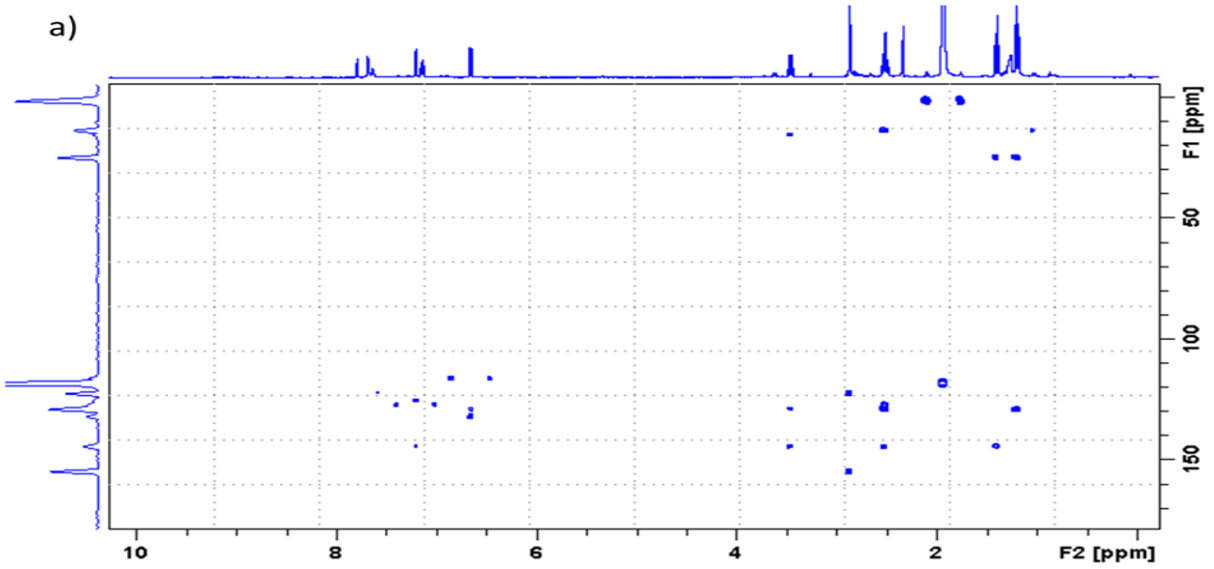
b)



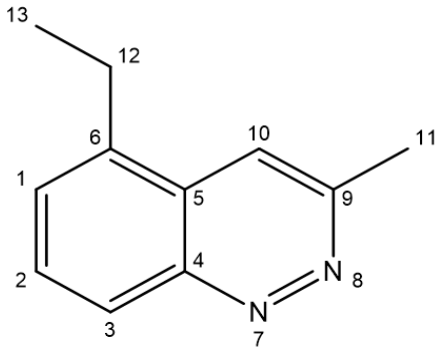
c)

ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	7,14	121,88
2	7,40	111,81
3	-	137,74
4	-	128,92
5	7,59	119,04
6	7,06	119,23
7	9,18	-
8	7,12	123,32
9	-	113,40
10	2,95	62,70
11	3,77	29,10

Slika 4.9. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 2D1; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 2D1 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.



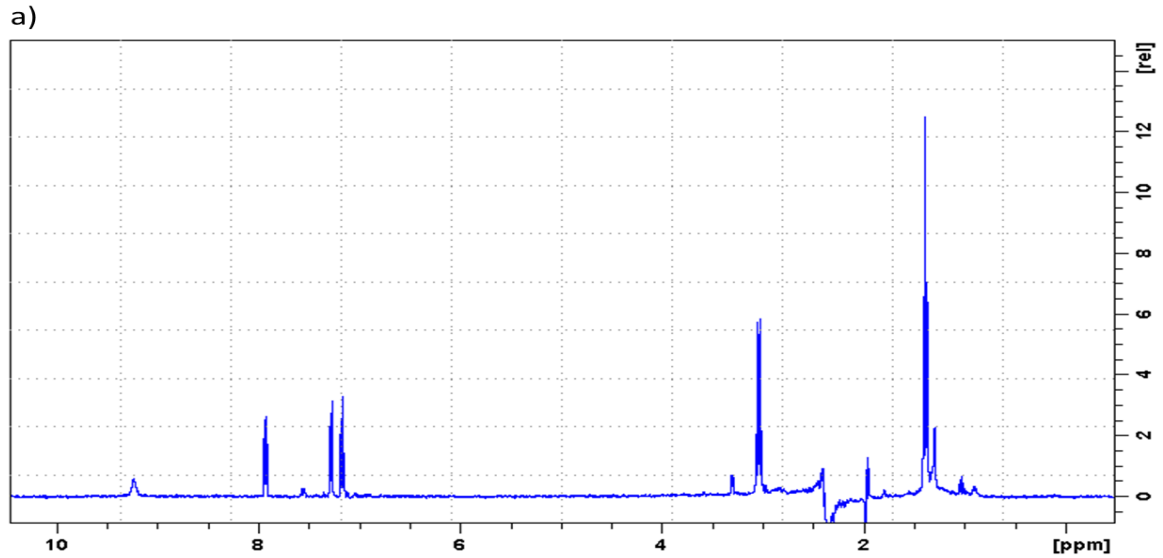
b)



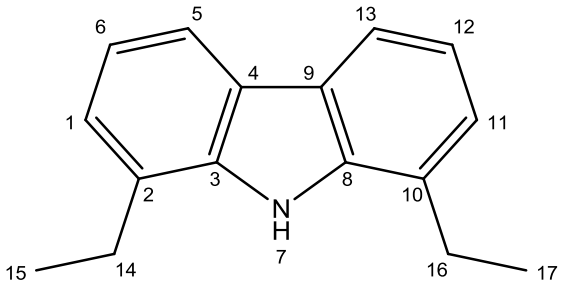
c)

ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	7,64	128,06
2	7,68	131,21
3	7,68	124,42
10	7,79	121,6
11	2,87	21,08
12	3,46	23,92
13	1,39	14,55

Slika 4.10. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 2D2; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 2D2 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.



b)



c)

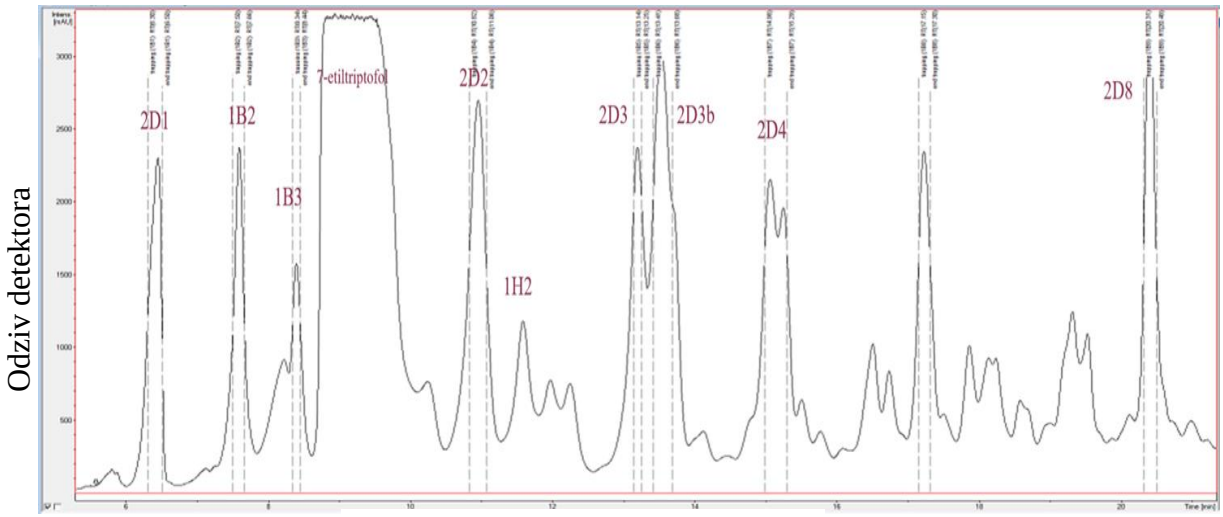
ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	7,28	124,32
3	-	138,38
4	-	123,14
5	7,93	117,51
6	7,17	119,29
9	9,23	-
14	3,04	24,11
15	1,39	13,73

Slika 4.11. a) spektar ^{1}H; b) struktura spoja 2D8; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 2D8 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

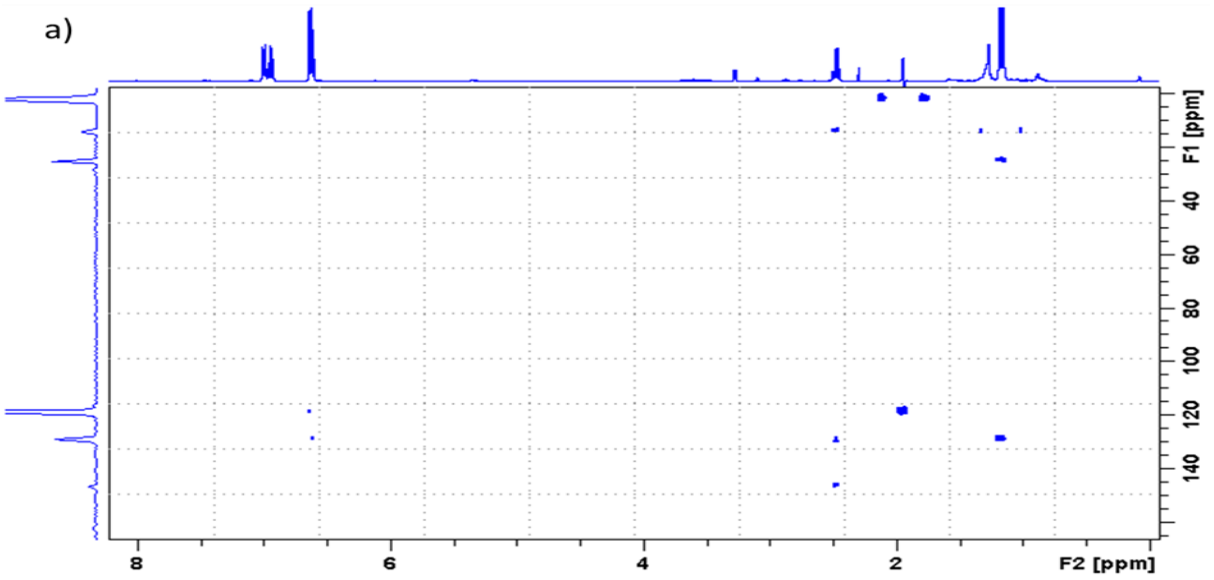
Kako bi se postiglo bolje odjeljivanje polarnijih spojeva (spojeva koji eluiraju prije glavne komponente) izmijenjen je gradijent prema Tablici 4.10. i smanjena je masena koncentracija uzorka na γ = 50,0 mg ml^{-1}. Dobiveni kromatogram prikazan je na Slici 4.12. Promjenom gradijenta postignuto je bolje odjeljivanje polarnijih spojeva pa su uspješno izolirani 1B2, 1B3 i 1H2 nakon 10 do 15 uzastopnih skladištenja na SPE-kolone s poli(divinil-benzen) punilom (komercijalnog naziva HySphere Resin GP kolone). Za izolirane spojeve snimljeni su jedno- i dvodimenzijski spektri NMR. Spektri ^{1}H-^{13}C HMBC i strukture spojeva prikazani su na Slici 4.13. za 1B2, odnosno na Slici 4.15. za spoj 1H2. Za navedene spojeve snimljeni su spektri masa te su dobiveni molekulski ioni *m/z* = 122 za 1B2, te *m/z* = 269 za 1H2. Za spoj 1B3 snimljeni su spektri ^{1}H i COSY te je dobiven molekulski ion *m/z* = 203. Predložena struktura spoja nalazi se na Slici 4.14.b.

Tablica 4.10. Izmijenjeni kromatografski uvjeti na koloni Waters XBridge Phenyl; 150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm

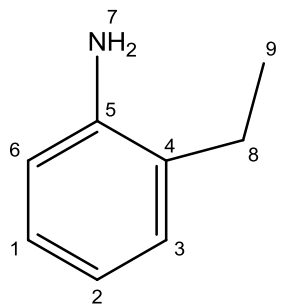
***t* / min**	**φ(metanol)/%**	**φ(pufer)/%**
0	10	90
1,9	10	90
2	55	45
8	55	45
18	80	20
24	72	28
24,5	95	5
30	95	5



Slika 4.12. Kromatogram uzorka dobiven uz kromatografske uvjete prema Tablici 4.10.



b)

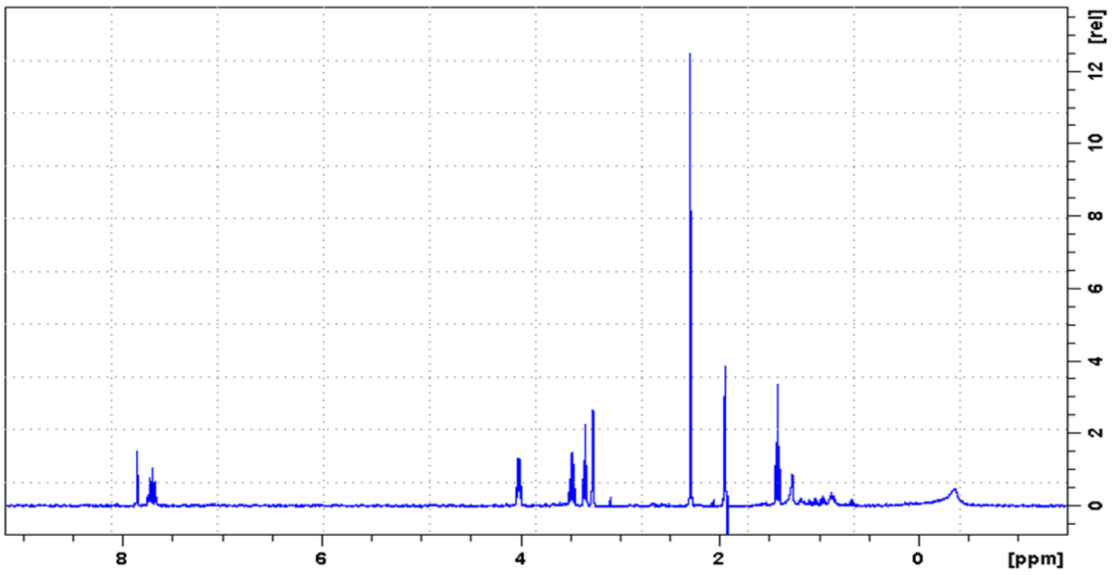


c)

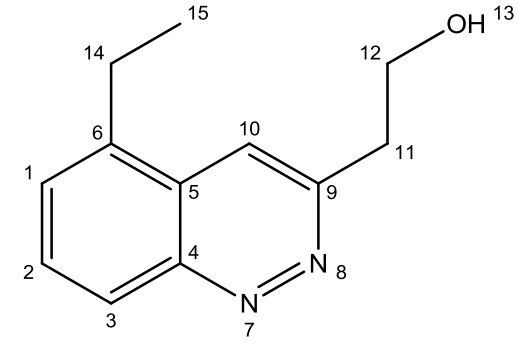
ATOM	*δ*/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	6,94	128,02
2	6,61	118,97
3	6,99	129,61
4	-	128,70
5	-	146,30
6	6,62	116,21
7	3,99	-
8	2,47	25,14
9	1,16	13,99

Slika 4.13. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 1B2; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 1B2 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

a)



b)

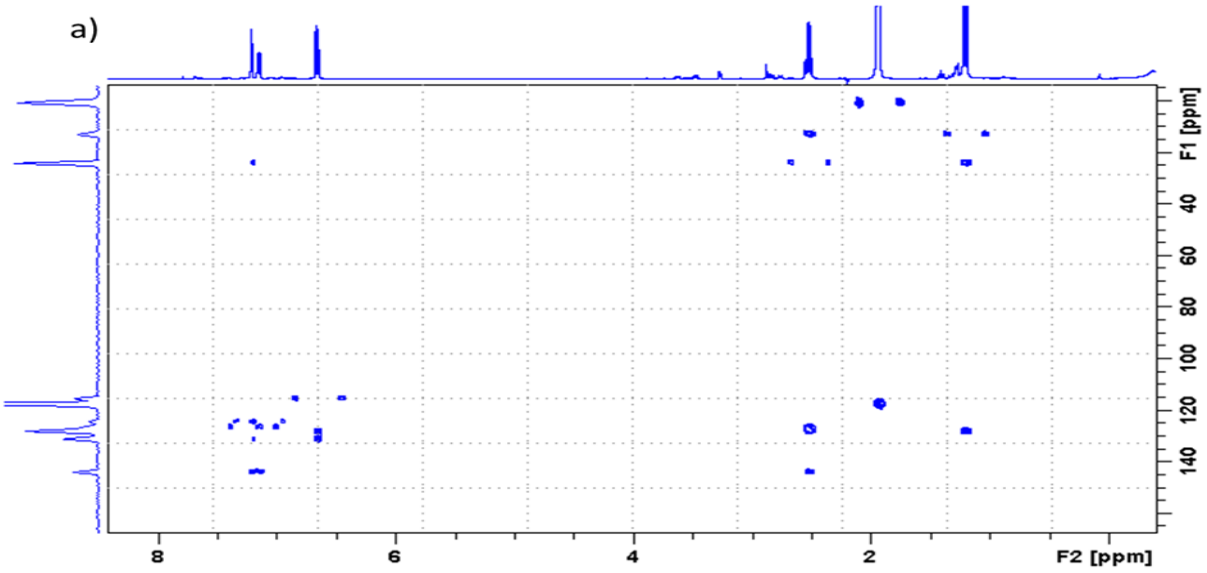


c)

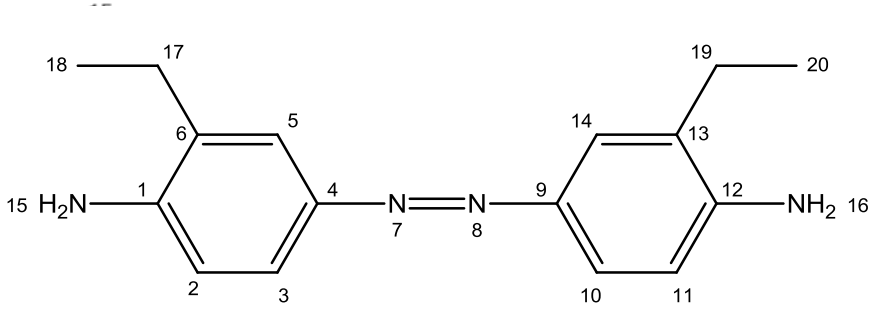
ATOM	δ/ ppm
	^{1}H
1-3	7,75-7,66
10	7,85
11	3,35
12	4,02
14	3,48
15	1,42

Slika 4.14. a) spektar ^{1}H; b) struktura spoja 1B3; c) kemijski pomaci ^{1}H NMR za spoj 1B3 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

a)



b)

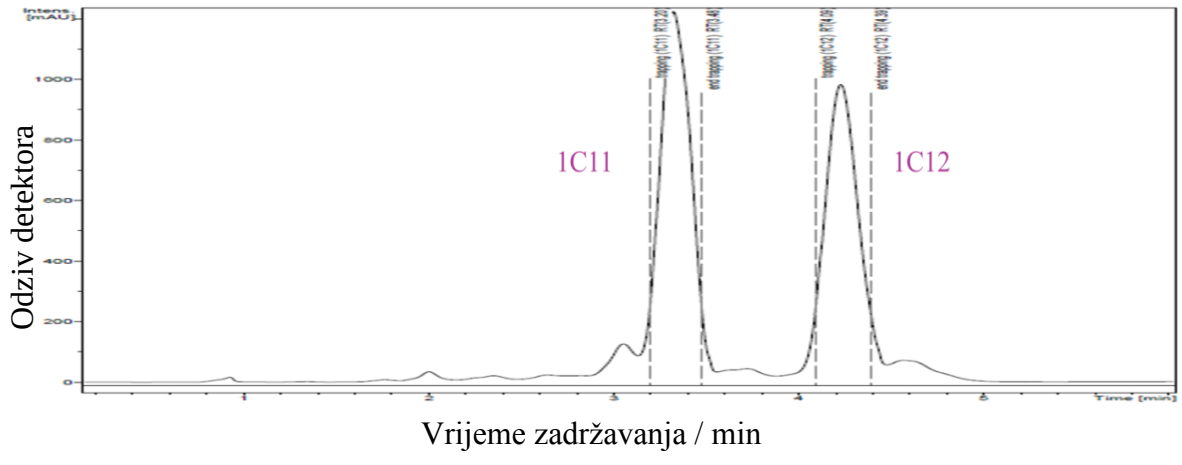


c)

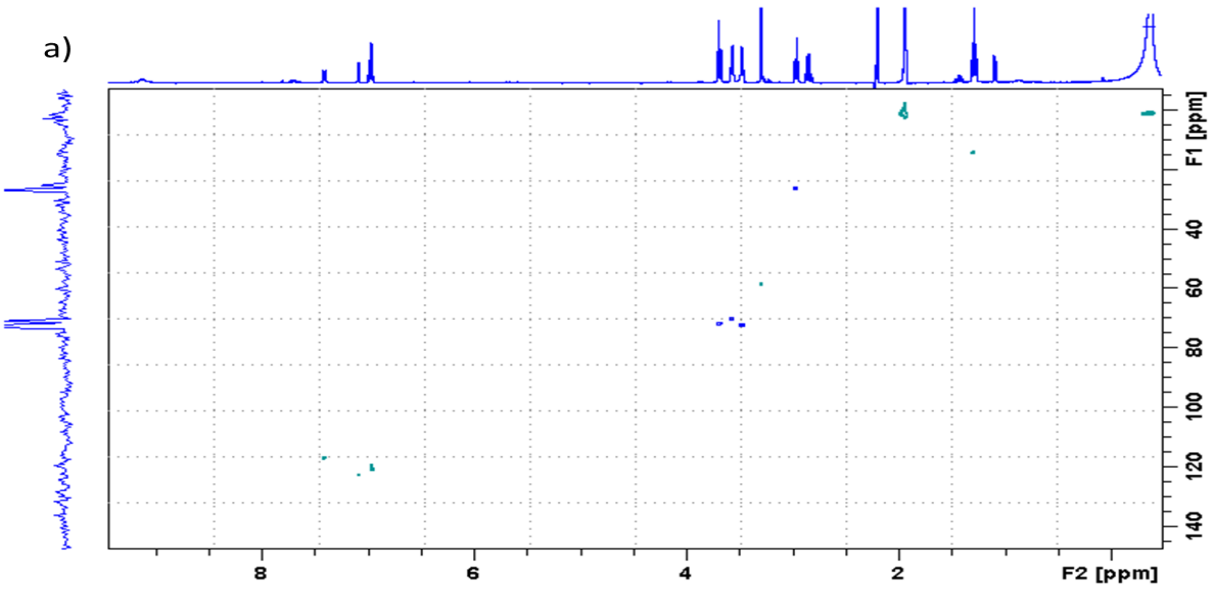
ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	-	143,98
2	6,66	115,24
3	7,15	124,30
4	-	131,13
5	7,21	126,22
6	-	128,20
15	4,02	-
17	2,52	23,99
18	1,21	12,72

Slika 4.15. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 1H2; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 1H2 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

Nakon višestrukog skladištenja spoja 2D4 na SPE-kolonu i snimanja spektra ^{1}H uočeno je da se radi o smjesi dvaju spojeva, pa je stoga analit skladišten na SPE-koloni, eluiran u vialu za HPLC analizu i rekromatografiran na C18 koloni s drugom pokretnom fazom. Odjeljivanje dvaju spojeva postignuto je izokratnim eluiranjem smjesom acetonitrila i vode (*60/40, v/v*) (Slika 4.16.) te su njihove strukture određene interpretacijom spektara ^{1}H, COSY i ^{1}H-^{13}C HSQC (Slike 4.17. i 4.18.). Molekulski ion za spoj 1C11 je *m/z* = 249, odnosno *m/z* = 160 za spoj 1C12.

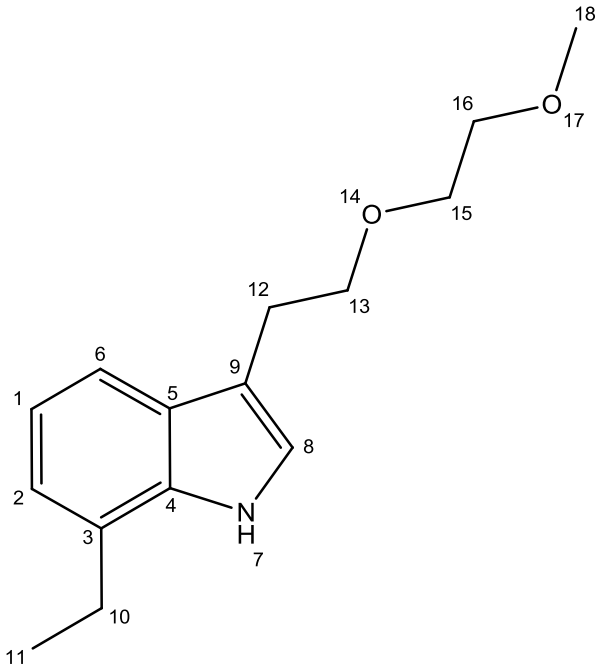


Slika 4.16. Kromatogram uzorka 2D4 rekromatografiranog na C18 koloni izokratno smjesom otapala CH_3CN/H_2O = 60/40 (*v/v*).



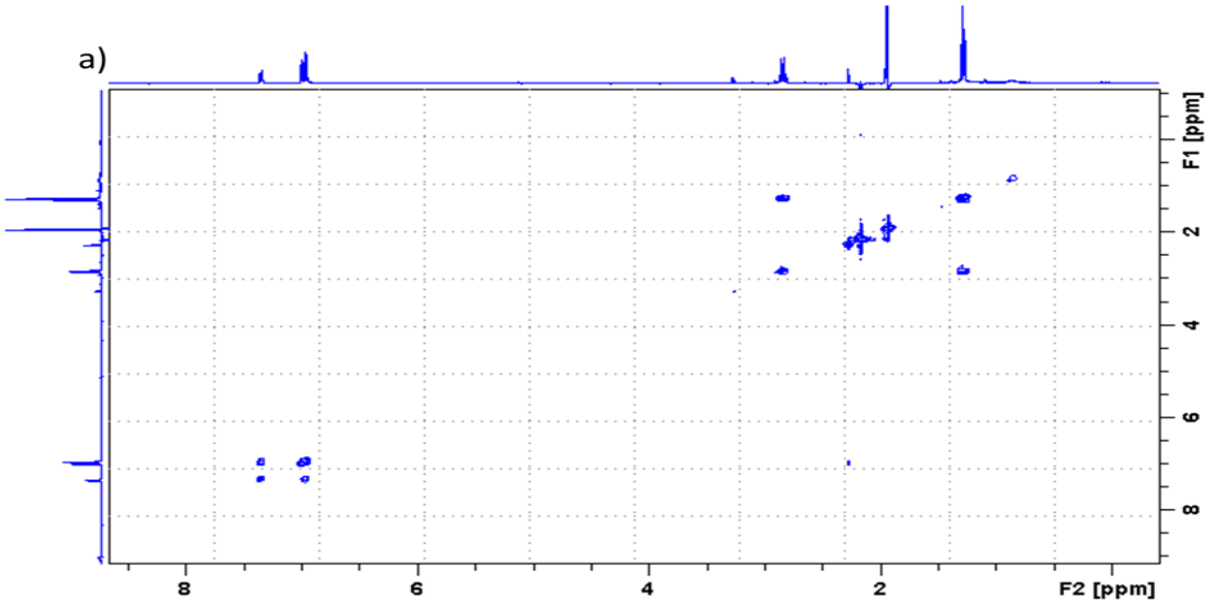
b)

c)

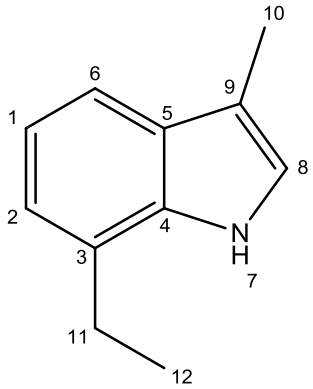


ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	6,96	119,99
2	6,98	121,03
6	7,40	117,21
7	9,12	-
8	7,08	122,98
10	2,84	24,92
11	1,28	14,56
12	2,96	26,50
13	3,68	72,12
15	3,47	70,60
16	3,56	72,61
18	3,29	58,79

Slika 4.17. a) spektar ^{1}H-^{13}C HSQC; b) struktura spoja 1C11; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 1C11 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.



b)

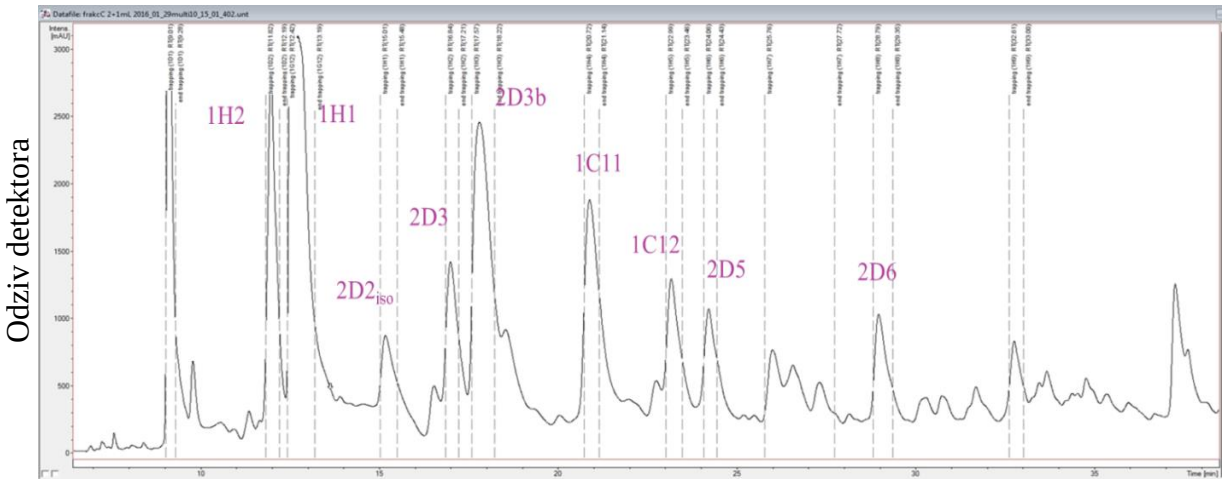


c)

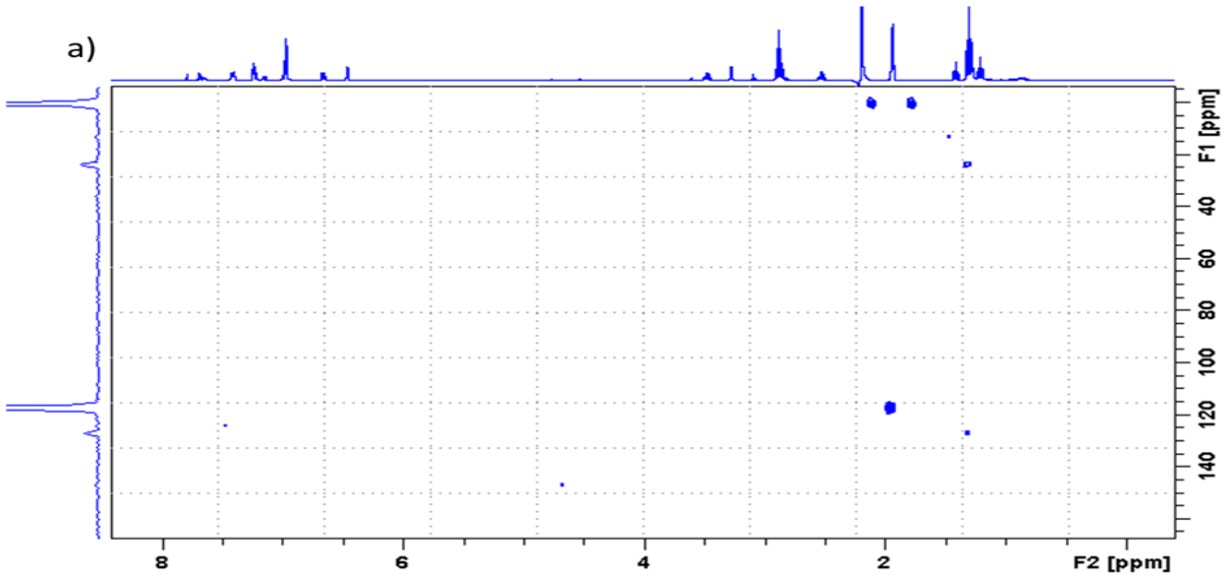
ATOM	δ/ ppm
	^{1}H
1	6,96
2	7,00
6	7,35
7	9,02
8	6,96
10	2,27
11	2,84
12	1,28

Slika 4.18. a) spektar COSY; b) struktura spoja 1C12; c) kemijski pomaci ^{1}H NMR za spoj 1C12 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

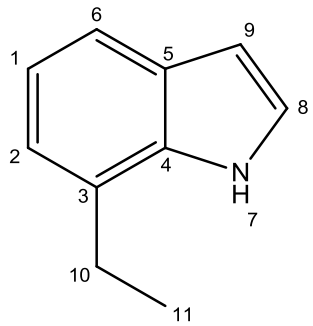
Spojevi 2D3 i 2D3b nisu se dobro odijelili na fenilnoj koloni, no puno bolje odjeljivanje je postignuto na C18 koloni tijekom analize frakcije 7-etiltriptofola koja je dobivena pročišćavanjem kolonskom kromatografijom (Slika 4.19.). Analizirana frakcija nije sadržavala glavnu komponentu, stoga je bilo moguće odrediti strukture spojeva 1H1, 2D3, 2D3b, 2D5 i 2D6. Reprezentativni spektri NMR i strukture navedenih spojeva prikazani su na slikama od 4.20. do 4.24. Spojevima 2D3, 2D3b i 2D5 snimljeni su spektri MS te su dobiveni molekulski ioni *m/z* = 185 za spoj 2D3, *m/z* = 187 za spoj 2D3b, odnosno *m/z* = 240 za 2D5.



Slika 4.19. Reprezentativni kromatogram frakcije.



b)

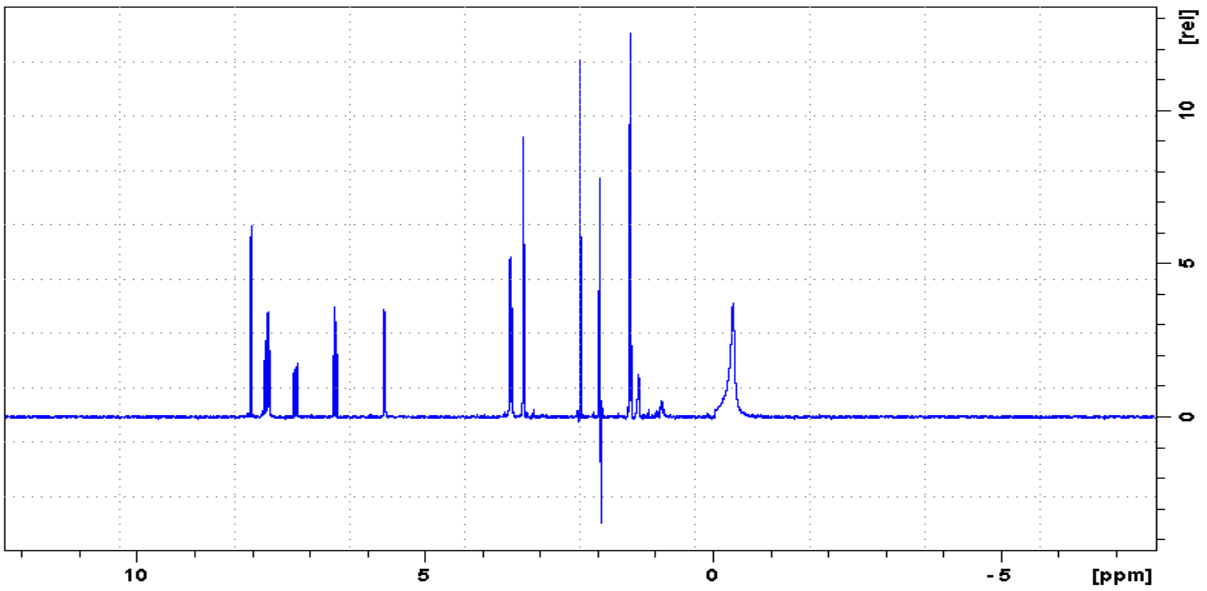


c)

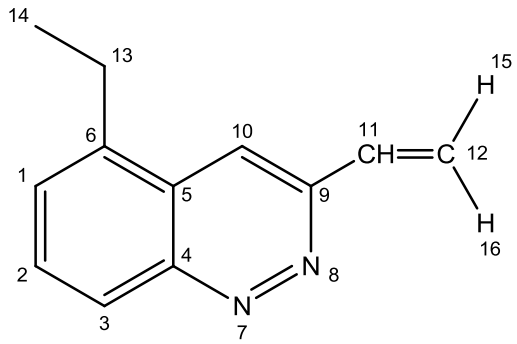
ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	6,97	120,80
2	6,98	120,20
6	7,41	118,90
7	9,34	-
8	7,24	125,20
9	6,46	102,60
10	2,87	25,06
11	1,30	14,56

Slika 4.20. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 1H1; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 1H1 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

a)



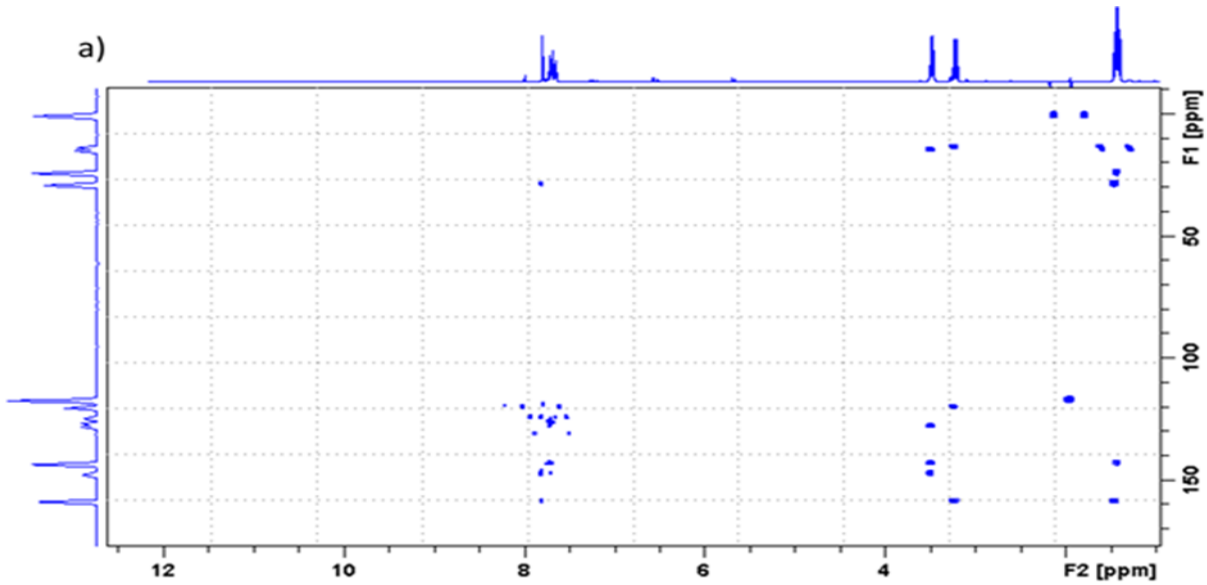
b)



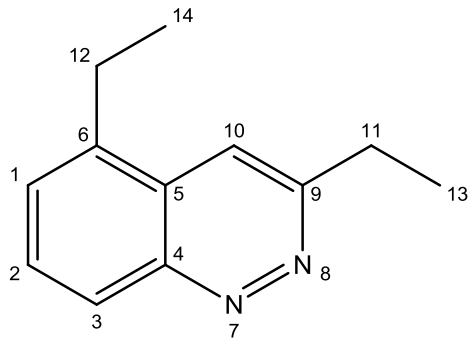
c)

ATOM	δ/ ppm
	^{1}H
1-3	7,64-7,68
10	8,05
11	7,23
13	3,49
14	1,42
15	5,68
16	6,54

Slika 4.21. a) spektar ^{1}H; b) struktura spoja 2D3; c) kemijski pomaci ^{1}H NMR za spoj 2D3 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.



b)

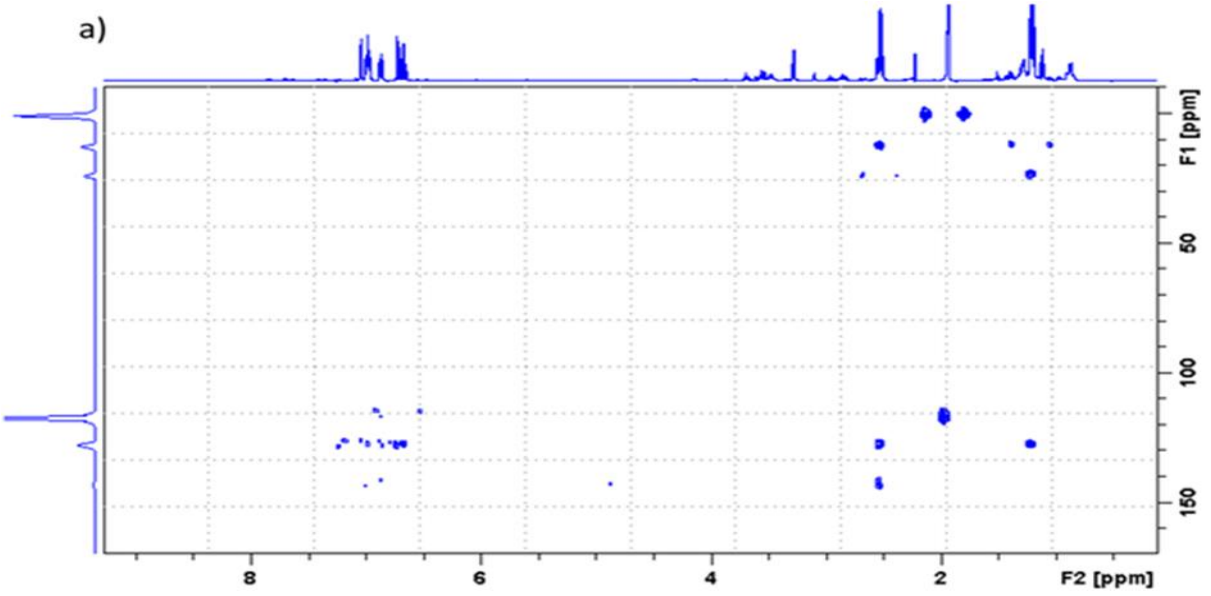


c)

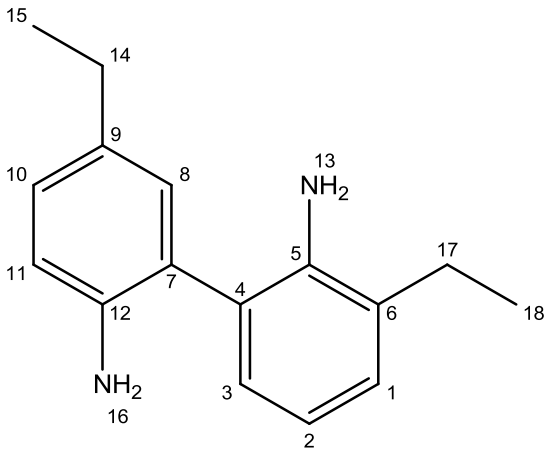
ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	7,65	129,01
2	7,68	132,18
3	7,70	125,54
4	-	147,61
5	-	-
6	-	143,30
9	-	158,89
10	7,79	121,27
11	3,21	29,73
12	3,49	24,90
13	1,44	14,47
14	1,41	15,63

Slika 4.22. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 2D3b; c) kemijski pomaci za ^{1}H i ^{13}C NMR spoj 2D3b snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

a)



b)

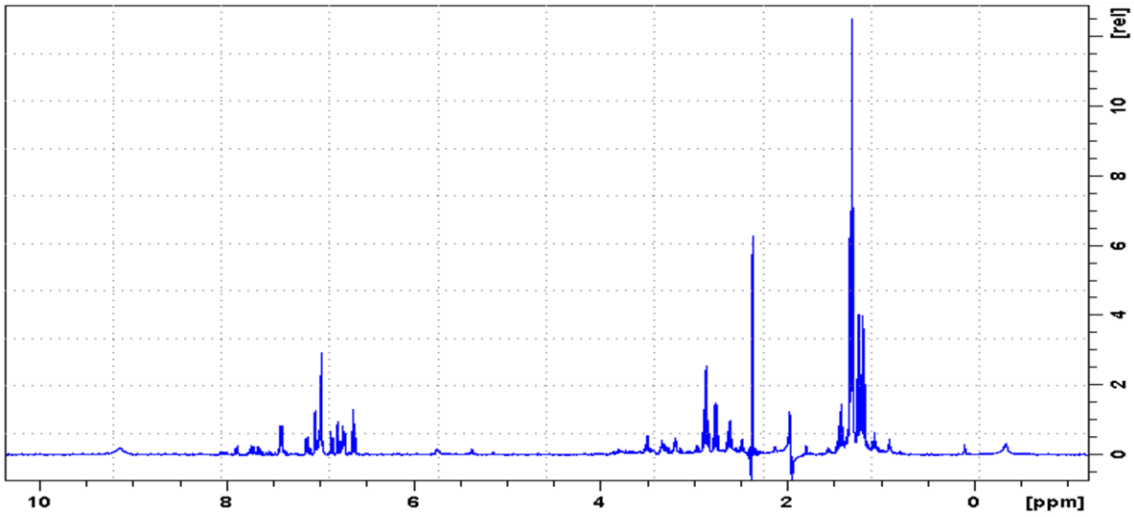


c)

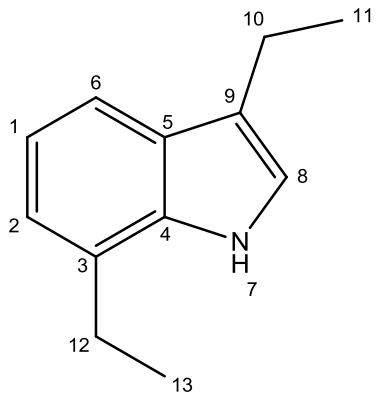
ATOM	δ/ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	6,86	128,79
2	6,66	118,41
3	6,96	127,94
5	-	142,27
6	-	127,90
9	-	127,90
10	6,98	127,94
11	6,72	116,03
12	-	144,54
14	2,52	24,93
15	1,22	13,59
17	2,52	24,93
18	1,19	13,19

Slika 4.23. a) spektar ^{1}H-^{13}C HMBC; b) struktura spoja 2D5; c) kemijski pomaci ^{1}H i ^{13}C NMR za spoj 2D5 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

a)



b)

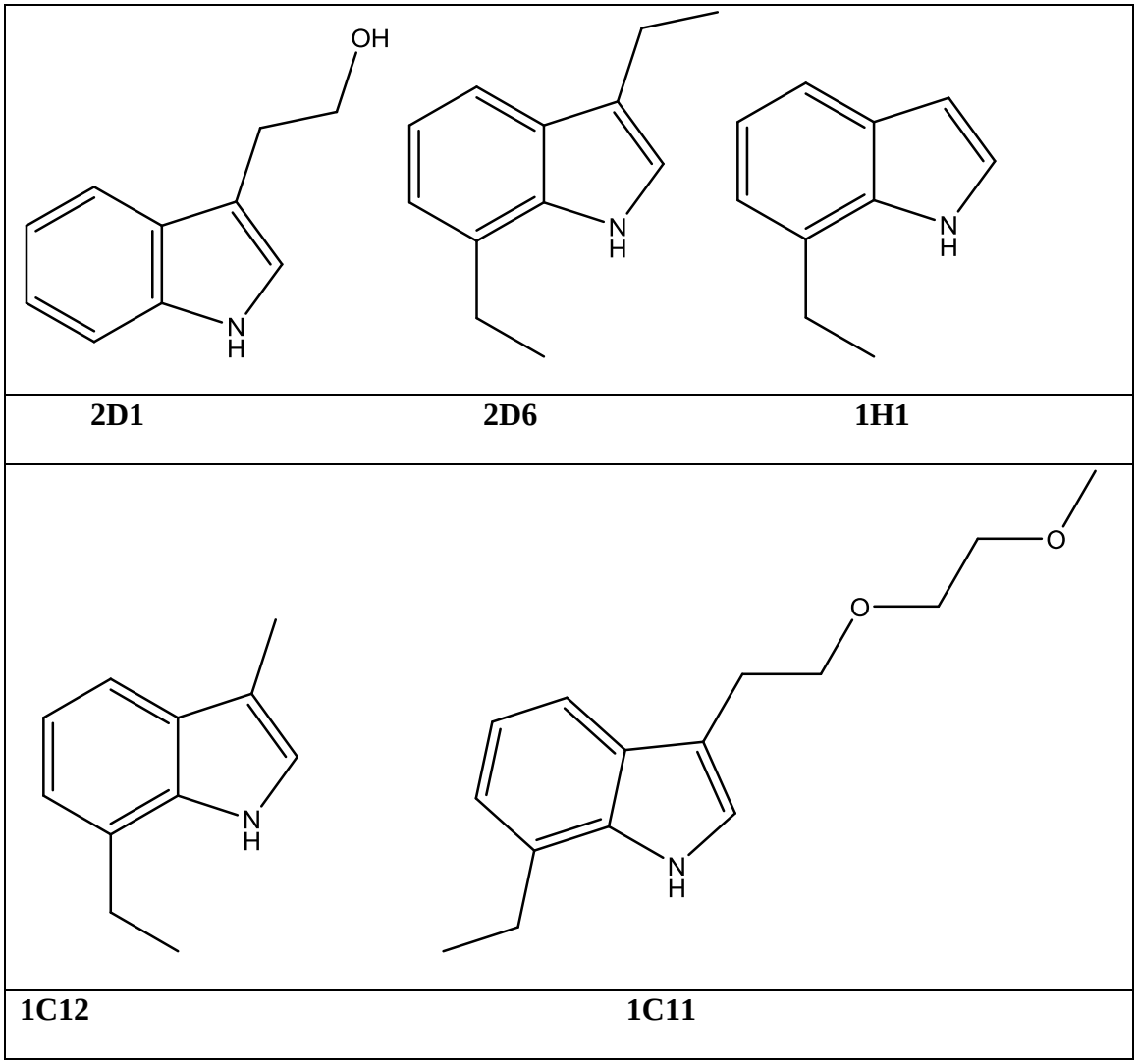


c)

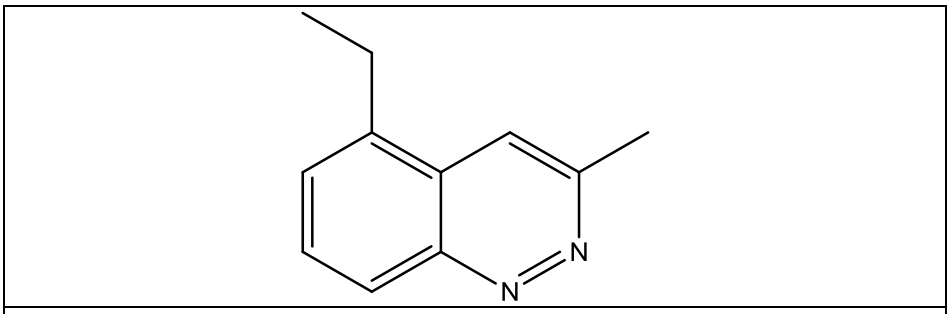
ATOM	δ/ ppm
	^{1}H
1- 2	6,98– 6,99
6	7,42
7	9,13
8	7,05
10	2,77
11	1,31
12	2,87
13	1,31

Slika 4.24. a) spektar ^{1}H NMR; b) struktura spoja 2D6; c) kemijski pomaci ^{1}H NMR za spoj 2D6 snimljen u acetonitrilu-d3 pri 25 °C.

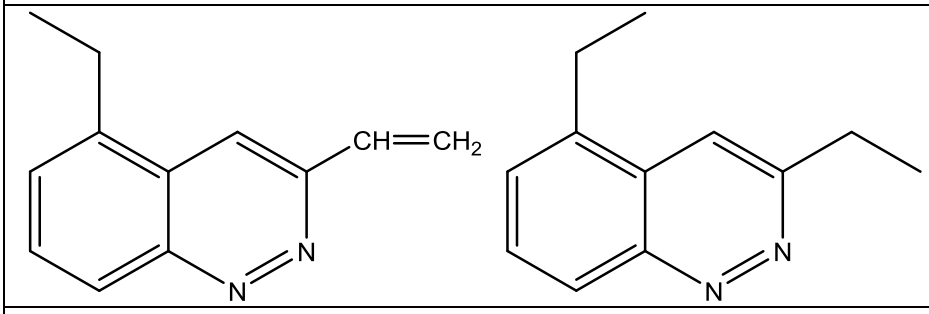
Tehnikom LC-SPE / krio NMR u uzorku 7-etiltriptofola identificirano je 13 spojeva koji se mogu svrstati u 6 skupina, a to su: derivati indola (Slika 4.25), derivati cinolina (Slika 4.26), derivat bifenila (Slika 4.27), derivat karbazola (Slika 4.28.), derivat anilina (Slika 4.29.) i derivat azobenzena (Slika 4.30.) .



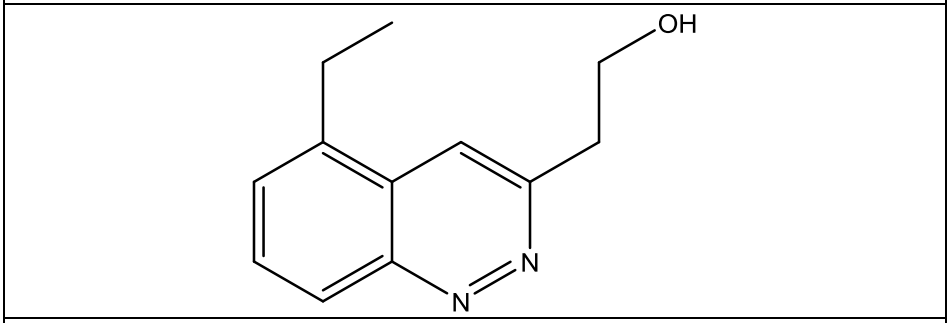
Slika 4.25. Derivati indola.



2D2

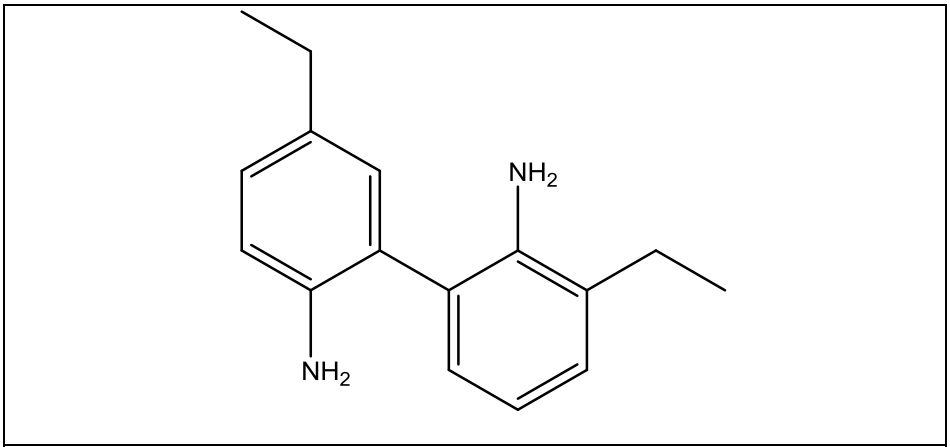


2D3 **2D3b**



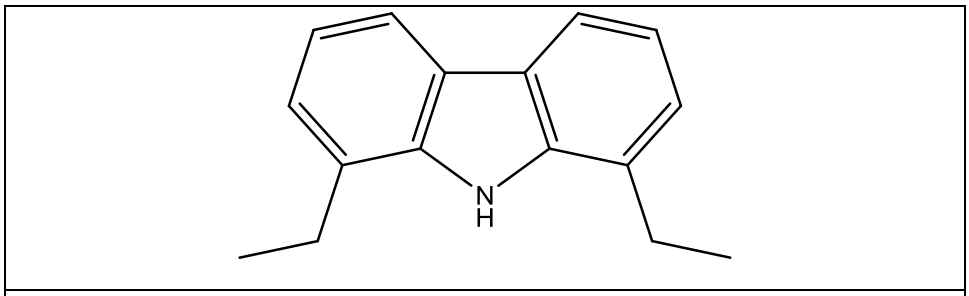
1B3

Slika 4.26. Derivati cinolina.



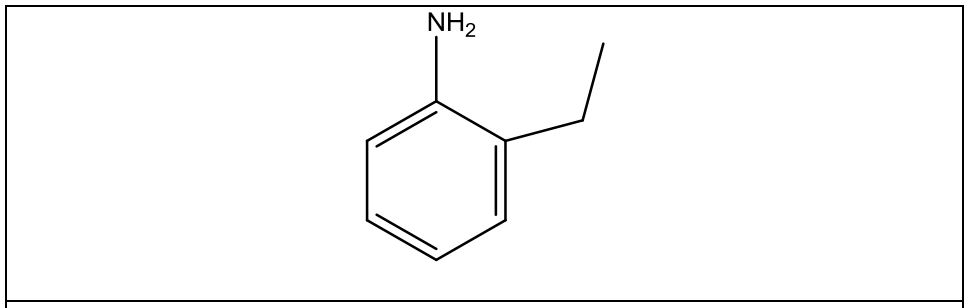
2D5

Slika 4.27. Derivat bifenila.



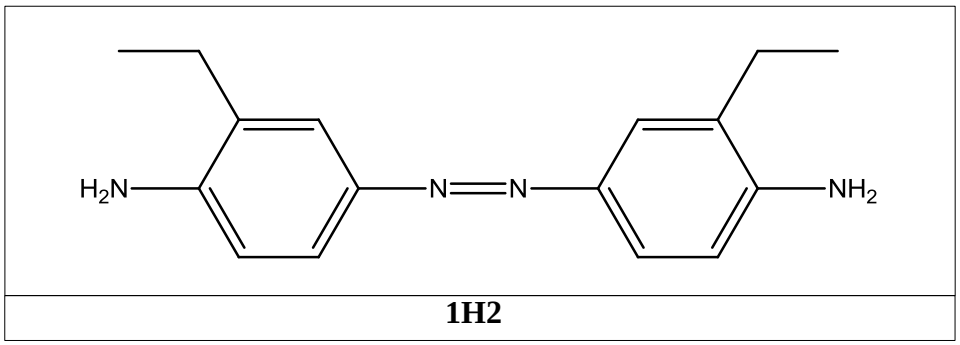
2D8

Slika 4.28. Derivat karbazola.



1B2

Slika 4.29. Derivat anilina.



1H2

Slika 4.30. Derivat azobenzena.

ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

1. Za učinkovito odjeljivanje onečišćenja u uzorku 7-etiltriptofola najboljim se pokazala kombinacija izokratnog i gradijentnog načina eluiranja pokretnom fazom metanol/fosfatni pufer pH 7 na koloni Waters Xbridge Phenyl (150 mm x 4,6 mm; 3,5 μm), stoga su ovi uvjeti izabrani za LC-SPE analizu. Osim fenilne kolone istražena je i C18 kolona te pokretna faza acetonitril/acetatni pufer pH 4.

2. Analizom uzoraka 7-etiltriptofola LC-SPE/krio NMR tehnikom, te uzorka pročišćenog kolonskom kromatografijom koji nije sadržavao glavnu komponentu, određene su strukture 13 različitih spojeva čija je zastupljenost u uzorcima bila u rasponu od 0,5 % do 5 %. Za višestruko skladištenje spojeva najučinkovitije su bile C18 SPE-kolone i kolone s poli(divinil-benzenskim) punilom.

3. Metodologija LC-SPE/krio NMR pokazala se kao brza i učinkovita tehnika koja omogućuje analizu složenih smjesa i određivanje strukture nepoznatih sastojaka zastupljenih u niskim koncentracijama u uzorku. Za uspješnu analizu je potrebno pronaći optimalne kromatografske uvjete koji će omogućiti učinkovito odjeljivanje spojeva, a zatim odabrati uvjete za uspješnu ekstrakciju analita na SPE-koloni.

LITERATURNI IZVORI

6. LITERATURNI IZVORI

1. O. Corcoran, M. Spraul, LC-NMR-MS in drug discovery, *DDT*, **8** (2003) 624-631

[2] S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69** (2012) 148-173

3. P. Novak, P. Tepeš, M. Ilijaš, I. Fistrić, I. Bratoš, Amir Avdagić, V. Gabelica Marković and Miljenko Dumić, LC-NMR and LC-MS identification of an impurity in a novel antifungal drug icofungipen, *J. Pharm. Biomed. Anal*., **50** (2009) 68-72

4. A. A. Gouda, W. S. Hassan, Spectrophotometric determination of etodolac in pure form and pharmaceutical formulations, *Chem Cent J*. **14** (2008), 2-7

5. http://www.medicinenet.com/etodolac/article.htm

6. A. Skwarecki, Synthesis of disubstituted 1,3,4,9-tetrahydropyrano-[3,4-b] indole-1-acetic acids derivatives, *PhD Interdisciplinary Journal* (2013) 75-78.

7. M. C. Sekharayyaa, G. V. Narayanab, S. Nigama, G. Madhusudhan, An improved and scalable process for the synthesis of a key intermediate for Etodolac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, *IJC-B* **51B** (2012) 1763-1766

8. V. R. Patel, H. T. Desai, An optimized process for the synthesis of a key starting material for etodolac, a non steroidal anti-inflammatory drug, *IOSR-JAC*, 2013, **4**: 5, 03-05

9. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptophol#section=Top

10. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Zagreb, 2006.

11. J. T. Ribarska, A. Haxhiu, Z. Sterjev, G. Kiteva, Lj. Suturkova, S.T. Jolevska, Development and validation of a bioanalytical LC-UV method with solid-phase extraction for determination of valproic acid in saliva, *Acta Pharm.*, **62** (2012) 211–220

12. J. R. Dean, Extraction Techniques in Analytical Sciences, WILEY, 2009, str. 49-53

13. N.T. Nyberg, H. Baumann, L. Kenne, Application of solid-phase extraction coupled to an NMR flow-probe in the analysis of HPLC fractions, *Magn. Reson. Chem.*, **39** (2001), str. 236-240

14. P. Novak, T. Jednačak, Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013. (str. 5-13)

15. Z. Meić, Nuklearna magnetna rezonancija ili kako sićušni magneti izvode velike stvari (http://ljskola.hfd.hr/arhiva/1996/meic/zlatko.pdf)

16. K. Pičuljan, T. Jednačak, N. Cindro, P. Novak, Osnovni priručnik za rad sa spektrometrom NMR visoke rezolucije (skripta za internu upotrebu), Zagreb, 2016.

17. N. Watanabe, E. Niki, Direct-coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography, *The Proceedings of the Japan Academy*, Ser. B **54**(1978) 194-199

18. M. Dachtler, T. Glaser, K. Kohler, K. Albert, Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina, *Anal Chem*, **73** (2001) 667–674.

19. M. Godejohann, A. Preiss, C. Mugge, G. Wunsch, Application of on-line HPLC-1H NMR to enviromental samples: Analysis of groundwater near former ammunition plants, *Anal Chem*, **69** (1997) 3832–3837

20. V. Exarchou, M. Krucker, T.A. van Beek, J. Vervoort, I.P. Gerothanassis, K. Albert, LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis, *Magn. Reson. Chem.*, **43** (2005) 681–687

21. C. Seger, M. Godejohann, L.H. Tseng, M. Spraul, A. Girtler, S. Sturm, H.Stuppner, LC-DAD-MS/SPE-NMR hyphenation. A tool for the analysis of pharmaceutically used plant extracts: Identification of isobaric iridoid glycoside regioisomers from *harpagophytum procumbens*, *Anal Chem*, **77** (2005) 878–885.

22. M. Godejohann, L.H. Tseng, U. Braumann, J. Fuchser,M. Spraul, Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe. *J. Chromatogr. A*, **1058** (2004) 191–196

23. M.V.S. Elipe, Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique, *Anal. Chim. Acta*, **497** (2003), 1-25

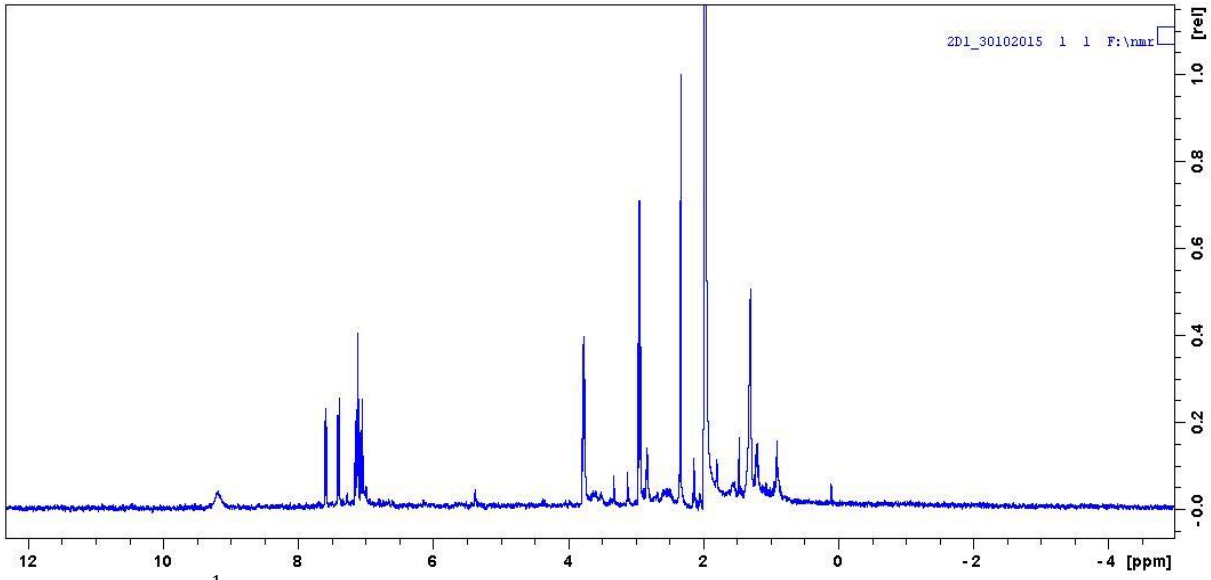
24. D. Djukovic, E. Appiah-Amponsah, N. Shanaiah, G.A.N.Gowda, I. Henry, M. Everly, B. Tobias, D. Raftery, Ibuprofen metabolite profiling using a combination of SPE/column-trapping and HPLC-micro-coil NMR, *J Pharm Biomed Anal*, **47** (2008) 328-334

25. J.Fang, M.Kai, B.Schneider, Phytochemical profile of aerial parts and roots of *Wachendorfia thyrsiflora L.* Studied by LC-DAD-SPE-NMR, *Photochemistry*, **81** (2012) 144-152

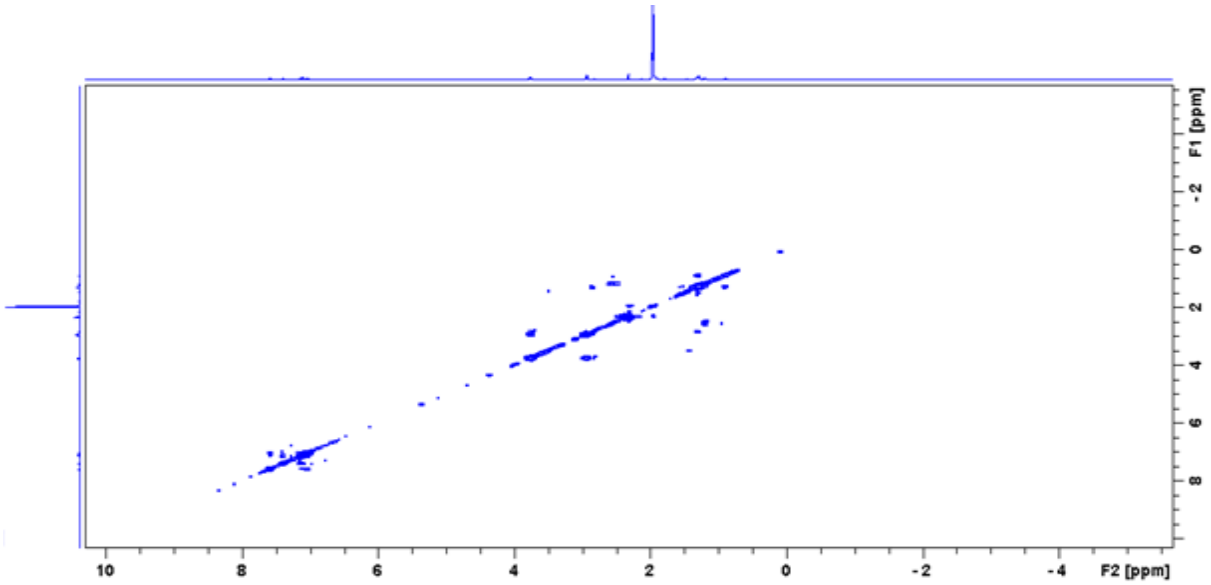
26. V. Exarchou, M. Godejohann, T. A. van Beek, I. Gerothanassis, J. Vervoort, LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and Its Application to the Identification of Compounds Present in Greek Orgeano, *Analitycal Chemistry*, **75**, 2003, 6288-6294

27. L.R.Snyder, J.J.Kirkland, J.L.Glajch, Practical HPLC method development, 2nd Edition, 1997, 21-57

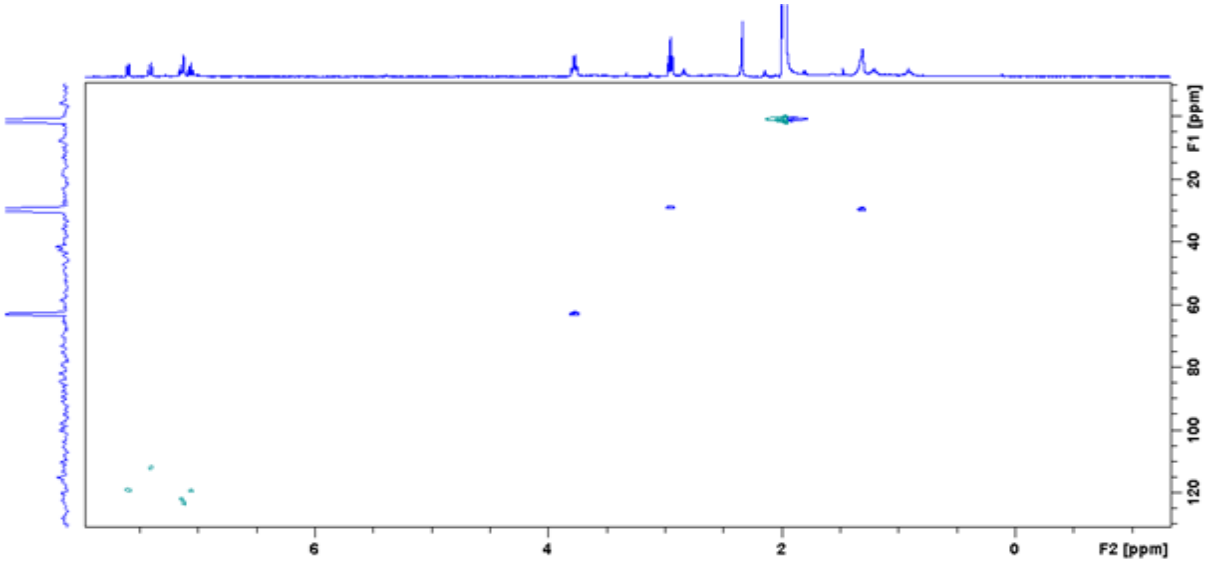
PRILOG



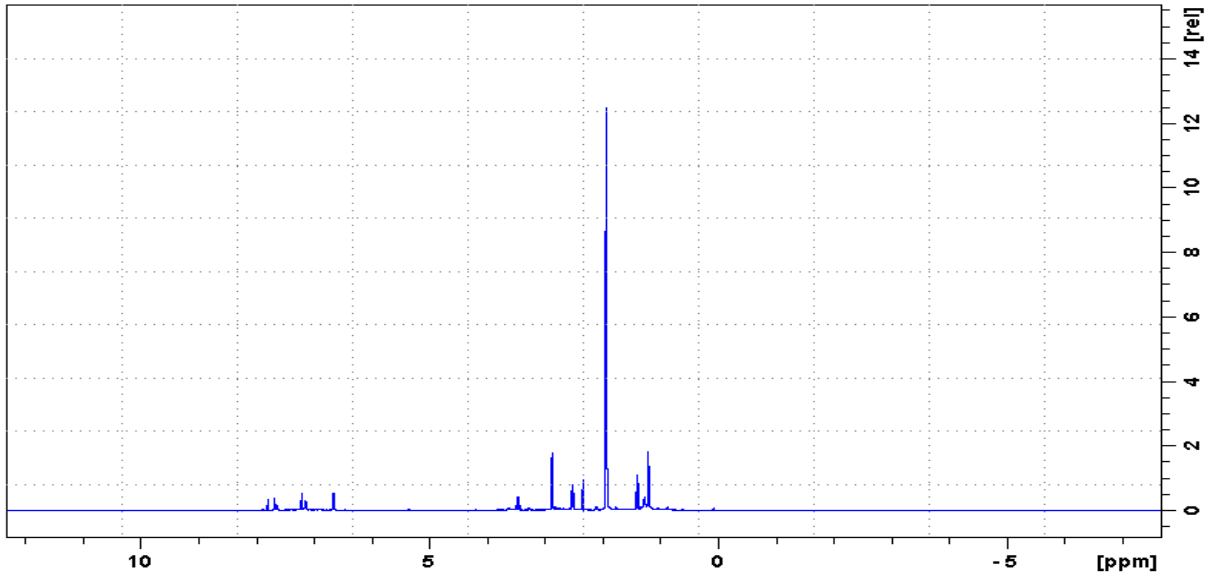
Slika 1. spektar ^{1}H NMR spoja 2D1.



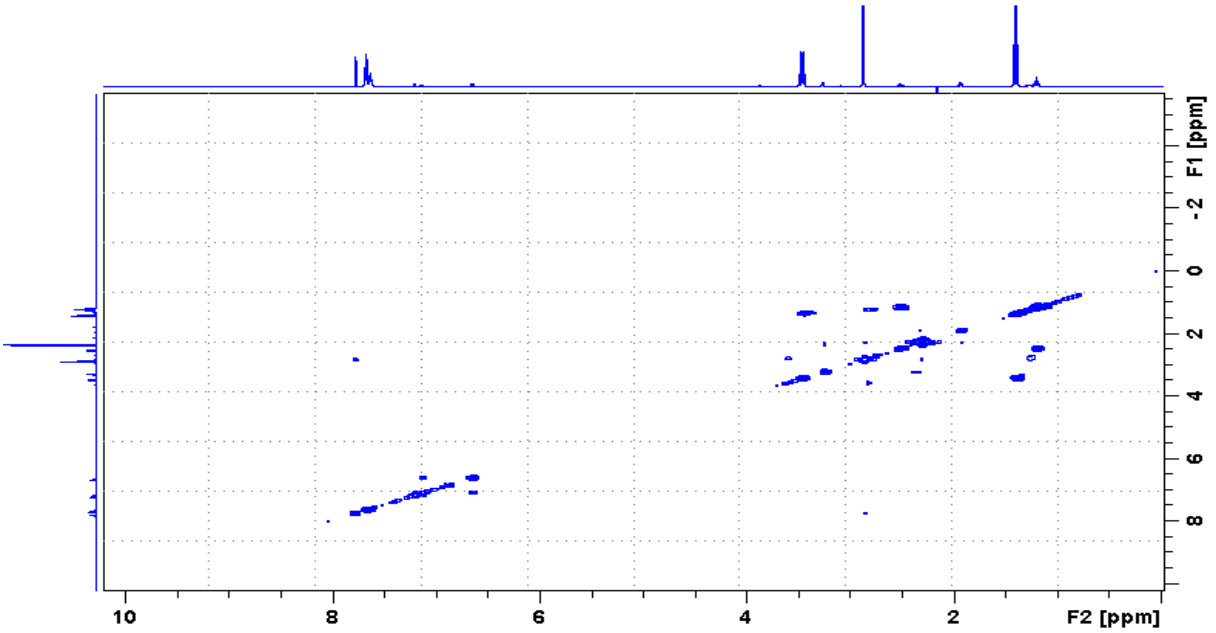
Slika 2. spektar COSY spoja 2D1.



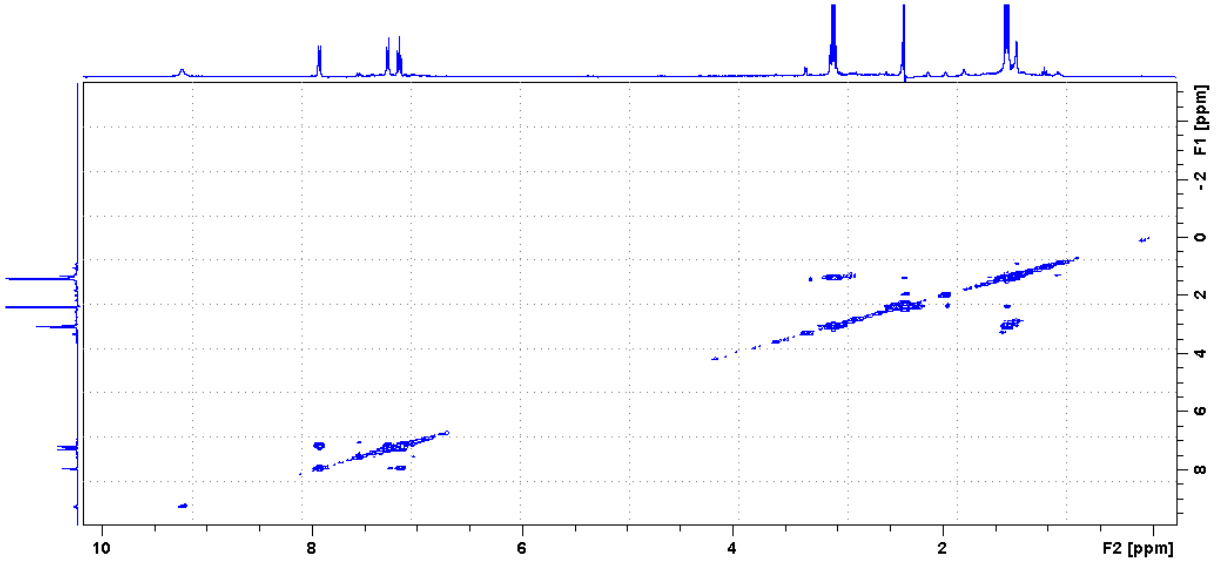
Slika 3. spektar ^{1}H-^{13}C HSQC spoja 2D1.



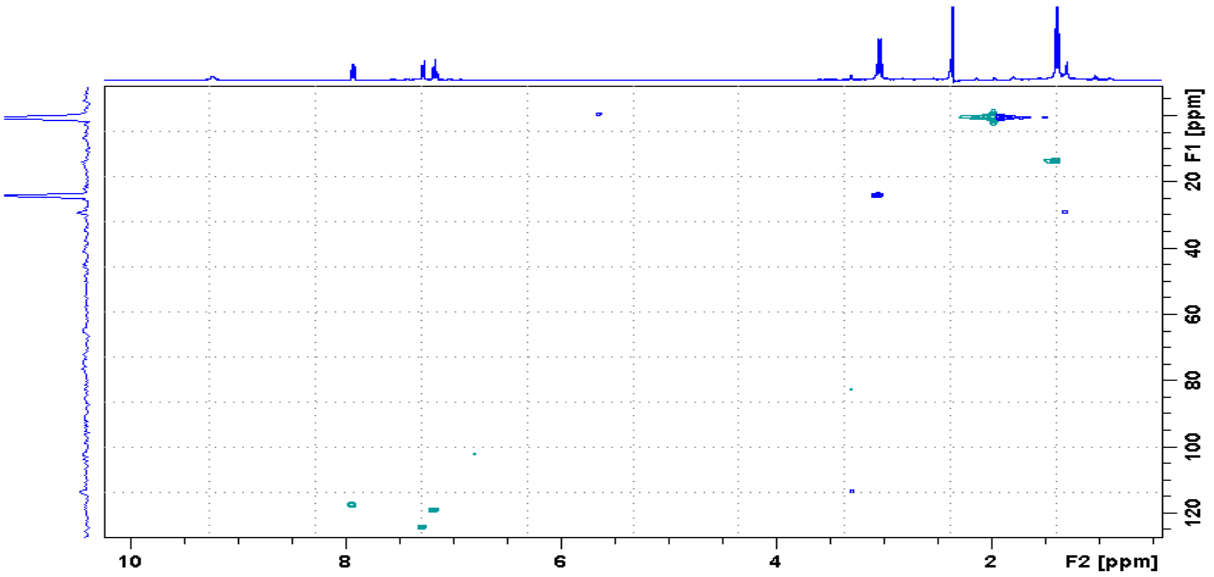
Slika 3. spektar ^{1}H NMR spoja 2D2.



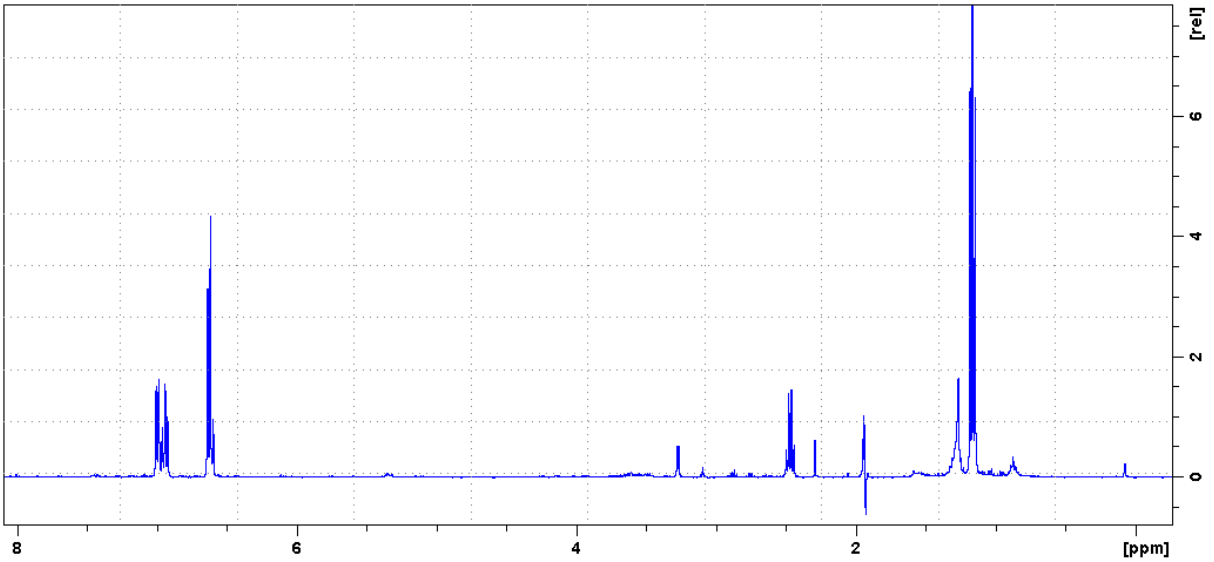
Slika 4. spektar COSY spoja 2D2.



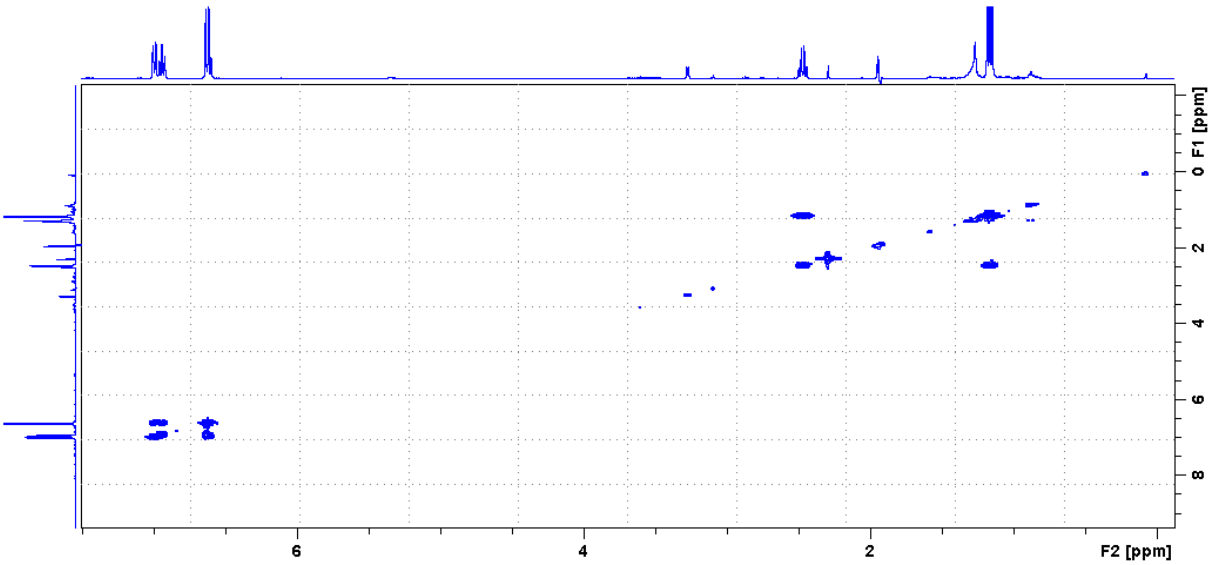
Slika 5. spektar COSY spoja 2D8.



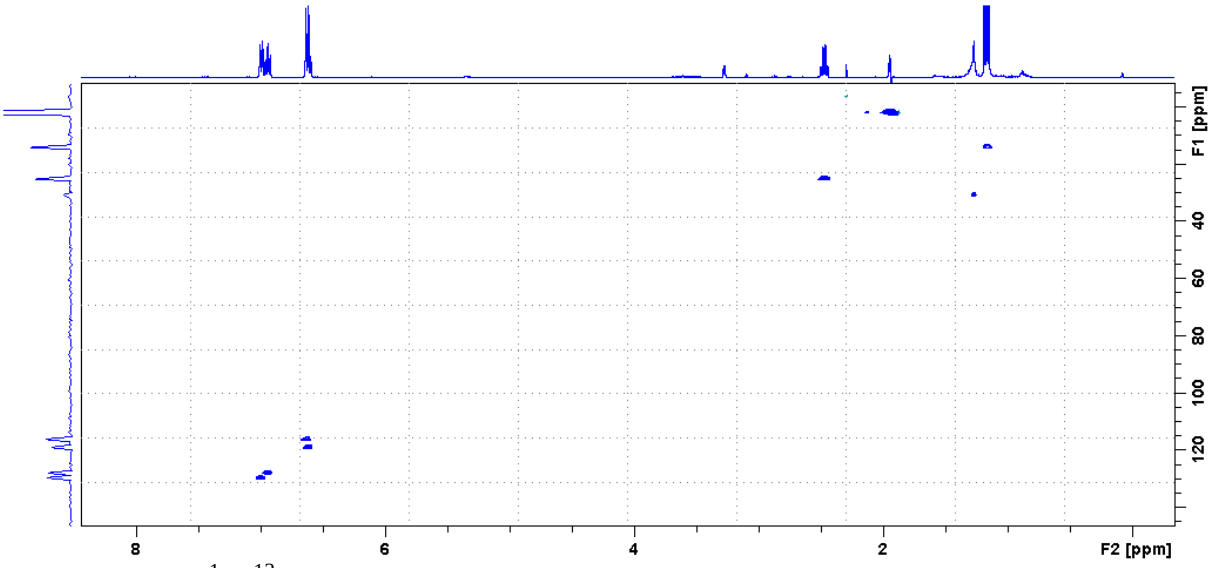
Slika 6. spektar ^{1}H-^{13}C HSQC spoja 2D8.



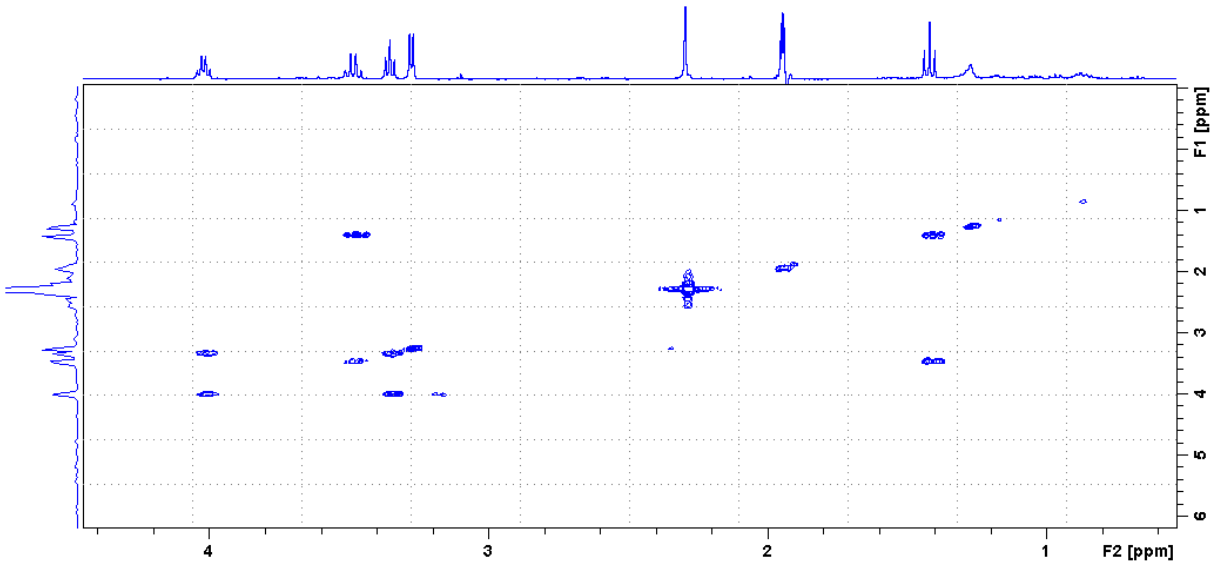
Slika 7. spektar ^{1}H NMR spoja 1B2



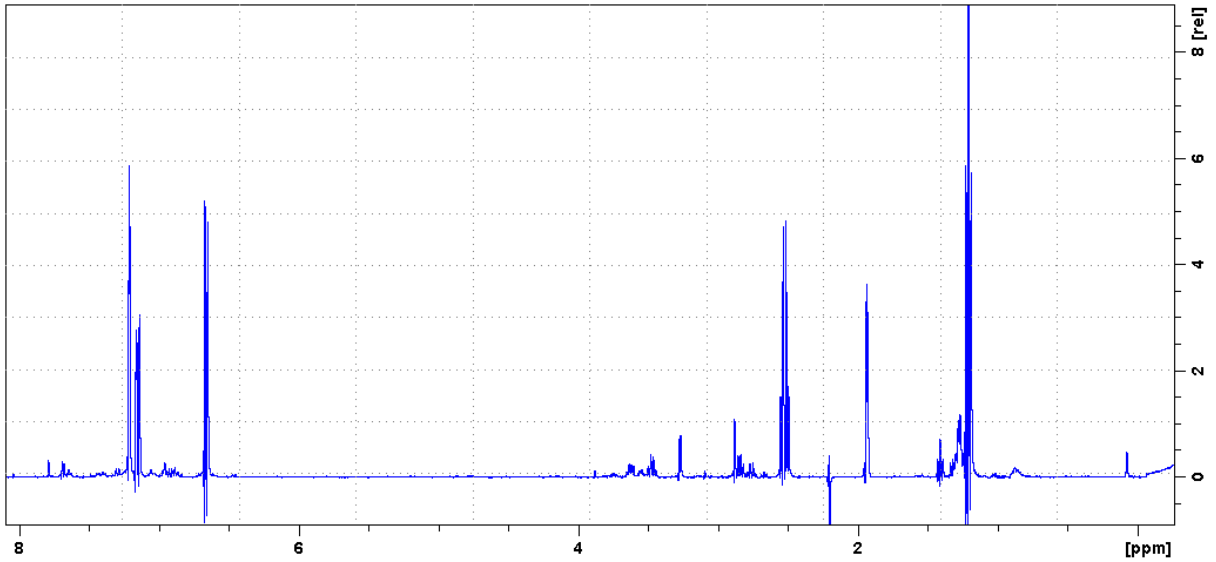
Slika 8. spektar COSY spoja 1B2.



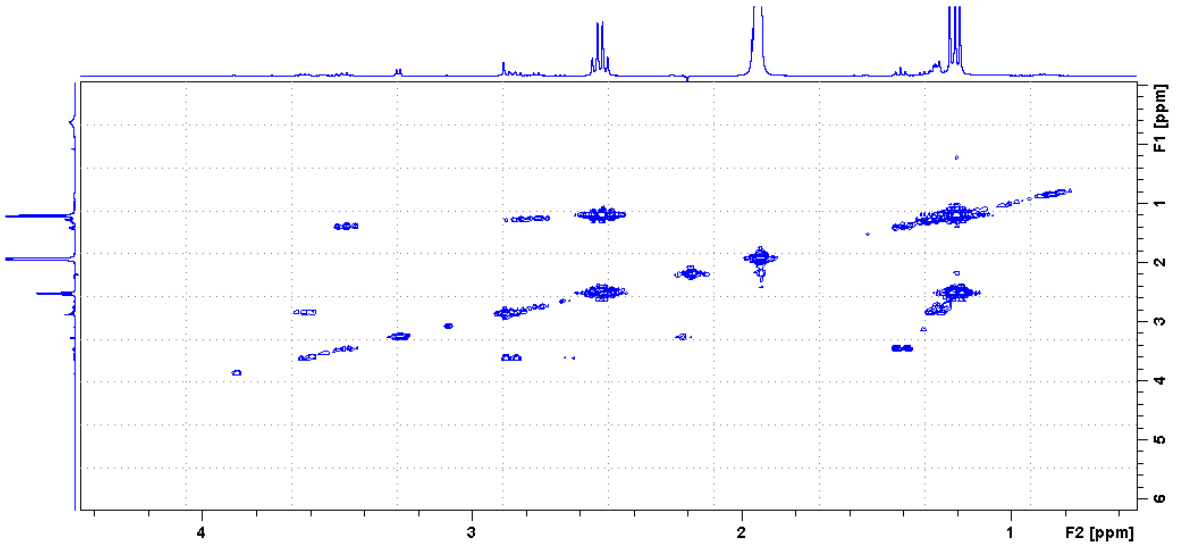
Slika 9. spektar ^{1}H-^{13}C HSQC spoja 1B2.



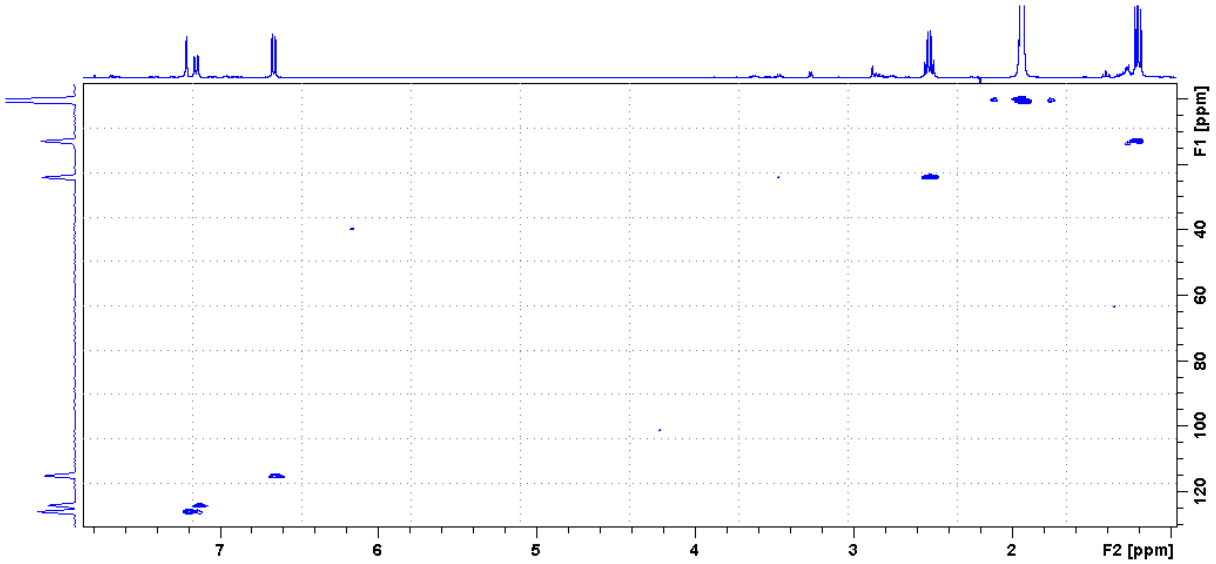
Slika 10. spektar COSY spoja 1B3.



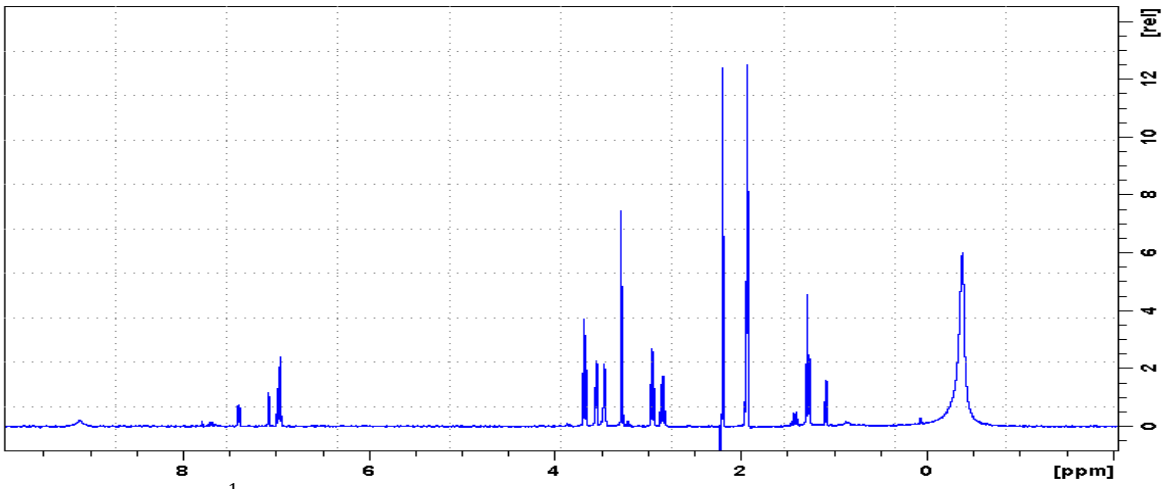
Slika 11. spektar ^{1}H NMR spoja 1H2.



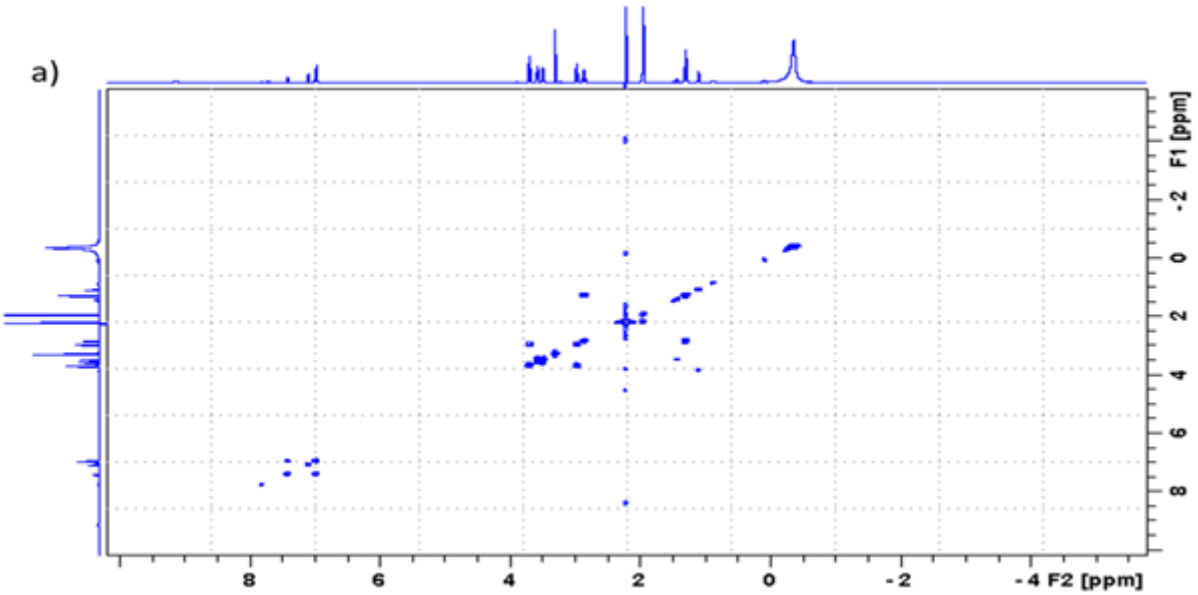
Slika 12. spektar COSY spoja 1H2.



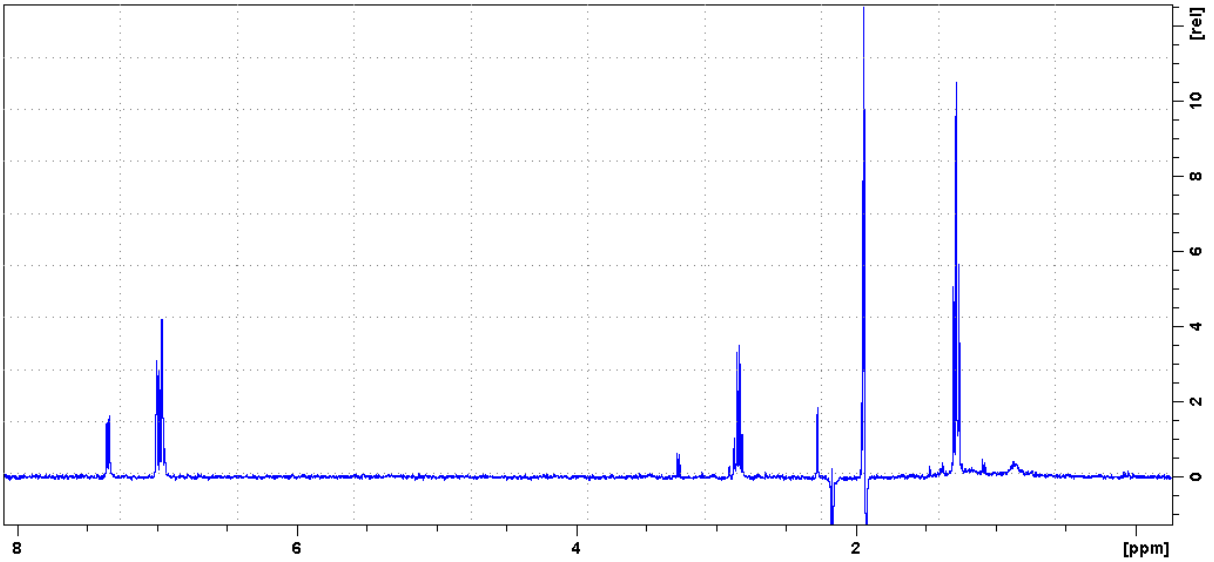
Slika 13. spektar ^{1}H-^{13}C HSQC spoja 1H2.



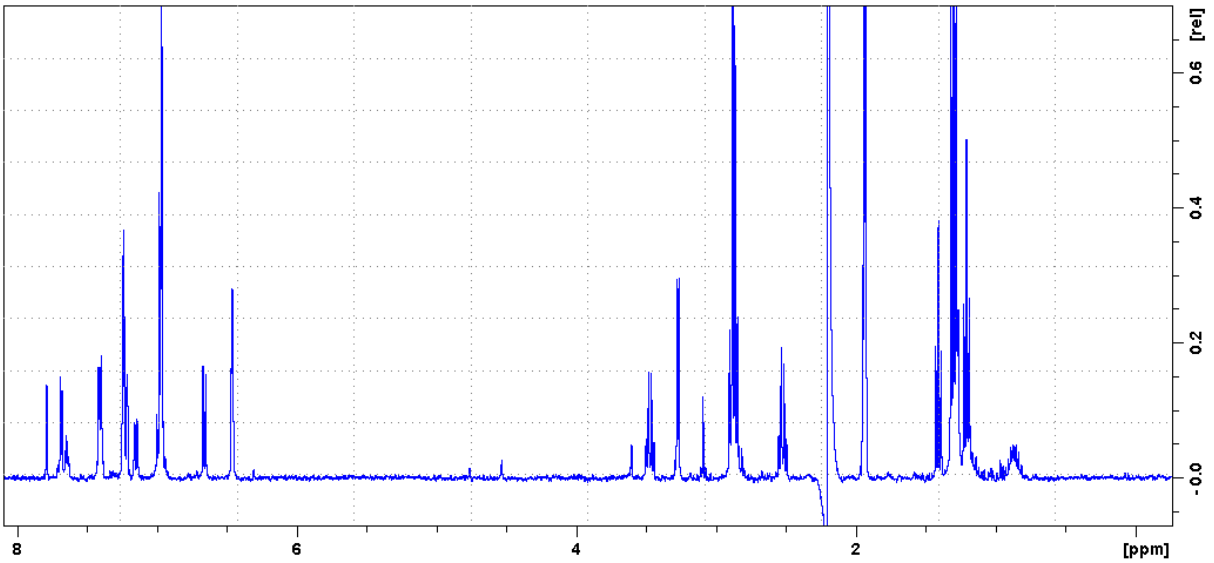
Slika 14. spektar ^{1}H NMR spoja 1C11.



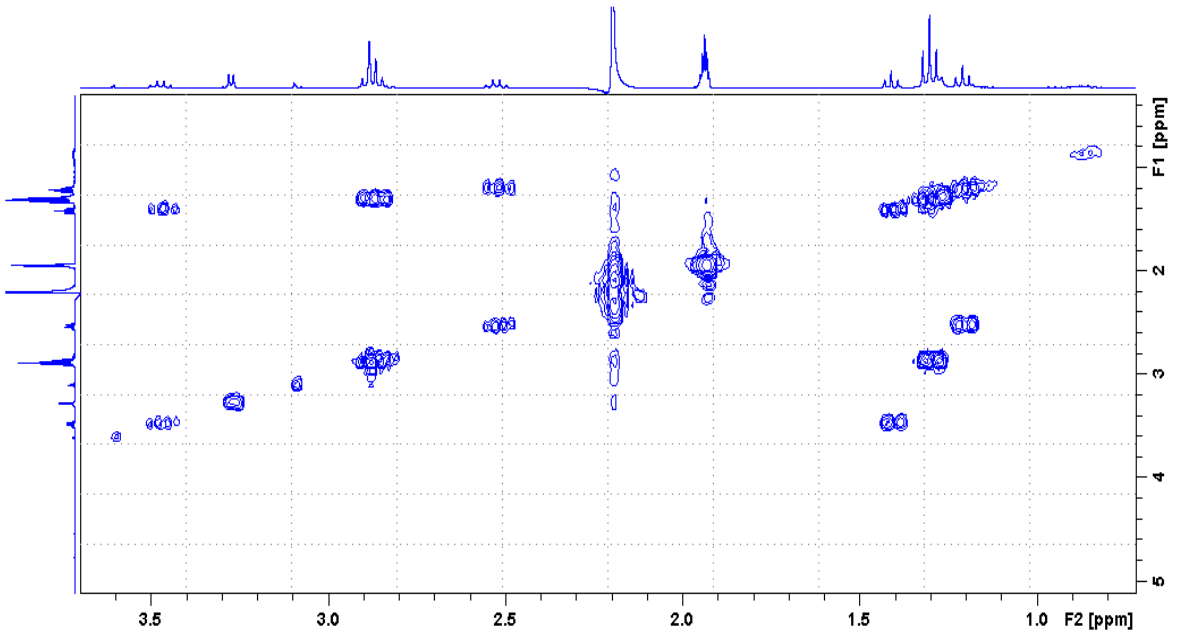
Slika 15. spektar COSY spoja 1C11.



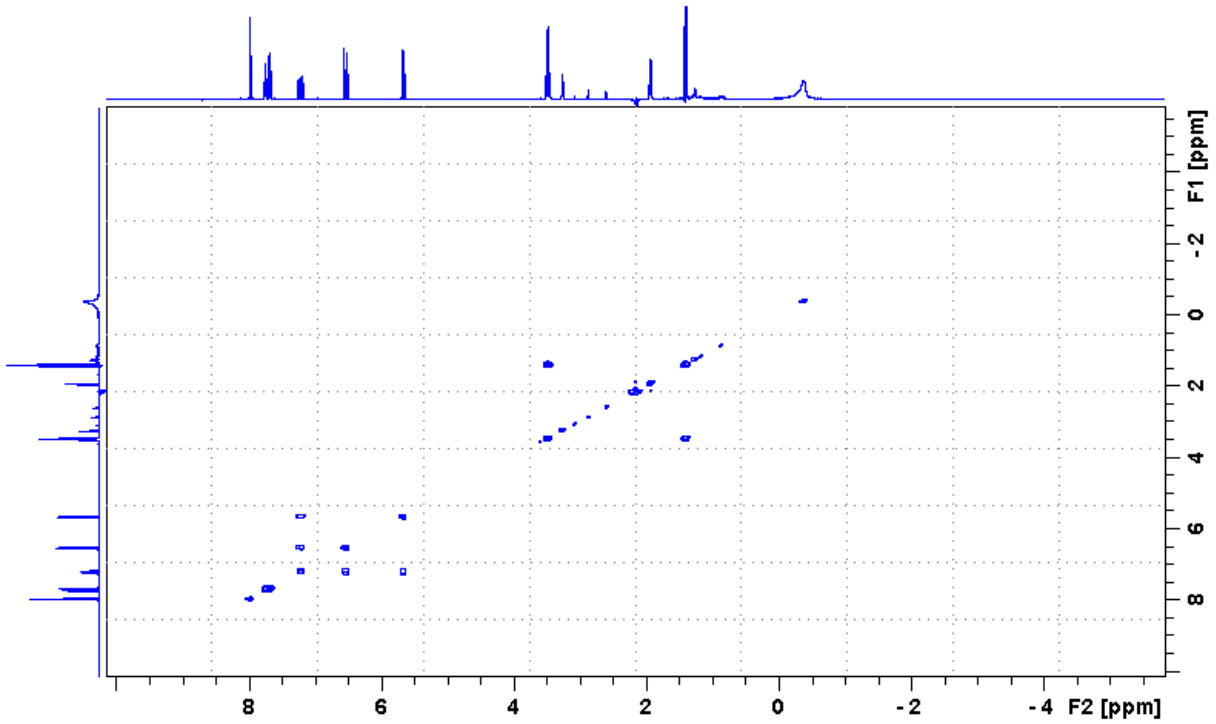
Slika 16. spektar ^{1}H NMR spoja 1C12.



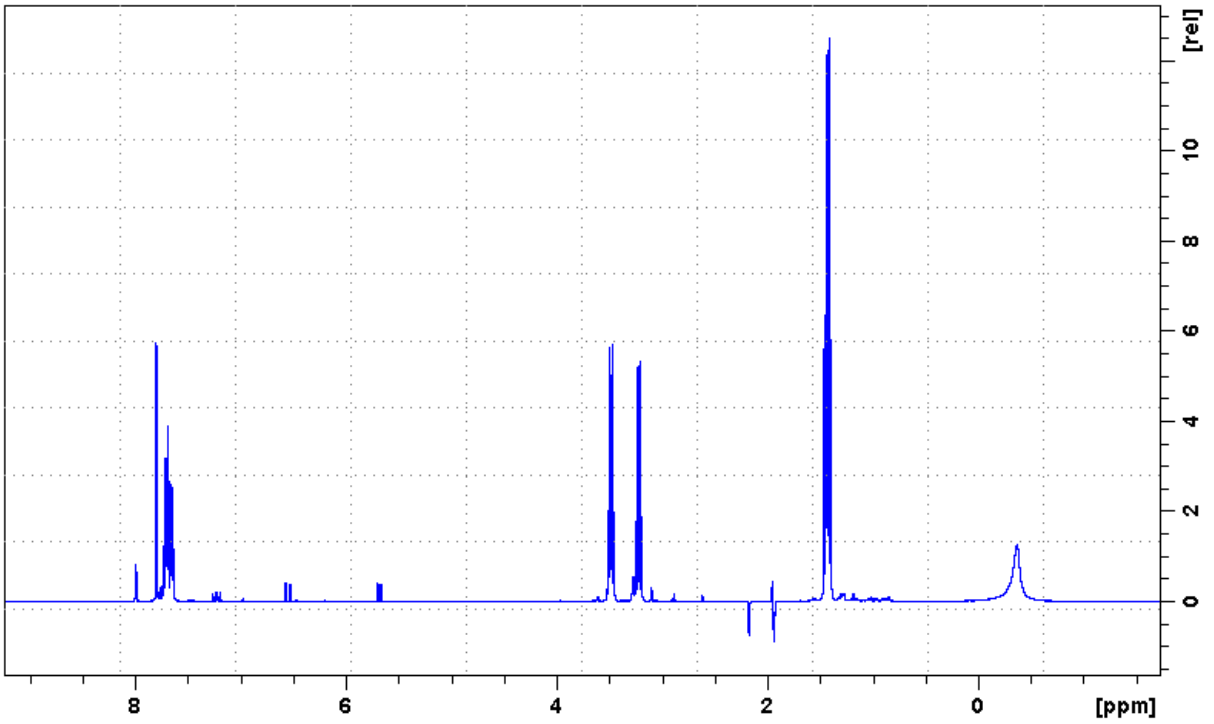
Slika 17. spektar ^{1}H NMR spoja 1H1.



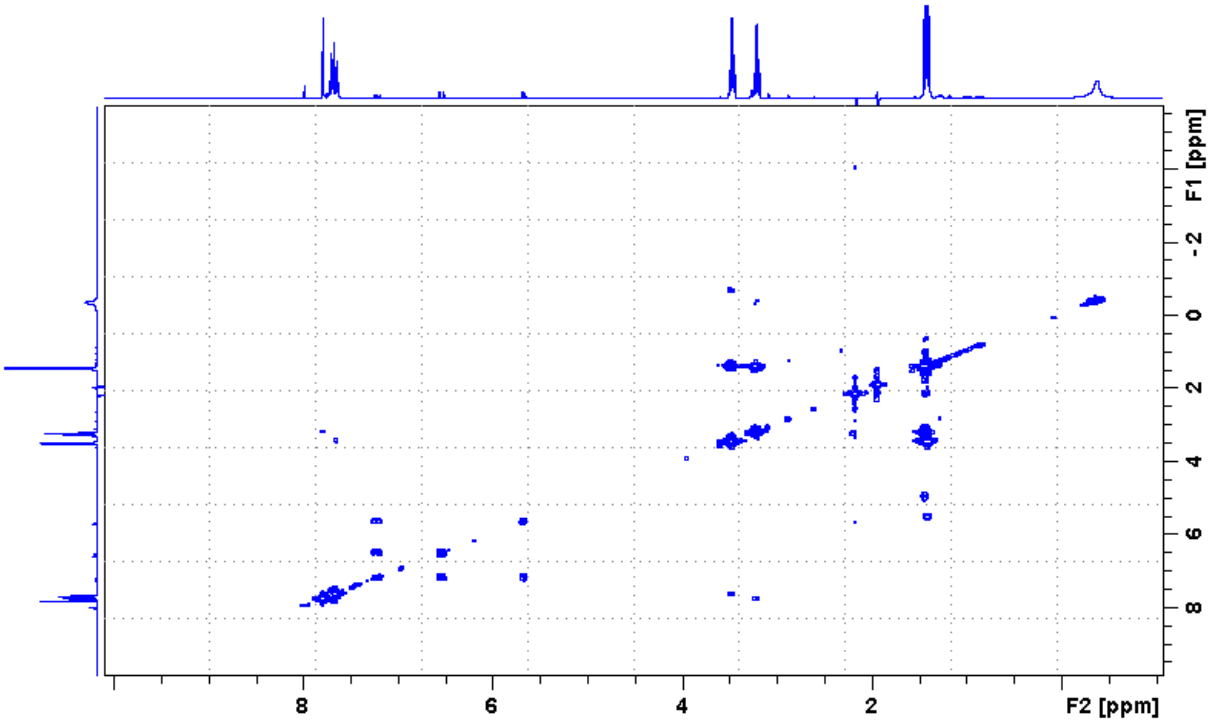
Slika 18. spektar COSY spoja 1H1.



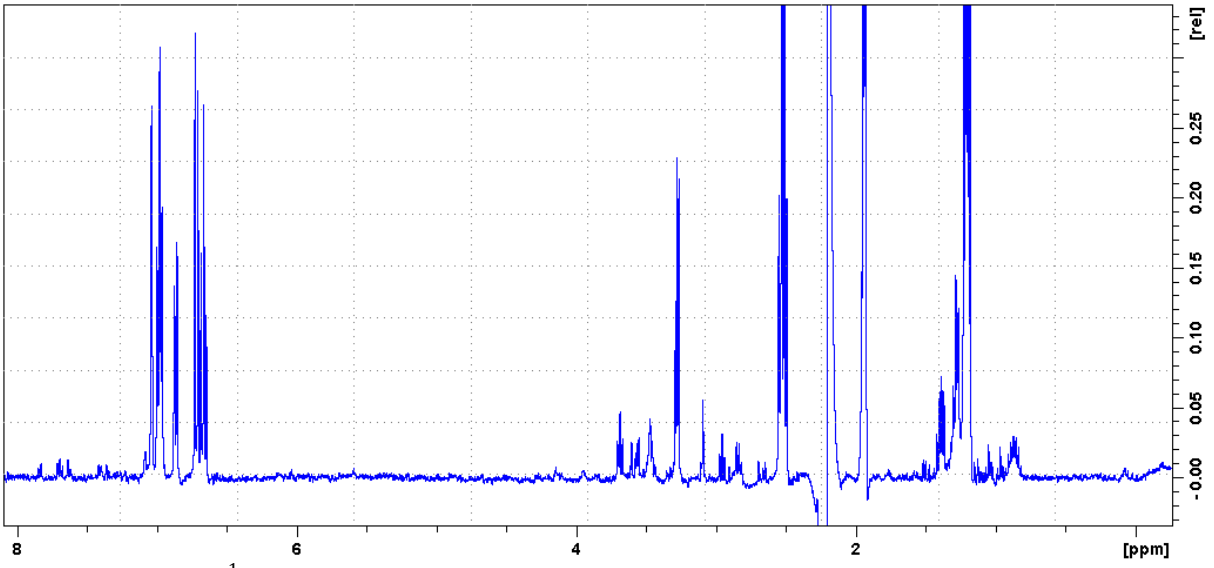
Slika 19. spektar COSY spoja 2D3.



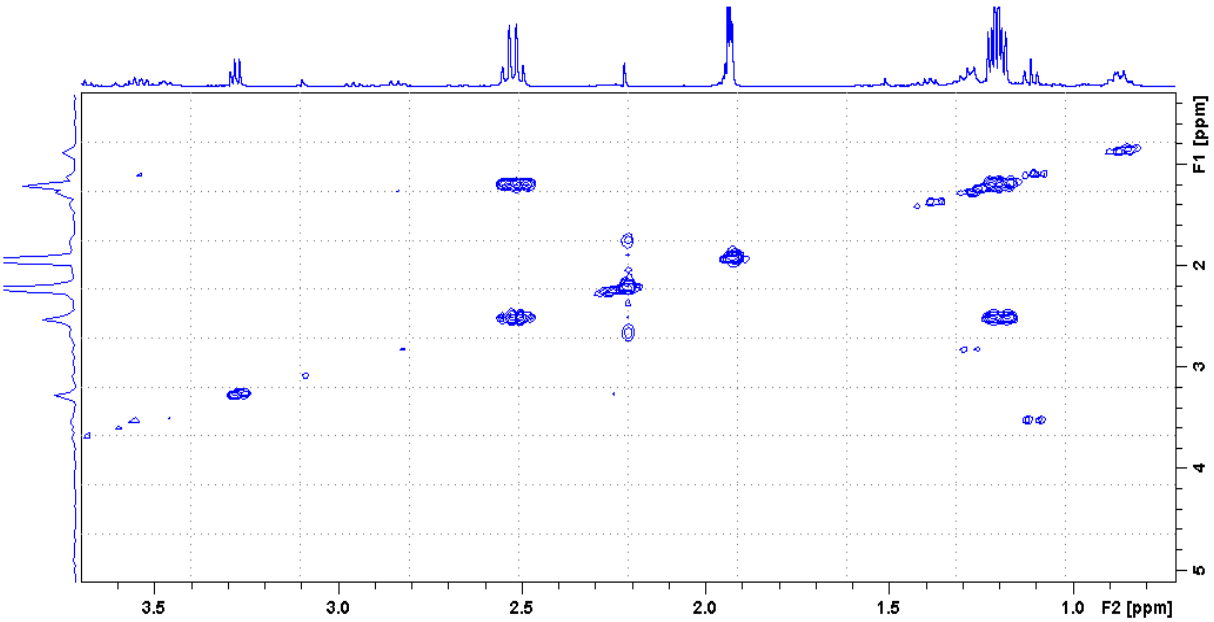
Slika 20. spektar ^{1}H NMR spoja 2D3b.



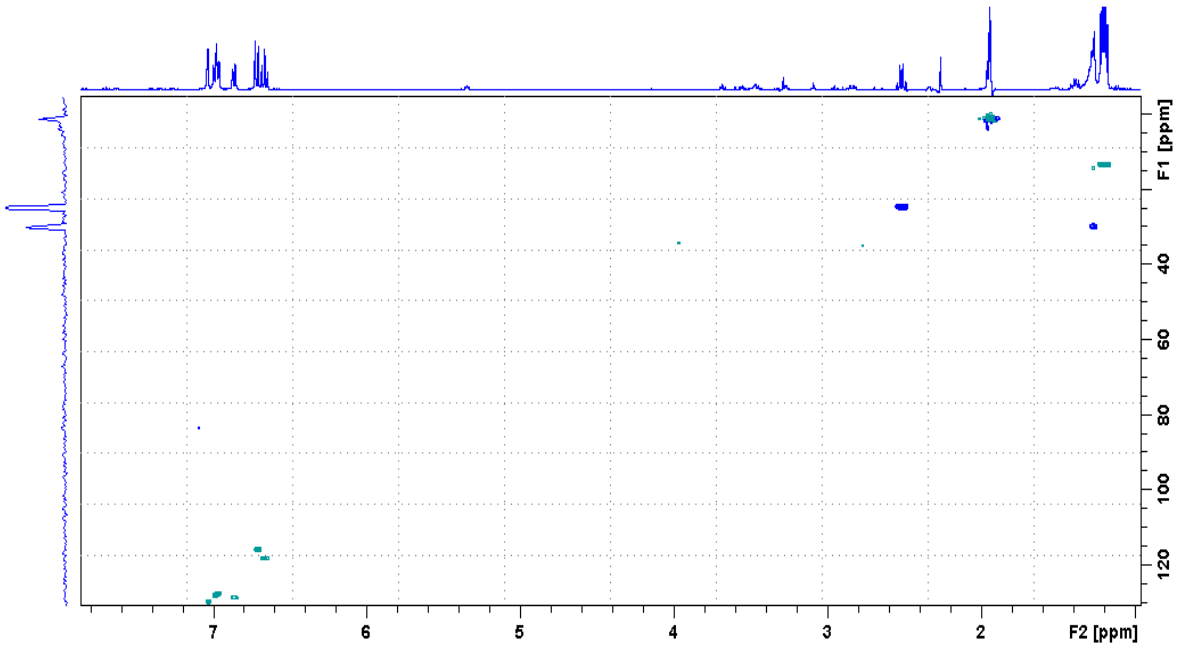
Slika 21. spektar COSY spoja 2D3b.



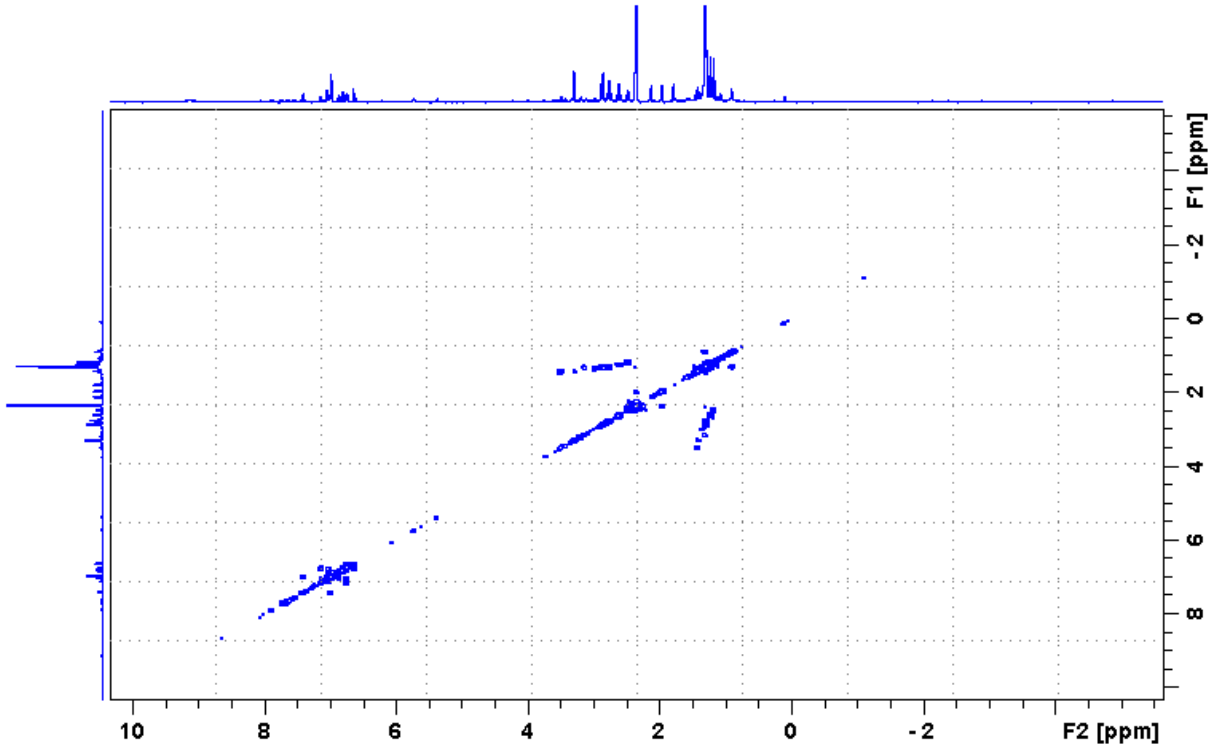
Slika 22. spektar ^{1}H NMR spoja 2D5.



Slika 23. spektar COSY spoja 2D5.



Slika 24. spektar ^{1}H-^{13}C HSQC spoja 2D5.



Slika 25. spektar COSY spoja 2D6.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18.02.1992. godine u Zagrebu. Živim u Ivanić-Gradu gdje sam završila osnovnu školu te Opću gimnaziju. 2010. godine upisujem preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu kojeg završavam ak.god. 2013./2014. s temom završnog rada: „Posttranslacijske modifikacije histona“. 2014. godine upisujem diplomski studij na PMF-u u Zagrebu, istraživački smjer; grane Analitička kemija i Biokemija. Dobitnica sam Posebne Rektorove nagrade u području Prirodnih znanosti u ak. god. 2012./2013. Uz redovitu nastavu sudjelovala sam na istraživanju Biokemijskog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za što sam u ak.god. 2014./2015. dobila nagradu Kemijskog odsjeka za izvannastavno znanstveno istraživanje. Također sam sudjelovala na simpoziju o termoforezi pod nazivom „Symposium & Workshop on Microscale Thermophoresis“ sa posterskim izlaganjem, te na „3. Simpoziju studenata kemičara“ sa usmenim izlaganjem na temu **“**Analiza onečišćenja 7-etiltriptofola pomoću sustava LC-SPE/krio NMR”. Dobitnica sam stipendije za izvrsnost Ivanić-Grada za akademsku godinu 2015./2016.